

Оригинальная статья / Original article

УДК 578.7; 578.828;615.281.8

DOI: 10.18470/1992-1098-2026-1-1



# Противовирусная активность комбинаций антисмысловых олигонуклеотидов, направленных на различные области генома ВИЧ-1

Людмила Г. Готфрид<sup>1</sup>, Максим С. Купрюшкин<sup>2</sup>, Анна С. Павлова<sup>2</sup>, Мария П. Гашникова<sup>1</sup>, Алексей В. Тотменин<sup>1</sup>, Инна А. Пышная<sup>2</sup>, Наталья М. Гашникова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Россия

<sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

## Контактное лицо

Людмила Г. Готфрид, н.с., ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора; 630559 Россия, рп. Кольцово, Новосибирская область.

Тел. +79134506795

Email [gotfrid\\_lg@vector.nsc.ru](mailto:gotfrid_lg@vector.nsc.ru)

ORCID <https://orcid.org/0000-0001-5896-8231>

## Формат цитирования

Готфрид Л.Г., Купрюшкин М.С., Павлова А.С., Гашникова М.П., Тотменин А.В., Пышная И.А., Гашникова Н.М. Противовирусная активность комбинаций антисмысловых олигонуклеотидов, направленных на различные области генома ВИЧ-1 // Юг России: экология, развитие. 2026. Т.21, N 1. С. 6-13. DOI: 10.18470/1992-1098-2026-1-1

Получена 22 ноября 2025 г.

Прошла рецензирование 20 декабря 2025 г.

Принята 25 декабря 2025 г.

## Резюме

**Цель** – исследовать способность комбинаций антисмысловых тиофосфатных олигодезоксирибонуклеотидов, направленных на консервативные участки генома ВИЧ-1, подавлять репродукцию вируса.

Антиретровирусную активность антисмысловых олигонуклеотидов исследовали на лимфоидной культуре клеток человека МТ4, инфицированной штаммом ВИЧ-1 суб-субтипа А6, путем определения количества вирусного белка р24 методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Изученные олигонуклеотиды и их комбинации продемонстрировали способность подавлять репликацию ВИЧ-1 в наномолярных концентрациях. Для моно-олигонуклеотидов наилучшим противовирусным подавлением обладал олигонуклеотид, направленный на область гена *gag* ( $IC_{50}=58 \pm 4,4$  нМ). Среди исследованных комбинаций наилучший показатель  $IC_{50}$  ( $29 \pm 1,7$  нМ) был получен для купажу олигонуклеотидов, направленных на области гена *gag* и праймер-связывающего сайта, выполненное исследование подтвердило способность комбинаций олигонуклеотидов, направленных на подавление различных участков генома, отвечающих за разные этапы жизненного цикла вируса, синергически усиливать противовирусный эффект по сравнению с эффектом от применения соответствующих олигонуклеотидов по одному. Обоснование возможности использования комбинации олигонуклеотидов имеет большое значение, так как разнонаправленность противовирусного действия олигонуклеотидов позволяет минимизировать возможное негативное влияние мутационной изменчивости ВИЧ на противовирусную эффективность препаратов.

## Ключевые слова

ВИЧ, модифицированные олигонуклеотиды, антиретровирусная активность модифицированных олигонуклеотидов.

# Antiviral activity of antisense oligonucleotide combinations targeting various regions of the HIV-1 genome

Ludmila G. Gotfrid<sup>1</sup>, Maxim S. Kupryushkin<sup>2</sup>, Anna S. Pavlova<sup>2</sup>, Maria P. Gashnikova<sup>1</sup>,  
Alexei V. Totmenin<sup>1</sup>, Inna A. Pyshnaya<sup>2</sup> and Natalya M. Gashnikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Vector State Research Centre of Virology and Biotechnology, Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russia

<sup>2</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

## Principal contact

Ludmila G. Gotfrid, Researcher, Vector State  
Research Centre of Virology and Biotechnology,  
Koltsovo, Novosibirsk region, Russia 630559.  
Tel. +79134506795

Email [gotfrid\\_lg@vector.nsc.ru](mailto:gotfrid_lg@vector.nsc.ru)

ORCID <https://orcid.org/0000-0001-5896-8231>

## How to cite this article

Gotfrid L.G., Kupryushkin M.S., Pavlova A.S.,  
Gashnikova M.P., Totmenin A.V., Pyshnaya I.A.,  
Gashnikova N.M. Antiviral activity of antisense  
oligonucleotide combinations targeting various  
regions of the HIV-1 genome. *South of Russia:  
ecology, development*. 2026; 21(1):6-13. (In Russ.)  
DOI: 10.18470/1992-1098-2026-1-1

Received 22 November 2025

Revised 20 December 2025

Accepted 25 December 2025

## Abstract

The goal of this study was to investigate the effectiveness in suppressing viral replication of combinations of antisense phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides targeting conserved regions in the HIV-1 genome.

The antiretroviral activity of the antisense oligonucleotides was evaluated using human MT4 lymphocyte culture infected with HIV-1 subtype A6. The amount of viral protein p24 was measured using an enzyme immunoassay (ELISA) to determine the effectiveness of the oligonucleotides treatments.

The oligonucleotides studied and their combinations showed the ability to inhibit HIV-1 replication at nanomolar concentrations. Among the mono-oligonucleotides, the one targeting the *gag* gene region had the best anti-viral suppression ( $IC_{50} = 58 \pm 4.4$  nM). Among the combinations, the most effective ( $IC_{50} = 29 \pm 1.7$  nM) consisted of oligonucleotides targeting the *gag* region and the primer binding site. These results confirm the potential of combining oligonucleotides that target different regions of the HIV-1 genome to synergistically increase the anti-viral effect, as compared to using each oligonucleotide individually. The justification for using a combination of oligonucleotides is important because the multidirectional antiviral effect of these molecules minimises the potential negative impact of HIV's mutational variability on the effectiveness of antiviral drugs.

## Key Words

HIV, modified oligonucleotides, antiretroviral activity of modified oligonucleotides.

## ВВЕДЕНИЕ

В последние годы произошел большой прорыв в применении генной терапии для лечения различных заболеваний [1–4]. Новые возможности химической модификации нуклеиновых кислот позволяют получить олигонуклеотидные конструкции, способные к проникновению в целевые клетки и стабильные в биологических жидкостях, что открывает широкие возможности их использования в качестве терапевтических средств [5–7].

Продолжаются исследования возможности применения антисмысловых олигонуклеотидов как средств генной терапии для борьбы с ВИЧ-инфекцией [8]. Комплексные разрабатываемые терапевтические соединения против ВИЧ, включающие различные дипептиды, одноцепочечные олигонуклеотиды и другие молекулы, имея разные мишени и механизмы реализации противовирусного действия, показывают высокую эффективность подавления репликации разных генетических вариантов ВИЧ-1 [9–12].

С развитием современных технологий пополняются знания о сложной системе взаимодействий вируса с клетками человека на различных этапах воспроизводства вируса, что может быть использовано для поиска новых подходов к терапии ВИЧ-инфекции.

С момента открытия азидотимидина (AZT) в 1989 году и начала его применения как моно-препарата антиретровирусная терапия претерпела колоссальные изменения и на сегодняшний день позволила превратить ВИЧ-инфекцию в управляемое хроническое заболевание [13]. В связи с высокой мутационной изменчивостью ВИЧ лечение одним препаратом с течением времени становится неэффективным, поэтому требуется прием комбинаций препаратов, направленных на различные стадии жизненного цикла вируса. В настоящее время терапия является пожизненной [14], так как успешное лечение, позволяющее подавить репродукцию вируса в организме человека до неопределяемого уровня РНК ВИЧ-1 в плазме крови, не в состоянии полностью избавить организм от вируса, который сохраняется в клетках в латентном состоянии [15–16]. При приеме антиретровирусной терапии (АРТ) возможно возникновение побочных эффектов, что может снижать приверженность пациентов или вовсе быть причиной отказа от терапии, что неизбежно приводит к возобновлению вирусной репродукции в организме [17–19] и ограниченному выбору препаратов для лечения в дальнейшем [20]. Все это делает поиск новых антиретровирусных препаратов актуальным и требует изучения альтернативных подходов к лечению пациентов с ВИЧ-инфекцией.

На первых этапах исследования нами были выбраны мишени для олигонуклеотидного воздействия в геноме ВИЧ-1 и было показано, что наиболее оптимальной химической модификацией олигонуклеотидов для эффективного подавления репродукции вируса является тиофосфатная модификация (PS), которая позволяет олигонуклеотидам самостоятельно проникать внутрь лимфоидных клеток и придает им стабильность в биологических средах [21].

Целью настоящей работы было изучение способности различных комбинаций антисмысловых тиофосфатных олигонуклеотидов, направленных на высококонсервативные области генома ВИЧ-1, подавлять репродукцию вируса на модели культуры

лимфоидных клеток человека МТ-4, инфицированных ВИЧ-1.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для оценки противовирусной активности антисмысловых олигонуклеотидов был использован высокопродуктивный штамм ВИЧ-1. Выбор данного штамма для исследования противовирусной активности олигонуклеотидов обусловлен тем, что данный вирус был выделен в России и относится к популяции, наиболее распространенной на территориях России и в странах Восточной Европы и Центральной Азии [22; 23] филогенетической группе суб-субтипа А6. Данный штамм характеризуется фенотипом rapid/high (на 5-е сутки культивирования концентрация вирусного белка р24 >700 000 пкг/мл) и обладает высокой цитопатической активностью (100%-ая гибель всех клеток на 5-е сутки культивирования). Вирус был предварительно наработан в течение 3-х суток на культуре клеток МТ-4 для достижения логарифмической фазы репродукции, вирусный супернатант очищен и криоконсервирован до востребования. TCID<sub>50</sub> вирусного супернатанта определяли методом Рида – Менча [24].

Для оценки противовирусной активности исследуемых олигонуклеотидов использовали метод иммуоферментного количественного определения вирусного белка р24 с применением набора ВИЧ-1 р24-антиген-ИФА-БЕСТ («Вектор-Бест», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Клеточная культура МТ-4 получена из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Клетки МТ-4 культивировали на среде RPMI-1640, содержащей 0,2 % бикарбоната натрия с добавлением 10 % инактивированной фетальной сыворотки, 2 мМ L-глутамин и 20 мкг/мл гентамицина в закрытой культуральной посуде в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37°C и 5 % CO<sub>2</sub>. Посадочная концентрация составляла 500 000 клеток на 1 мл среды.

Олигонуклеотиды (Таблица 1) были получены в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 125012300656-5 твердофазным амидофосфитным методом на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе ASM-800 (Biosset, Новосибирск, Россия). Синтез проводился в масштабе 0,4 мкмоль с использованием коммерчески доступных амидофосфитных мономеров и полимерных носителей CPG (Glen Research, Сан-Диего, Калифорния, США). Для введения додецил-содержащего ненуклеотидного звена [DcyI] использовали соответствующий амидофосфитный мономер, полученный как описано в работе [25].

Для введения тиофосфатной межнуклеотидной модификации (PS) использовали тионирующий реагент Sulfurizing Reagent II согласно протоколу производителя (Glen Research, Сан-Диего, США). Для введения фосфорилгуанидиновой межнуклеотидной модификации (PX) использовали протокол, описанный в работе [21].

После твердофазного синтеза полимерный носитель из реактора переносили в пластиковую пробирку и проводили этап финального деблокирования концентрированным водным раствором аммиака 48 часов при комнатной температуре. После финального деблокирования супернатант упаривали досуха в вакууме на ротационном испарителе центрифужного типа CentriVap™ (Labconco, США). К

остатку прибавляли 200 мкл деионизированной воды (mQ) и отделяли полимерный носитель центрифугированием. Выделение олигонуклеотидов проводили с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (оФВЭЖХ).

Выделение проводили на хроматографе Agilent 1200 (США) с колонкой Zorbax SB-C18 (5 мкм) 4,6 × 150 мм в градиенте ацетонитрила в 20 мМ ацетате триэтиламмония, рН 7 от 0 до 90 %, в течение 30 мин при скорости потока 1,5 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, упаривали в вакууме на установке CentriVap™ (Labconco, США). Затем олигонуклеотиды осаждали добавлением 1 мл раствора 2 % LiClO<sub>4</sub> в ацетоне, осадок промывали ацетоном и сушили на воздухе 20 минут.

Серии разведений купажей олигонуклеотидов готовили непосредственно перед экспериментом, начиная с 5 мкМ с трехкратным шагом титрования в трех независимых биологических повторах. Готовые разведения олигонуклеотидов переносили на 96-ти луночный планшет (Servicebio, Китай), предварительно засеянный клетками МТ-4. Инкубация олигонуклеотидов с клетками МТ-4 до внесения ВИЧ-1 составляла 2 ч. Через 2 ч. культуру клеток инфицировали постоянной дозой вируса, соответствующей 300 TCID<sub>50</sub>. Инкубация с вирусом продолжалась 5 суток в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37°C и 5 % CO<sub>2</sub>. На 5-е сутки отбирали пробы культуральной среды для количественного исследования белка р24. Данные собирали для трех независимых постановок, приведенные в статье значения представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение.

#### ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами были выбраны высоко консервативные области генома ВИЧ-1 в качестве потенциальных мишеней для олигонуклеотидов, которые отвечают за

реализацию различных этапов жизненного цикла вируса [21]. Данные участки расположены в области праймер-связывающего сайта (PbS; участвует в синтезе кДНК во время обратной транскрипции), в гене *pol* (Int – фрагмент гена, кодирующий интегразу вируса, которая отвечает за интеграцию провирусной ДНК в геном клетки-хозяина; R – фрагмент гена, отвечающий за вирусный фермент обратную транскриптазу, которая преобразует вирусную РНК в двухцепочечную ДНК в процессе обратной транскрипции), и в гене *gag* ВИЧ-1 (Gag; кодирует матриксный белок р17) [26].

Исследование противовирусной активности и трансфецирующей способности разработанных нами олигонуклеотидов с различными химическими модификациями продемонстрировало большую эффективность для тиофосфатной модификации. Было установлено, что наилучшая способность ингибировать репродукцию вируса была продемонстрирована для:

- 22-х звенного олигодезоксирибонуклеотида обладающего полностью тиофосфатным типом остова (IntS, табл. 1) направленного на участок гена, кодирующего вирусный фермент интегразу;
- 35-звенных олигодезоксирибонуклеотидов, (RS (табл. 1), направленных на участок гена *pol*, при этом RS – тиофосфат, а олигодезоксирибонуклеотид R обладает природным (нативным) фосфодиэфирным типом остова с двумя фосфорилгуанидиновыми межнуклеотидными модификациями в 3'-конце области и тремя последовательно введенными додецил-содержащими ненуклеотидными звеньями в 5'-концевой области последовательности.
- 30-звенного тиофосфатного олигодезоксирибонуклеотида, направленного на участок гена PbS-2 (табл. 1);
- 30-звенного тиофосфатного олигодезоксирибонуклеотида направленного на участок гена Gag-2 (табл. 1).

**Таблица 1.** Последовательности антисмысловых олигонуклеотидов, отобранные для изучения их противовирусной активности в виде комбинаций

**Table 1.** Antisense oligonucleotides were selected at previous stages of the study in order to investigate their antiviral activity when used in combination

Обозначение олигонуклеотида Oligonucleotide designation Шифр / Code	Последовательность 5' – 3' Sequence 5' – 3'
Олигонуклеотиды, направленные на область гена <i>pol</i> ВИЧ-1, кодирующую интегразу вируса Oligonucleotides targeting the region of the HIV-1 <i>pol</i> gene encoding viral integrase	
Int (S)	C <sup>S</sup> T <sup>S</sup> T <sup>S</sup> G <sup>S</sup> A <sup>S</sup> C <sup>S</sup> T <sup>S</sup> T <sup>S</sup> T <sup>S</sup> G <sup>S</sup> G <sup>S</sup> G <sup>S</sup> A <sup>S</sup> T <sup>S</sup> T <sup>S</sup> G <sup>S</sup> A <sup>S</sup> G <sup>S</sup> G <sup>S</sup> G
Олигонуклеотиды, направленные на область гена <i>pol</i> ВИЧ-1, кодирующую обратную транскриптазу вируса Oligonucleotides targeting the <i>pol</i> gene region of HIV-1 encoding viral reverse transcriptase	
RS	C <sup>S</sup> C <sup>S</sup> T <sup>S</sup> C <sup>S</sup> A <sup>S</sup> A <sup>S</sup> T <sup>S</sup> T <sup>S</sup> C <sup>S</sup> C <sup>S</sup> C <sup>S</sup> C <sup>S</sup> C <sup>S</sup> A <sup>S</sup> T <sup>S</sup> C <sup>S</sup> A <sup>S</sup> T <sup>S</sup> T <sup>S</sup> T <sup>S</sup> T <sup>S</sup> G <sup>S</sup> G <sup>S</sup> T <sup>S</sup> T <sup>S</sup> T <sup>S</sup> C <sup>S</sup> A <sup>S</sup> T
R	T[DcyI][DcyI][DcyI]CCTCCAATCCCCCTATCATTTTTGGTTTCC <sup>X</sup> A <sup>T</sup>
Олигонуклеотиды, направленные на области генома ВИЧ-1, кодирующие праймер-связывающий сайт и гена <i>gag</i> Oligonucleotides targeting regions encoding the primer-binding site and the <i>gag</i> gene	
PbS-2	G <sup>S</sup> T <sup>S</sup> C <sup>S</sup> C <sup>S</sup> T <sup>S</sup> G <sup>S</sup> T <sup>S</sup> T <sup>S</sup> C <sup>S</sup> G <sup>S</sup> G <sup>S</sup> G <sup>S</sup> C <sup>S</sup> A <sup>S</sup> C <sup>S</sup> T <sup>S</sup> G <sup>S</sup> C <sup>S</sup> T <sup>S</sup> A <sup>S</sup> G <sup>S</sup> A <sup>S</sup> G <sup>S</sup> A <sup>S</sup> T <sup>S</sup> T
Gag-2	T <sup>S</sup> C <sup>S</sup> G <sup>S</sup> C <sup>S</sup> A <sup>S</sup> C <sup>S</sup> C <sup>S</sup> A <sup>S</sup> T <sup>S</sup> C <sup>S</sup> T <sup>S</sup> C <sup>S</sup> T <sup>S</sup> C <sup>S</sup> C <sup>S</sup> T <sup>S</sup> T <sup>S</sup> C <sup>S</sup> T <sup>S</sup> A <sup>S</sup> G <sup>S</sup> C <sup>S</sup> C <sup>S</sup> T <sup>S</sup> C <sup>S</sup> G

Примечание: [DcyI] – ненуклеотидное додецил-содержащее звено; <sup>X</sup> – фосфорилгуанидиновая модификация; <sup>S</sup> – тиофосфатная модификация

Note: [DcyI] – non-nucleotide dodecyl-containing unit; <sup>X</sup> – phosphorylguanidine modification; <sup>S</sup> – phosphorothioate modification

Данные олигонуклеотиды были также исследованы в виде различных комбинаций для поиска наиболее

эффективных купажей, в которых отдельные олигонуклеотиды направлены на участки в геноме

ВИЧ-1, ответственные за разные стадии его жизненного цикла. Исследование проводили методом «профилактика» («pre-treatment»), который подразумевает введение олигонуклеотидов в клетки до внесения вируса и позволяет смоделировать ситуацию доконтактной профилактики (PrEP).

На первом этапе к клеткам МТ-4 добавляли исследуемые комбинации олигонуклеотидов (табл. 2) и инкубировали в течение 2 часов. Далее осуществляли заражение клеток, без отмывки олигонуклеотидов, и спустя пять дней культивирования ВИЧ с клетками в

присутствии купажей олигонуклеотидов проводилась оценка противовирусной активности олигонуклеотидов, как описано в разделе «Материалы и методы». В качестве контрольных и для сравнения противовирусной активности были использованы клетки, инфицированные ВИЧ, с аналогично введенными моно-олигонуклеотидами, и клетки, инфицированные ВИЧ без добавления олигонуклеотидов (контроль вируса). Данные, полученные в ходе исследования, представлены в Таблице 2.

**Таблица 2.** Данные по оценке противовирусной активности комбинаций- и моно-олигонуклеотидов на клетках человека МТ-4, инфицированных ВИЧ-1

**Table 2.** Data on the evaluation of antiviral activity of combinations- and mono-oligonucleotides in human MT-4 cells infected with HIV-1

Обозначение комбинации олигонуклеотидов Oligonucleotide designation	Мишени в геноме ВИЧ-1 Targets in the HIV-1 genome	IC <sub>50</sub> , нМ IC <sub>50</sub> , nM
Gag-2 + RS	Область гена <i>gag</i> + область гена <i>pol</i> gag gene region + pol gene region	34,0 ± 3,1
Gag-2 + R		33,0 ± 2,7
Gag-2 + Int (S)	Область гена <i>gag</i> + область гена <i>pol</i> gag gene region + pol gene region	30,0 ± 2,1
Gag-2 + PbS-2	Область гена <i>gag</i> + область праймер-связывающего сайта gag gene region + primer-binding site region	34,0 ± 2,7
PbS-2 + RS	Область праймер-связывающего сайта + область гена <i>pol</i> primer-binding site region + pol gene region	29,0 ± 1,7
PbS-2 + R		46,0 ± 3,6
Int (S)	Область гена <i>pol</i> (вирусный фермент – интегразы) pol gene region (viral enzyme – integrase)	87,0 ± 5,3
RS	Область гена <i>pol</i> (вирусный фермент – обратная транскриптаза) pol gene region (viral enzyme – reverse transcriptase)	100,0 ± 4,7
R		285,0 ± 9,7
Gag-2	Область гена <i>gag</i> gag gene region	58,0 ± 4,4
PbS-2	Область праймер-связывающего сайта primer-binding site region	85, ± 4,9

В работе, проведенной Takahashi с соавт., тиофосфатные антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие дополнительно 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабино (FANA) модификации также были исследованы на способность ингибирования ВИЧ-1 *in vitro* [27]. Был продемонстрирован терапевтический потенциал моно-олигонуклеотидов с предположением возможности использования комбинаций, что указывает на актуальность изучения возможности применения купажей олигонуклеотидов для более эффективного подавления репликации вируса.

Для моно-олигонуклеотидов получены результаты, аналогичные ранее проведенным исследованиям. Наилучшим противовирусным подавлением обладал олигонуклеотид Gag-2 (IC<sub>50</sub>=58 ± 4,9 нМ). Олигонуклеотиды, направленные на область, кодирующую интегразу вируса, и область праймер-связывающего сайта, Int (S) и PbS-2, соответственно, проявили схожую противовирусную активность с показателями 87 ± 5,3 и 85 ± 4,9 нМ, соответственно. Различия в противовирусной активности исследованных олигонуклеотидов и их купажей возможны как из-за биологической доступности участков-мишеней в геноме вируса, так и из-за отличий в экспрессии конкретных генов, что может указывать на перспективность изучения высоко

консервативного участка области гена *gag* как наиболее релевантной мишени для антисмыслового воздействия на ВИЧ-1.

Использование комбинаций олигонуклеотидов, нацеленных на разные участки-мишени, приводит к повышению их противовирусной эффективности по сравнению с входящими в состав купажей аналогичными моно-олигонуклеотидами. Наилучший показатель IC<sub>50</sub> (29 ± 1,7 нМ) получен для комбинации PbS-2 + RS (область праймер-связывающего сайта + область гена *gag*). При этом аналогичная комбинация, но в связке с не тиофосфатным олигонуклеотидом, а додецил-содержащим олигодезоксирибонуклеотидом R (PbS-2 + R), показала значение IC<sub>50</sub> 46 ± 3,6 нМ, что свидетельствует о несколько более низкой противовирусной активности в сравнении с другими комбинациями (Таблица 2). Мы предполагаем, что додецил-содержащая группировка не является причиной данного снижения активности олигонуклеотида, а в большей степени к такому результату приводит замена остова олигонуклеотида с тиофосфатного на дезоксирибо. Так как ранее нами была исследована противовирусная активность олигодезоксирибонуклеотида, аналогичного по своей нуклеотидной последовательности Int (S) и было

показано, что IC<sub>50</sub> дезоксирибо нативного олигомера выше, чем для его тиофосфатного аналога [21].

Главная особенность тиофосфатных олигонуклеотидов – это высокая аффинность к взаимодействию с широким спектром биологических соединений, особенно белковой природы [6]. Данное свойство может приводить к возникновению неспецифических взаимодействий, ввиду которых происходит усиление токсических и других нежелательных биологических эффектов в организме в том числе. Ранее в работе Stain C.A. с соавт. [28] было продемонстрировано неспецифическое сродство тиофосфатного олигонуклеотида к gp120 гликопротеину ВИЧ, необходимого для взаимодействия вируса с CD4+–рецептором клетки и последующего попадания внутрь. Вероятно, наблюдаемое нами закономерное повышение противовирусной активности исследованных тиофосфатных аналогов в сравнении с соответствующими им олигодезоксирибонуклеотидами, является результатом, в том числе подобных эффектов. Для исключения таких факторов необходимо проведение дополнительных исследований, в том числе с изучением других потенциально перспективных модификаций для использования в антисмысловой стратегии, например, метилсульфониламидофосфатных (мезильных [29]) олигонуклеотидных производных.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование указывает на то, что комбинации олигонуклеотидов, направленные на разные мишени в геноме ВИЧ, способны усиливать противовирусный эффект, что крайне важно для разработки новых комплексных противовирусных препаратов для терапии ВИЧ-инфекции, так как разнонаправленность противовирусного действия олигонуклеотидов позволяет минимизировать возможное негативное влияние мутационной изменчивости ВИЧ на противовирусную эффективность препаратов.

Важно также отметить, что выраженное противовирусное действие комбинаций олигонуклеотидов было показано при культивировании высоко репродуктивного штамма ВИЧ-1 на лимфоидных клетках человека, то есть на модели ВИЧ-инфекции, максимально приближенной к протеканию процессов инфицирования и размножения вируса *in vivo*.

#### БЛАГОДАРНОСТЬ

Исследование выполнено в рамках Государственного задания 6/21 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

#### ACKNOWLEDGMENT

State Assignment no. 6/21 (Vector FBRI SRC VB, Rospotrebnadzor) supported this research.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Xie Q., Li K., Chen Y., Li Y., Jiang W., Cao W., Yu H., Fan D., Deng B. Gene therapy breakthroughs in ALS: a beacon of hope for 20% of ALS patients // *Translational Neurodegeneration*. 2025. V. 14(1). <https://doi.org/10.1186/s40035-025-00477-6>
- Ay C., Reinisch A. Gene therapy: principles, challenges and use in clinical practice // *Wiener klinische Wochenschrift*. 2024. V. 137. <https://doi.org/10.1007/s00508-024-02368-8>
- Singh K., Sethi P., Datta S., Jitendra Singh Chaudhary, Kumar S., Jain D., Jeetendra Kumar Gupta, Kumar S., Ajay Guru, Siva

Prasad Panda Advances in Gene Therapy Approaches Targeting Neuro-inflammation in Neurodegenerative Diseases // *Ageing research reviews*. 2024. V. 98. P. 102321–102321. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2024.102321>

- Samelson-Jones B.J., Small J.C., George L.A. Roctavian Gene Therapy for Hemophilia A // *Blood Advances*. 2024. V. 8(19). <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2023011847>
- Desgraves J.F., Mendez Valdez M.J., Chandar J., Gurses M.E., Henderson L., Castro J.R., Seetheram D., Ivan M.E., Komotar R.J., Shah A.H. Antisense Oligonucleotides for Rapid Translation of Gene Therapy in Glioblastoma // *Cancers*. 2024. V. 16(10), P. 1944. <https://doi.org/10.3390/cancers16101944>
- Crooke S.T., Seth P.P., Vickers T.A., Liang X. The Interaction of Phosphorothioate-Containing RNA Targeted Drugs with Proteins Is a Critical Determinant of the Therapeutic Effects of These Agents // *Journal of the American Chemical Society*. 2020. V. 142(35). P. 14754–14771. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c04928>
- Sabrina Haque U., Kohut M., Yokota T. Comprehensive review of adverse reactions and toxicology in ASO-based therapies for Duchenne Muscular Dystrophy: From FDA-approved drugs to peptide-conjugated ASO // *Current Research in Toxicology*. 2024. V. 7. Article id: 100182. <https://doi.org/10.1016/j.crtox.2024.100182>
- Xun J. et al. Editing out HIV: application of gene editing technology to achieve functional cure // *Retrovirology*. 2021. V. 18. N 1. P. 39. <https://doi.org/10.1186/s12977-021-00581-1>
- Ceña-Diez R., Singh K., Spetz A.-L., Anders Sönnernborg Novel Naturally Occurring Dipeptides and Single-Stranded Oligonucleotide Act as Entry Inhibitors and Exhibit a Strong Synergistic Anti-HIV-1 Profile // *Infectious Diseases and Therapy*. 2022. V. 11(3). P. 1103–1116. <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00626-8>
- Xun J., Zhang X., Guo S., Lu H., Chen J. Editing out HIV: application of gene editing technology to achieve functional cure // *Retrovirology*. 2021. V. 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12977-021-00581-1>
- Kitawi R., Ledger S., Kelleher A.D., Ahlenstiel C.L. Advances in HIV Gene Therapy // *International Journal of Molecular Sciences*. 2024. V. 25(5). Article id: 2771. <https://doi.org/10.3390/ijms25052771>
- Sachin Kothawade, Wagh V., Pande V., Amit Lunkad Gene Therapy Approaches in HIV Treatment // *Infectious diseases*. 2024. <https://doi.org/10.5772/intechopen.112138>
- Menéndez-Arias L., Delgado R. Update and latest advances in antiretroviral therapy // *Trends in Pharmacological Sciences*. 2022. V. 43(1). P. 16–29. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.10.004>
- Dufour C., Gantner P., Fromentin R., Chomont N. The multifaceted nature of HIV latency // *The Journal of Clinical Investigation*. 2021. V. 130(7). <https://doi.org/10.1172/JCI136227>
- Kreider E.F., Bar K.J. HIV-1 Reservoir Persistence and Decay: Implications for Cure Strategies // *Current HIV/AIDS Reports*. 2022. <https://doi.org/10.1007/s11904-022-00604-2>
- Chen W., Berkhout B., Pasternak A.O. Phenotyping Viral Reservoirs to Reveal HIV-1 Hiding Places // *Current HIV/AIDS Reports*. 2025. V. 22(1). <https://doi.org/10.1007/s11904-025-00723-6>
- Piran C.M.G., Mori M.M., Cargnin A.V.E., Fonseca B.S. da, Shibukawa B.M.C., Merino M. de F.G.L., Frade J.M.G., Furtado M.D. Social determinants of adherence to antiretroviral therapy among adolescents and young people living with HIV: a scoping review // *Revista da Escola de Enfermagem da USP*. 2025. V. 59. <https://doi.org/10.1590/1980-220x-reeusp-2025-0026en>
- Bertagnolio S., Hermans L.E., Jordan M.I., Ávila-Ríos S., Collins Iwuji, Derache A., Delaporte E., Annemarie Aves T., Sayem Borhan, Leenus A., Parkin N., Doherty M., Inzaule S.C., Mbuagbaw L. Clinical Impact of Pretreatment Human

- Immunodeficiency Virus Drug Resistance in People Initiating Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor-Containing Antiretroviral Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis // *The Journal of Infectious Diseases*. 2020. V. 224(3). P. 377–388. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa683>
19. Yihenew Zurbachew, Desta Hiko, Bacha G., Hailu Merga Adolescent's and youth's adherence to antiretroviral therapy for better treatment outcome and its determinants: multi-center study in public health facilities // *Aids Research and Therapy*. 2023. V. 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12981-023-00588-y>
20. Hendra Dharmawan Sitanggang, Tri, Ayu I.M. Effect of non-adherence to ARV therapy on 3-year life of HIV/AIDS patients: a cohort retrospective study // *Riset Informasi Kesehatan*. (2023). V. 12(1). P. 1–1. <https://doi.org/10.30644/rik.v12i1.692>
21. Готфрид Л.Г., Павлова А.С., Купрюшкин М.С., Пышная И.А., Гашникова Н.М. Противовирусная активность модифицированных олигонуклеотидов в лимфоидных клетках человека, инфицированных ВИЧ-1 // Юг России: экология, развитие. 2025. Т. 19. N 4. С. 57–67. <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2024-4-5>
22. Abidi S.H., Aibekova L., Davlidova S., Amangeldiyeva A., Foley B., Ali S. Origin and evolution of HIV-1 subtype A6 // *PLOS ONE*. 2021. V. 16(12). Article id: e0260604. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260604>
23. Madita Schlösser, Kartashev V.V., Mikkola V.H., Shemshura A., Saukhat S., Kolpakov D., Suladze A., Tverdokhlebova T., Hutt K., Heger E., Knops E., Böhm M., Cristanziano V.D., Kaiser R., Anders Sönnnerborg, Zazzi M., Bobkova M., Sierra S. HIV-1 Sub-Subtype A6: Settings for Normalised Identification and Molecular Epidemiology in the Southern Federal District, Russia // *Viruses*. 2020. V. 12(4). P. 475–475. <https://doi.org/10.3390/v12040475>
24. Lj R. A simple method of estimating fifty per cent endpoints // *Am J Hyg*. 1938. V. 27. P. 493–495. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
25. Kupryushkin M.S., Nekrasov M.D., Stetsenko D.A., Pyshnyi D.V. Efficient Functionalization of Oligonucleotides by New Achiral Nonnucleosidic Monomers // *Organic Letters*. 2014. V. 16(11). P. 2842–2845. <https://doi.org/10.1021/ol500668n>
26. Duchon A., Hu W.-S. HIV-1 RNA genome packaging: it's G-rated // *mBio*. 2024. V. 15(4). Article id: e0086123. <https://doi.org/10.1128/mbio.00861-23>
27. Takahashi M., Li H., Zhou J., Chomchan P., Aishwarya V., Damha M.J., Rossi J.J. Dual Mechanisms of Action of Self-Delivering, Anti-HIV-1 FANA Oligonucleotides as a Potential New Approach to HIV Therapy // *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 2019. V. 17. P. 615–625. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.07.001>
28. Stein C.A., Cleary A.M., Yakubov L., Lederman S. Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides Bind to the Third Variable Loop Domain (v3) of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 // *Antisense Research and Development*. 1993. V. 3(1). P. 19–31. <https://doi.org/10.1089/ard.1993.3.19>
29. Miroshnichenko S.K., Patutina O.A., Burakova E.A., Chelobanov B.P., Fokina, A.A., Vlassov V.V., Altman S., Zenkova M.A., Stetsenko D.A. Methyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates with improved biochemical and biological properties // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019. V. 116(4). P. 1229–1234. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813376116>
30. Singh K., Sethi P., Datta S., Jitendra Singh Chaudhary, Kumar S., Jain D., Jeetendra Kumar Gupta, Kumar S., Ajay Guru, Siva Prasad Panda. Advances in Gene Therapy Approaches Targeting Neuro-inflammation in Neurodegenerative Diseases. *Ageing research reviews*, 2024, vol. 98, pp. 102321–102321. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2024.102321>
31. Samelson-Jones B.J., Small J.C., George L.A. Rictavian Gene Therapy for Hemophilia A. *Blood Advances*, 2024, vol. 8(19). <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2023011847>
32. Desgraves J.F., Mendez Valdez M.J., Chandar J., Gurses M.E., Henderson L., Castro J.R., Seetheram D., Ivan M.E., Komotar R.J., Shah A.H. Antisense Oligonucleotides for Rapid Translation of Gene Therapy in Glioblastoma. *Cancers*, 2024, vol. 16(10), p. 1944. <https://doi.org/10.3390/cancers16101944>
33. Crooke S.T., Seth P.P., Vickers T.A., Liang X. The Interaction of Phosphorothioate-Containing RNA Targeted Drugs with Proteins Is a Critical Determinant of the Therapeutic Effects of These Agents. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, vol. 142(35), pp. 14754–14771. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c04928>
34. Sabrina Haque U., Kohut M., Yokota T. Comprehensive review of adverse reactions and toxicology in ASO-based therapies for Duchenne Muscular Dystrophy: From FDA-approved drugs to peptide-conjugated ASO. *Current Research in Toxicology*, 2024, vol. 7, article id: 100182. <https://doi.org/10.1016/j.crtox.2024.100182>
35. Xun J. et al. Editing out HIV: application of gene editing technology to achieve functional cure. *Retrovirology*, 2021, vol. 18, no. 1, pp. 39. <https://doi.org/10.1186/s12977-021-00581-1>
36. Ceña-Diez R., Singh K., Spetz A.-L., Anders Sönnnerborg Novel Naturally Occurring Dipeptides and Single-Stranded Oligonucleotide Act as Entry Inhibitors and Exhibit a Strong Synergistic Anti-HIV-1 Profile. *Infectious Diseases and Therapy*, 2022, vol. 11(3), pp. 1103–1116. <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00626-8>
37. Xun J., Zhang X., Guo S., Lu H., Chen J. Editing out HIV: application of gene editing technology to achieve functional cure. *Retrovirology*, 2021, vol. 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12977-021-00581-1>
38. Kitawi R., Ledger S., Kelleher A.D., Ahlenstiel C.L. Advances in HIV Gene Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, vol. 25(5), article id: 2771. <https://doi.org/10.3390/ijms25052771>
39. Sachin Kothawade, Wagh V., Pande V., Amit Lunkad Gene Therapy Approaches in HIV Treatment. *Infectious diseases*. 2024. <https://doi.org/10.5772/intechopen.112138>
40. Menéndez-Arias L., Delgado R. Update and latest advances in antiretroviral therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2022, vol. 43(1), pp. 16–29. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.10.004>
41. Dufour C., Gantner P., Fromentin R., Chomont N. The multifaceted nature of HIV latency. *The Journal of Clinical Investigation*, 2021, vol. 130(7). <https://doi.org/10.1172/JCI136227>
42. Kreider E.F., Bar K.J. HIV-1 Reservoir Persistence and Decay: Implications for Cure Strategies. *Current HIV/AIDS Reports*. 2022. <https://doi.org/10.1007/s11904-022-00604-2>
43. Chen W., Berkhout B., Pasternak A.O. Phenotyping Viral Reservoirs to Reveal HIV-1 Hiding Places. *Current HIV/AIDS Reports*, 2025, vol. 22(1). <https://doi.org/10.1007/s11904-025-00723-6>
44. Piran C.M.G., Mori M.M., Cargnin A.V.E., Fonseca B.S. da, Shibukawa B.M.C., Merino M. de F.G.L., Frade J.M.G., Furtado M.D. Social determinants of adherence to antiretroviral therapy among adolescents and young people living with HIV: a scoping review. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, 2025, vol. 59. <https://doi.org/10.1590/1980-220x-reeusp-2025-0026en>
45. Bertagnolio S., Hermans L.E., Jordan M.I., Ávila-Ríos S., Collins Iwuji, Derache A., Delaporte E., Annemarie Aves T.,

Sayem Borhan, Leenus A., Parkin N., Doherty M., Inzaule S.C., Mbuagbaw L. Clinical Impact of Pretreatment Human Immunodeficiency Virus Drug Resistance in People Initiating Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor-Containing Antiretroviral Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *The Journal of Infectious Diseases*, 2020, vol. 224(3), pp. 377–388. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa683>

19. Yihnew Zurbachew, Desta Hiko, Bacha G., Hailu Merga Adolescent's and youth's adherence to antiretroviral therapy for better treatment outcome and its determinants: multi-center study in public health facilities. *Aids Research and Therapy*, 2023, vol. 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12981-023-00588-y>

20. Hendra Dhermawan Sitanggang, Tri, Ayu I.M. Effect of non-adherence to ARV therapy on 3-year life of HIV/AIDS patients: a cohort retrospective study. *Riset Informasi Kesehatan*, 2023, vol. 12(1), pp. 1–1. <https://doi.org/10.30644/rik.v12i1.692>

21. Gotfrid L.G., Pavlova A.S., Kupryushkin M.S., Pyshnaya I.A., Gashnikova N.M. Antiviral activity of modified oligonucleotides in human lymphoid cells infected with a strain of HIV-1. *South of Russia: ecology, development*, 2025, vol. 19, no. 4, pp. 57–67. (In Russian) <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2024-4-5>

22. Abidi S.H., Aibekova L., Davlidova S., Amangeldiyeva A., Foley B., Ali S. Origin and evolution of HIV-1 subtype A6. *PLOS ONE*, 2021, vol. 16(12), article id: e0260604. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260604>

23. Madita Schlösser, Kartashev V.V., Mikkola V.H., Shemshura A., Saukhat S., Kolpakov D., Suladze A., Tverdokhlebova T., Hutt K., Heger E., Knops E., Böhm M., Cristanziano V.D., Kaiser R., Anders Sönnnerborg, Zazzi M., Bobkova M., Sierra S. HIV-1 Sub-Subtype A6: Settings for Normalised Identification and

Molecular Epidemiology in the Southern Federal District, Russia. *Viruses*, 2020, vol. 12(4), pp. 475–475. <https://doi.org/10.3390/v12040475>

24. Lj R. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg*, 1938, vol. 27, pp. 493–495. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>

25. Kupryushkin M.S., Nekrasov M.D., Stetsenko D.A., Pyshnyi D.V. Efficient Functionalization of Oligonucleotides by New Achiral Nonnucleosidic Monomers. *Organic Letters*, 2014, vol. 16(11), pp. 2842–2845. <https://doi.org/10.1021/ol500668n>

26. Duchon A., Hu W.-S. HIV-1 RNA genome packaging: it's G-rated. *mBio*, 2024, vol. 15(4), article id: e0086123. <https://doi.org/10.1128/mbio.00861-23>

27. Takahashi M., Li H., Zhou J., Chomchan P., Aishwarya V., Damha M.J., Rossi J.J. Dual Mechanisms of Action of Self-Delivering, Anti-HIV-1 FANA Oligonucleotides as a Potential New Approach to HIV Therapy. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2019, vol. 17, pp. 615–625. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.07.001>

28. Stein C.A., Cleary A.M., Yakubov L., Lederman S. Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides Bind to the Third Variable Loop Domain (v3) of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120. *Antisense Research and Development*, 1993, vol. 3(1), pp. 19–31. <https://doi.org/10.1089/ard.1993.3.19>

29. Miroshnichenko S.K., Patutina O.A., Burakova E.A., Chelobanov B.P., Fokina, A.A., Vlassov V.V., Altman S., Zenkova M.A., Stetsenko D.A. Mesyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates with improved biochemical and biological properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2019, vol. 116(4), pp. 1229–1234. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813376116>

#### КРИТЕРИИ АВТОРСТВА

Людмила Г. Готфрид, Анна С. Павлова и Максим С. Купрюшкин отредактировали, обработали и написали текст. Максим С. Купрюшкин и Анна С. Павлова выполнили синтез соединений. Людмила Г. Готфрид и Мария П. Гашникова провели исследование активности и обработали результаты. Алексей В. Тотменин, Инна А. Пышная и Наталья М. Гашникова разработали концепцию и дизайн исследования. Все авторы в равной степени несут ответственность при обнаружении плагиата, самоплагиата и других неэтических проблем.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Ludmilla G. Gotfrid, Anna S. Pavlova and Maxim S. Kupryushkin edited, processed and wrote the text. Maxim S. Kupryushkin and Anna S. Pavlova performed the synthesis of compounds. Ludmilla G. Gotfrid and Maria P. Gashnikova conducted an activity study and processed the results. Alexei V. Totmenin, Inna A. Pyshnaya and Natalya M. Gashnikova undertook research conception and design. All authors are equally responsible for plagiarism, self-plagiarism and other ethical transgressions.

#### NO CONFLICT OF INTEREST DECLARATION

The authors declare no conflict of interest.

#### ORCID

Людмила Г. Готфрид / Ludmila G. Gotfrid <https://orcid.org/0000-0001-5896-8231>  
 Максим С. Купрюшкин / Maxim S. Kupryushkin <https://orcid.org/0000-0002-2300-7809>  
 Анна С. Павлова / Anna S. Pavlova <https://orcid.org/0000-0001-7889-6319>  
 Мария П. Гашникова / Maria P. Gashnikova <https://orcid.org/0000-0001-9888-5422>  
 Алексей В. Тотменин / Alexei V. Totmenin <https://orcid.org/0000-0002-7418-4872>  
 Инна А. Пышная / Inna A. Pyshnaya <https://orcid.org/0000-0002-7559-2376>  
 Наталья М. Гашникова / Natalya M. Gashnikova <https://orcid.org/0000-0002-0891-0880>