



ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОКОМПЛЕКСОВ АНТИСМЫСЛОВЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, НАЦЕЛЕННЫХ НА БЕЛОК VP72, В КЛЕТКАХ VERO, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

© 2021 г. А. В. Акобян*, Е. А. Буракова**, ***, Э. А. Арабян*, А. А. Фокина**, ***,
А. Р. Коцинян*, С. В. Васильева****, О. С. Закарян*, Д. А. Степенко**, ***, #

*Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения,
Армения, 0014 Ереван, ул. Асратяна, 7

**Новосибирский государственный университет, Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2

***Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, 630090, Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 10

****ФГБУН "Институт химической биологии и фундаментальной медицины" СО РАН,
Россия, 630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 30.09.2020 г.

После доработки 11.10.2020 г.

Принята к публикации 14.10.2020 г.

Антисмысловые олигодезоксирибонуклеотиды с тиофосфатными или мезилфосфорамидными межнуклеотидными группами, нацеленные на мРНК основного капсидного белка VP72 вируса африканской чумы свиней (АЧС), в свободном виде с трансфекцией Липофектаминоном 3000 или в виде ионных комплексов с аминомодифицированными мезопористыми наночастицами диоксида кремния были исследованы на противовирусную активность в клетках Vero, инфицированных вирусом АЧС. Была отмечена относительно высокая цитотоксичность наноконструкций олигонуклеотидов для клеток Vero в концентрациях выше 500 нМ. В ходе экспериментов по определению противовирусной активности были идентифицированы две последовательности антисмысловых олигонуклеотидов, на порядок снижавшие титр вируса в концентрации 500 нМ. При этом противовирусный эффект наноконструкций превосходил активность свободных олигонуклеотидов в присутствии Липофектамина 3000, что свидетельствует о более эффективной доставке наноконструкций в клетки. Антисмысловые олигонуклеотиды, способные снижать репликацию вируса АЧС, до сих пор не были известны из литературы. Полученные данные могут служить отправной точкой для дальнейших исследований по созданию противовирусных препаратов на основе олигонуклеотидов против вируса африканской чумы свиней.

Ключевые слова: олигодезоксирибонуклеотиды, тиофосфаты, мезилфосфорамиды, мезопористые наночастицы диоксида кремния, ингибирование трансляции

DOI: 10.31857/S0132342321020032

ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (АЧС, англ. African swine fever, ASF) относится к наиболее опасным вирусным болезням домашних и диких свиней [1].

Сокращения: APTEs – 3-аминопропилтриэтоксисилан; СТАВ – бромид цетилтриметиламмония; DMTr – 4,4'-диметокситригил; MALDI-TOF – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (лазерная десорбционная ионизация в присутствии матрицы) Time Of Flight (времяпролетная) масс-спектрометрия; TCID₅₀ – цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50% клеток; TEAA – ацетат триэтиламмония; АЧС – африканская чума свиней. Все приведенные последовательности нуклеотидов 5'–3'; префикс d в обозначениях олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

Автор для связи: (тел.: +7 (383) 363-49-63; эл. почта: d.stetsenko@nsu.ru).

Возбудитель болезни – вирус африканской чумы свиней (African swine fever virus, ASFV) – представляет собой ДНК-содержащий вирус из рода *Asfivirus*, принадлежащего к семейству *Asfarviridae*. Высоковирулентные штаммы вируса АЧС могут приводить к 100%-ной смертности среди инфицированных животных.

АЧС эндемична в большинстве стран Африки, расположенных к югу от Сахары, где распространено свиноводство [2]. Первая вспышка АЧС в Европе была отмечена на Пиренейском полуострове в 1950-е гг., что вызвало дальнейшие спорадические вспышки в других европейских странах, таких как Франция, Италия, Бельгия, Нидерланды и Мальта [3]. В этих странах инфекция была к

началу XXI века уничтожена посредством строгого контроля и программ искоренения, за исключением Сардинии, где она по-прежнему распространена среди домашних свиней. Однако АЧС вновь была занесена на европейский континент в 2007 г. через Грузию, из которой она распространилась в Армении, России, Белоруссии, Украине, Латвии, Литве и Эстонии [4].

АЧС имеет серьезные социально-экономические последствия как в случае стран с вновь обнаруженными очагами, так и в странах, где она является эндемичной в течение длительного времени. Особенно высоко ее влияние в тех странах, где значительную роль играет коммерческое свиноводство. Например, вспышки АЧС в Армении привели к огромным экономическим потерям. По данным Национальной статистической службы Республики Армения за 2014 г., в течение первого года вспышек АЧС (2007–2008 гг.) общее поголовье свиней в Армении сократилось на 56%, а объемы производства свинины снизились с 13 300 до 7500 т. Это имело серьезные последствия для продовольственной безопасности, т.к. продукция свиноводства является важным источником пищевого белка в Армении.

С 2007 г. продолжается распространение АЧС среди диких и домашних свиней на территории как европейской, так и азиатской части России. Суммарно в России было зафиксировано более 500 вспышек этого заболевания, было уничтожено более миллиона животных, а экономические потери превысили 30 млрд рублей [5, 6].

Борьба с АЧС опирается на раннее выявление очага инфекции и осуществление карантинных мероприятий, в том числе убоя зараженных свиней [7]. Однако в силу ряда социокультурных факторов, таких как традиционно свободный выгул свиней, незаконное перемещение животных и зараженного мяса, а также существование цикла с лесным природным носителем (дикий кабан), риск возникновения вспышек АЧС как в России, так и в Армении остается значительным. По данным Европейского управления по безопасности пищевых продуктов (EFSA) и Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (FAO), существует высокий риск сохранения АЧС в странах при недостаточных мерах санитарии и плохой организации борьбы с заболеванием. Таким образом, вспышки АЧС представляют собой значительную экономическую проблему как для Армении, так и для России.

Ситуация осложняется тем, что на сегодняшний день еще не создано вакцины против АЧС [8]. Из-за отсутствия эффективных вакцин применение противовирусных средств представляет собой альтернативный подход к борьбе с АЧС и снижению экономического ущерба от этого заболевания. Таким образом, поиск и разработка про-

тивовирусных препаратов, которые могут оказаться перспективным инструментом контроля за распространением АЧС, имеют особую актуальность.

Способность антисмысловых олигонуклеотидов (АСО) избирательно ингибировать экспрессию вирусных генов за счет комплементарного связывания с определенными последовательностями мРНК была впервые экспериментально продемонстрирована более 40 лет назад на примере вируса саркомы Рауса [9]. Бурное развитие химии и биологии нуклеиновых кислот в 1980–1990-е гг. предопределило возросший интерес к АСО в качестве инструментов нового терапевтического подхода к лечению не только вирусных инфекций человека, но и генетических и онкологических заболеваний, а также инфекционных болезней, вызываемых патогенными микроорганизмами [10–12]. В частности, противовирусный препарат фомивирсен (Витравен) стал первым официально одобренным лекарством на основе олигонуклеотида (1998 г.) [13].

Однако, несмотря на значительные успехи клинического использования АСО за прошедшие два десятилетия, их широкое внедрение в медицинскую практику до сих пор во многом замедляется недостаточно эффективным проникновением АСО в клетки и, как следствие, неблагоприятной фармакокинетикой [14]. Поэтому остается актуальной разработка систем доставки АСО в клетки, в том числе с использованием современных достижений в области нанотехнологии [15]. В частности, мезопористые наночастицы диоксида кремния $mSiO_2$ рассматриваются как одна из наиболее перспективных наноразмерных платформ для доставки лекарственных препаратов, в том числе противовирусных [16]. К преимуществам наночастиц $mSiO_2$ относятся высокая емкость, биоразлагаемость и низкая токсичность [17].

Целью данной работы являлось исследование противовирусной активности наноконструкций, состоящих из аминомодифицированных наночастиц $mSiO_2$ и антисмысловых олигонуклеотидов, нацеленных на ингибирование трансляции основного капсидного белка VP72 в культуре клеток Vero, инфицированных вирусом АЧС. Работа включала в себя получение новых наночастиц $mSiO_2$ с повышенной плотностью положительного заряда, которые обладали бы пониженной цитотоксичностью, и их электростатически связанных наноконструкций с АСО на основе как традиционных тиофосфатных (рис. 1а), так и новых мезилфосфорамидных олигодезоксирибонуклеотидов (рис. 1б), нацеленных на мРНК VP72. Ранее было показано, что мезилфосфорамидные аналоги ДНК в культуре клеток проявляют высокую антисмысловую активность, превосходящую активность тиофосфатных олигодезоксирибонуклеотидов [18].

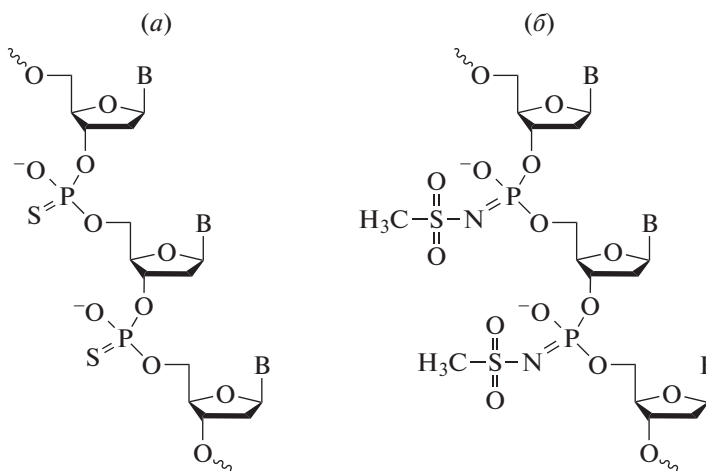


Рис. 1. Структуры антисмысловых олигодезоксирибонуклеотидов с модифицированными фосфатными группами: (а) – тиофосфатными (PS); (б) – мезилфосфорамидными (μ). В – азотистое основание: аденин, гуанин, тимин или цитозин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антисмысловые олигонуклеотиды способны блокировать биосинтез вирусных белков путем комплементарного связывания с вирусной РНК и активации ее расщепления клеточными нуклеазами, например, РНКазой Н [19]. Была продемонстрирована противовирусная активность АСО и малых интерферирующих РНК (small interfering RNA, siРНК) в отношении ряда опасных вирусных инфекций [20, 21]. Однако до настоящего времени не было известно ни одного примера АСО, эффективных против вируса АЧС. Нам удалось найти лишь единственное сообщение об ингибировании биосинтеза вирусных белков А151R и VP72 с помощью siРНК [22]. Таким образом, выбор белка VP72 в качестве мишени для антисмыслового ингибирования был обоснован литературными данными. В настоящей работе нам удалось впервые подобрать последовательности АСО, нацеленных на мРНК VP72, которые на порядок снижали титр вируса АЧС в инфицированных клетках Vero при доставке в виде наноконплексов с наночастицами mSiO₂.

Последовательность гена основного капсидного белка VP72 вируса АЧС (штамм ВА71V) была получена с использованием базы данных PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/M34142.1>). При выборе длины АСО мы руководствовались оптимальной стабильностью каждого из гибридных дуплексов (значение свободной энергии Гиббса от -8 до -10 ккал/моль), образованных АСО с РНК-мишенью, которая способствует максимальной прочности связывания. Способность молекулы мРНК вируса АЧС в области, соответствующей белку VP72, формировать пространственную структуру за счет внутримолекулярных взаимодействий была смоделирована с помощью ком-

пьютерной программы, предсказывающей возможные вторичные структуры молекул ДНК и РНК (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>). Последовательности АСО были нацелены на участки мРНК VP72, не образующие выраженной вторичной структуры. Были подобраны олигонуклеотиды длиной 22–23 нт к трем участкам вирусной мРНК, которые затем были синтезированы в двух вариантах: серия S с тиофосфатными (PS) межнуклеотидными группами и серия D с мезилфосфорамидными (μ) межнуклеотидными группами (см. “Эксперим. часть”). Последовательности и обозначения АСО приведены в табл. 1.

Для улучшения доставки олигонуклеотидов в клетки были использованы аминоконфункционализованные мезопористые наночастицы диоксида кремния (mSiO₂) размером 60–80 нм [17], которые, как мы обнаружили, отличаются относительной устойчивостью к агрегации и меньшей цитотоксичностью для клеток Vero по сравнению с использованными ранее коммерческими аминоконфункционализованными наночастицами SiO₂ размером 20–30 нм (SkySpring Nanomaterials Inc., США) [23, 24]. Мезопористые наночастицы mSiO₂, впервые рассмотренные в работе Vallet-Regi et al. [25], привлекли внимание как средства доставки лекарств из-за высокой химической и термической стабильности, большой площади поверхности, равномерного и настраиваемого размера пор, облегченной функционализации поверхности, низкой токсичности и хорошей биосовместимости [26–30]. Аминоконфункционализованные наночастицы mSiO₂ (mSiO₂-NH₂) часто применялись для контролируемого высвобождения различных лекарственных препаратов: анальгетиков, антибиотиков, противоопухолевых препаратов и др. [31–39]. Функционализация по-

Таблица 1. Последовательности и молекулярные массы антисмысловых олигонуклеотидов

Код	Последовательность, 5'–3'	Молекулярная масса, Да	
		расч. [M – H] ⁻	эксп.* [M – H] ⁻
S054	T ₅ G ₅ C ₅ G ₅ A ₅ G ₅ G ₅ A ₅ A ₅ A ₅ C ₅ G ₅ T ₅ T ₅ T ₅ G ₅ A ₅ A ₅ G ₅ C ₅ T ₅ G	7176.57	7168.80
S055	A ₅ T ₅ A ₅ A ₅ G ₅ A ₅ C ₅ A ₅ A ₅ A ₅ A ₅ A ₅ G ₅ C ₅ T ₅ C ₅ C ₅ T ₅ C ₅ C ₅ T ₅ G ₅ A	7362.78	7371.10
S056	T ₅ T ₅ A ₅ T ₅ C ₅ G ₅ A ₅ T ₅ A ₅ A ₅ G ₅ A ₅ T ₅ T ₅ G ₅ A ₅ T ₅ A ₅ C ₅ C	6420.03	6429.40
D605	T ^μ G ^μ C ^μ G ^μ A ^μ G ^μ G ^μ A ^μ A ^μ A ^μ C ^μ G ^μ T ^μ T ^μ T ^μ G ^μ A ^μ A ^μ G ^μ C ^μ T ^μ G	8458.62	8466.20
D607	T ^μ T ^μ A ^μ T ^μ C ^μ G ^μ A ^μ T ^μ A ^μ A ^μ G ^μ A ^μ T ^μ T ^μ G ^μ A ^μ T ^μ A ^μ C ^μ C	7579.98	7588.70
D608	A ^μ T ^μ A ^μ A ^μ G ^μ A ^μ C ^μ A ^μ A ^μ A ^μ A ^μ A ^μ G ^μ C ^μ T ^μ C ^μ C ^μ T ^μ C ^μ C ^μ T ^μ G ^μ A	8705.88	8711.50

* По данным масс-спектрометрии MALDI-TOF. Обозначения: S – тиофосфатная группа, μ – мезилфосфорамидная группа.

Таблица 2. Изучение способности аминоксидированных мезопористых наночастиц SiO₂ к комплексообразованию с модельным олигонуклеотидом **T403***

Наноконплекс	mSiO ₂ –NH ₂	mSiO ₂ –R2	mSiO ₂ –R3	Au@SiO ₂ –NH ₂ [17]
Силан	APTES	3-(2-Аминоэтиламино)-пропилдиметоксиметилсилан	3-[2-(2-Аминоэтиламино)-этиламино]пропилтриметоксисилан	APTES
Емкость, нмоль	8.65 (52 мкг/мг)	13.10 (79 мкг/мг)	8.42 (51 мкг/мг)	0.90 (5.4 мкг/мг)
Массовое отношение mSiO ₂ /T403*	19.2	12.7	19.7	184
ξ-Потенциал, мВ	–	+23.7 (до комплексообразования +32.3)	–	–

* 17-звенный олиго-2'-O-метилрибонуклеотид: 5'-A^τGUCUCGACUUGCUACC-3'; τ – тозилфосфорамидная группа; M_r 6031.11 [47]. Прочерк – значение не определяли.

верхности аминогруппами в указанных статьях проводилась, как правило, с помощью 3-аминопропилтриэтоксисилана (APTES). В данной работе проводили функционализацию поверхности наночастиц mSiO₂ остатками 1,2-этилендиамина с целью увеличения плотности катионных групп для улучшения электростатического комплексообразования с анионными олигонуклеотидами, несущими модифицированные фосфатные группы: тиофосфатные или мезилфосфорамидные (рис. 1а и 1б соответственно). Для этого наночастицы обрабатывали 3-(2-аминоэтиламино)-пропилдиметоксиметилсиланом в условиях, аналогичных функционализации APTES. Данные наночастицы (mSiO₂–R2) оказались самыми эффективными по связыванию олигонуклеотида в электростатический комплекс. Наночастицы, модифицированные APTES или 3-[2-(2-аминоэтиламино)-этиламино]пропилтриметоксисиланом или содержащие золотое ядро (Au@SiO₂–NH₂) [17], показали меньшую загрузку по олигонуклеотиду в тех же условиях (табл. 2). ξ-Потенциал наноконплекса mSiO₂–R2 с модельным 17-звенным олиго-

нуклеотидом **T403** оставался положительным, однако его величина уменьшалась с +32.3 до +23.7, что согласуется с образованием ионного комплекса (табл. 2). Массовое отношение (mSiO₂–R2/T403) составило 12.7, что почти вдвое выше отношения, полученного в работе Xu et al. [40]. В работе Xu et al. использовали такой же аминсилан и 18-звенный олигонуклеотид, однако наночастицы SiO₂ не были мезопористыми.

Таким образом, в качестве эффективного носителя для доставки олигонуклеотидов для дальнейших экспериментов были выбраны модифицированные этилендиаминовыми группами наночастицы мезопористого диоксида кремния mSiO₂–R2. Полученные наночастицы, имеющие положительный ξ-потенциал при pH 7.0, были использованы для формирования ионных наноконплексов с АСО (табл. 1), биологическая активность которых была исследована далее.

Определение цитотоксичности наноконплексов АСО для клеток Vero с помощью МТТ-теста выявило выраженную цитотоксичность при концентрациях >500 нМ (рис. 2), в то время как сво-

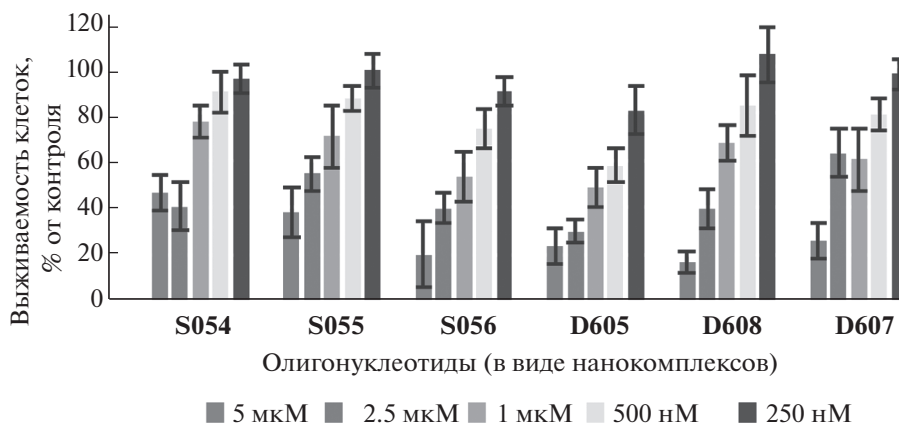


Рис. 2. Цитотоксичность наноконструкций антисмысловых олигонуклеотидов (АСО) для клеток Vero по результатам тестов МТТ. Последовательности АСО представлены в табл. 1.

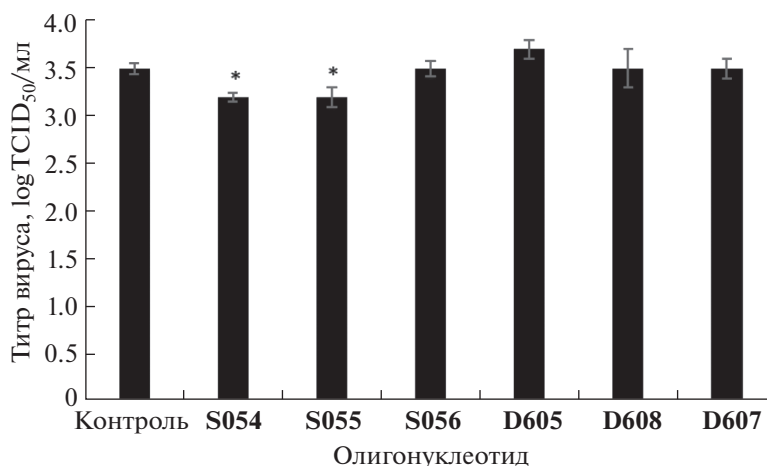


Рис. 3. Титр вируса АЧС (log TCID₅₀/мл) после воздействия наноконструкций АСО через 24 ч после инфицирования клеток Vero вирусом АЧС. Достоверность результатов оценивали с помощью двустороннего *t*-критерия Стьюдента. * $p < 0.05$.

бодные олигонуклеотиды без наночастиц показали меньшую цитотоксичность, что могло быть вызвано тем, что олигонуклеотиды слабее проникали в клетки вне наноконструкций. В последующих экспериментах наноконструкции олигонуклеотидов **S054** и **S055** были использованы в концентрации 500 нМ, а наноконструкции олигонуклеотидов **S056**, **D605**, **D607**, **D608** – в концентрации 250 нМ.

Для изучения противовирусного эффекта клетки Vero инфицировали вирусом АЧС ВА71V, после чего сразу же обрабатывали наноконструкциями указанных олигонуклеотидов. Контрольная группа клеток Vero была обработана АСО в присутствии трансфекционного реагента Липофектамин 3000 (Invitrogen, США), после чего клетки инфицировали вирусом АЧС и определяли противовирусную активность вышеупомянутых олигонуклеотидов вне наноконструкций.

Наноконструкции **S054** и **S055** уменьшали титр вируса на $\sim 0.3 \log \text{TCID}_{50}/\text{мл}$, что эквивалентно $\sim 60\%$ подавления (рис. 3). При применении свободных АСО противовирусная активность была выражена слабее ($< 0.3 \log \text{TCID}_{50}/\text{мл}$), что свидетельствует о том, что олигонуклеотиды в составе наноконструкций лучше проникают в клетку и, как следствие, проявляют более выраженную противовирусную активность.

На следующем этапе исследований было изучено комбинированное влияние наноконструкций олигонуклеотидов на репродукцию вируса АЧС. Для этого инфицированные клетки обрабатывали тремя группами наноконструкций АСО: 1) по 500 нМ **S054** и **S055**; 2) 250 нМ **S054** и 500 нМ **S055**; и 3) 500 нМ **S054** и 250 нМ **S055**. Максимальное падение титра вируса ($\sim 1.0 \log \text{TCID}_{50}/\text{мл}$) было за-

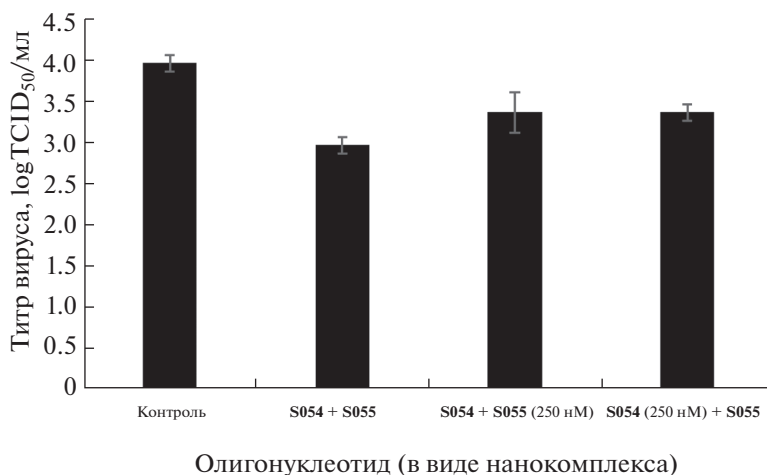


Рис. 4. Изменение титра вируса АЧС (logTCID₅₀/мл) при комбинированном воздействии двух наиболее активных наноконцентраций АСО в различных концентрациях. Достоверность результатов оценивали с помощью двустороннего *t*-критерия Стьюдента. * $p < 0.05$.

фиксируется в случае, когда концентрация обоих наноконцентраций составляла 500 нМ (рис. 4).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и оборудование. Для офВЭЖХ использовали ацетонитрил UHPLC grade Supergradient (Panreac, Испания). Раствор (2 М) ацетата триэтиламония (ТЕАА), рН 7.0, был приготовлен из триэтиламина ACS grade (Panreac, Испания) и ледяной уксусной кислоты (осч, Россия). Дихлоруксусная кислота, иод, 0.25 М раствор 4,5-дицианимидазола (DCI) в безводном ацетонитриле, тетраэтилоортосиликат, 3-(2-аминоэтиламино)пропилдиметоксиметилсилан, красители Stains-All, ксиленцианол FF и бромфеноловый синий (BP) были приобретены у компании Sigma-Aldrich (США); метансульфохлорид, азид натрия и перхлорат натрия – у Acros Organics (США), дихлорметан, тетрагидрофуран, пиридин и триэтиламин – у Panreac (Испания). Формамид, акриламид, *N,N'*-метилен-*bis*-акриламид, мочевины, *трис*(гидроксиметил)-аминометан (Трис), борная кислота, динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (Na₂ЭДТА) были приобретены у компании Диаэм (Россия). Концентрированный водный раствор аммиака (осч), концентрированная HCl (осч), уксусная кислота (осч), ацетон (осч), *n*-гексан и этанол были отечественного производства. Все реактивы были наивысшей степени чистоты, доступной у соответствующих коммерческих поставщиков. Ацетонитрил (UHPLC grade Supergradient, Panreac, Испания) для синтеза олигонуклеотидов кипятили 6 ч над CaH₂ в атмосфере аргона, затем перегоняли в атмосфере аргона и хранили под аргоном над молекулярными ситами 3 Å. Бидистил-

лированную воду подготавливали непосредственно в лаборатории.

Для центрифугирования небольших объемов растворов использовали микроцентрифугу Mini-Spin Plus (Eppendorf, ФРГ). Химические реакции проводили с использованием термешейкера Thermomixer Compact (Eppendorf, ФРГ). Растворы встряхивали с помощью вортекса BioVortex V1 (Biosan, Эстония). Гель-электрофорез проводили с использованием установки для электрофореза (Bio-Rad, США). Небольшие объемы растворов олигонуклеотидов (до 1.5 мл) концентрировали с помощью вакуумного концентратора Savant SpeedVac DNA1200P (Thermo Fisher Scientific, США).

Олигонуклеотиды были получены с помощью автоматического синтезатора ДНК/РНК ASM-800 (ООО “Биосет”, Новосибирск, Россия) согласно протоколу фосфитамидного синтеза в стандартных реакторах объемом 25–50 мкл в масштабе 0.2–0.4 мкмоль из соответствующих β-цианэтил-*N,N*-диизопропилфосфитаминов дезоксирибонуклеозидов и полимерных носителей на основе пористого стекла с размером пор 1000 Å с привитыми дезоксирибонуклеозидами (Sigma-Aldrich, США). Тиофосфатные (PS) олигонуклеотиды [41] синтезировали с использованием 0.05 М раствора 3-((диметиламиноэтилиден)амино)-3*H*-1,2,4-дитиазол-3-тиона (Sulfurizing Reagent II; Glen Research, США) в смеси пиридин–ацетонитрил (1 : 1, v/v). Мезилфосфорамидные (μ) олигонуклеотиды синтезировали по оригинальной методике при помощи реакции Штаудингера на твердой фазе с использованием мезилазида (метансульфонилиазида) [42]. Мезилазид получали *in situ* из метансульфохлорида и азида натрия в ацетонитриле согласно работе Matano et al. [43] и использовали в виде 0.5 М раствора в ацетонитриле (**ОСТОРОЖНО! Мезилазид в**

чистом виде может быть взрывоопасен! [44]). ИК-, ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектры полученного мезилазида были идентичны приведенным в литературе [43].

Для аналитической ВЭЖХ использовали хроматограф Agilent 1220 (Agilent Technologies, США) с УФ-детекцией при длине волны 260 нм, колонкой ZORBAX Eclipse XDB-C18 (5 мкм, 4.6×150 мм; Agilent Technologies, США). Элюцию осуществляли в градиенте ацетонитрила в 20 мМ ТЕАА, pH 7.0, от 0 до 60% за 30 мин и скорости потока 1 мл/мин. Выделение олигонуклеотидов проводили с помощью хроматографа Waters 600E (Waters Corp., США) с УФ-детекцией при длинах волн 190, 260, 280 нм и колонкой ZORBAX Eclipse PrepHT XDB-C18 (7 мкм, 21.2×150 мм; Agilent Technologies, США) в градиенте ацетонитрила в 20 мМ ТЕАА, pH 7.0, от 0 до 60% за 30 мин при скорости потока 21 мл/мин.

PS-олигодезоксирибонуклеотиды получали с 4,4'-диметокситритильной группой (DMTr) на 5'-конце, собирали DMTr-содержащую фракцию, DMTr-группу отщепляли обработкой 80%-ной уксусной кислотой при комнатной температуре в течение 15 мин, осаждали олигонуклеотид 3%-ным NaClO_4 в ацетоне, отделяли осадок центрифугированием, промывали ацетоном, высушивали на воздухе, растворяли в бидистиллированной воде и определяли концентрацию по оптической плотности раствора с помощью УФ-спектрофотометра NanoDrop 2000c (ThermoFisher Scientific, США).

μ -Олигонуклеотиды были синтезированы в режиме без сохранения 5'-DMTr-группы ("DMTr OFF") с выделением с помощью препаративного гель-электрофореза в 20%-ном ПААГ толщиной 2–3 мм в денатурирующих условиях и обессоливанием на колонке NAP-25 с сорбентом Sephadex G-25 (GE Healthcare, Великобритания) в виде натриевой соли. Для контроля качества олигонуклеотидов проводили аналитический электрофорез в 20%-ном ПААГ толщиной 0.4 мм в аналогичных условиях: акриламид – N,N' -метилен-бис-акриламид (30 : 1), 8 М мочевины, 90 мМ Трис-борат, pH 8.3, 2 мМ Na_2EDTA при напряжении 50 В/см. Олигонуклеотиды наносили в растворе, содержащем 8 М мочевины, 0.05% ксиленицианола FF и 0.05% бромфенолового синего. Визуализацию полос проводили окрашиванием геля раствором красителя Stains-All (500 мг/л) в формамиде с последующей отмывкой дистиллированной водой.

Молекулярные массы олигонуклеотидов определяли с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF на приборе Ultraflex III TOF/TOF (Bruker Daltonics, Германия). Масс-спектры олигонуклеотидов получали в линейном режиме отрицательных ионов прибора и в диапазоне m/z от 500 до 16000 Да. Параметры измерения включали также частоту импульсов 25 Гц, ускоряющее напряжение 25.0 кВ и время задержки экстракции ионов

120 нс. Образцы олигонуклеотидов растворяли до концентрации 0.1 мМ в водном буфере, содержащем 20 мМ ТЕАА и 60% ацетонитрила. Объем анализируемого образца составлял 10 мкл. Аликвоту раствора образца объемом 0.7 мкл смешивали на подложке (Ground Steel или AnchorChip) с 0.7 мкл раствора матрицы, приготовленного согласно базовому протоколу производителя (Bruker Daltonics, Германия). Матрицей для ионизации олигонуклеотидов в отрицательном режиме служил 2,6-дигидроксиацетофенон (2,6-DHAP) с добавлением дигидроцитрата аммония. Итоговый масс-спектр получали суммированием 8–20 одиночных спектров по 100 импульсов лазера на точку. Калибровку прибора проводили с использованием калибровочных стандартов (Bruker Daltonics, Германия), а также набора олигодезоксирибонуклеотидов с известными массами. Молекулярные массы олигонуклеотидов рассчитывали, используя наборы экспериментальных значений m/z , определенных для каждого анализируемого образца.

Общая методика получения олигонуклеотидов с мезонуклеотидными мезилфосфорамидными (μ) группами [42]. Олигодезоксирибонуклеотиды синтезировали фосфитамидным методом с использованием автоматического синтезатора ДНК/РНК. Мезилфосфорамидную группу вводили в автоматическом режиме. Для этого после удаления 5'-DMTr-группы привитого к полимерному носителю нуклеозида или олигонуклеотида с помощью 3%-ного раствора дихлоруксусной кислоты в дихлорметане проводили конденсацию соответствующего фосфитамида (0.1 М раствор в безводном ацетонитриле) и экпирование с использованием реагента Fast Deprotection Cap (Sigma-Aldrich, США), после чего осуществляли реакцию Штаудингера на твердой фазе с помощью 0.5 М раствора мезилазида в абсолютном ацетонитриле в течение 30 мин при комнатной температуре. После окончания автоматизированного синтеза олигонуклеотид отщепляли от полимерного носителя и деблокировали концентрированным (~25–30%) водным раствором аммиака (200 мкл на ~5 мг полимера) при 55°C в течение 16 ч. Аммиак упаривали в вакууме досуха с помощью вакуумного концентратора SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, США), добавляли 100 мкл 20 мМ ТЕАА, pH 7.0, отделяли супернатант от полимерного носителя, олигонуклеотид анализировали и выделяли с помощью электрофореза в ПААГ, как описано выше.

Получение ионных наноконплексов олигонуклеотидов с мезопористыми наночастицами диоксида кремния, модифицированными остатками 1,2-этилендиаминна. Синтез исходных мезопористых наночастиц кремнезема mSiO_2 был проведен аналогично описанному в литературе [45]. Применяли следующие условия: 0.25 г бромиды цетилтриметиламмония (СТАВ) растворяли в 35 мл деионизованной воды при перемешивании, добавляли

1.5 мл концентрированного водного аммиака (28–30%), затем по каплям в течение 1 ч при непрерывном перемешивании прибавляли смесь *n*-гексана (5 мл) и тетраэтилортосиликата (1 мл). Температура реакции составляла 35°C. В результате перемешивания в течение 8 ч получали гомогенный белый коллоидный раствор. Осадок собирали центрифугированием и несколько раз промывали деионизованной водой и затем этанолом. Для удаления избытка СТАВ осадок диспергировали в растворе 1 М HCl (4 мл) и этанола (120 мл) и кипятили с обратным холодильником в течение 6 ч.

Для модификации поверхности остатками 1,2-этилендиамина наночастицы $m\text{SiO}_2$ (50 мг) суспендировали в абсолютном этаноле (10 мл), перемешивали 10 мин, прибавляли 20 мкл 3-(2-аминоэтиламино)пропилдиметоксиметилсилана и кипятили с обратным холодильником в течение 6 ч. Затем осадок центрифугировали и несколько раз промывали этанолом. Продукт ресуспендировали в воде. Количество аминогрупп после модификации оценивали пикратным методом [46] по УФ-поглощению пикриновой кислоты в 5% ТЕА в этаноле при 358 нм (ϵ 14500).

Значения гидродинамического диаметра и ξ -потенциала полученных наночастиц определяли на приборе Zetasizer Nano ZS Plus (Malvern, Великобритания) при комнатной температуре и концентрации 0.2 мг/мл в деионизованной воде с использованием кюветы DTS1070 и усредняли по трем измерениям.

Комплексообразование с олигонуклеотидами проводили в водном растворе при pH 7.0, при котором ξ -потенциал $m\text{SiO}_2$ –R2 положителен. Положительно заряженные частицы и отрицательно заряженный олигонуклеотид вступали в электростатическое взаимодействие, в результате чего образовывался ионный комплекс. Реакцию проводили при комнатной температуре с перемешиванием на шейкере. Перед реакцией наночастицы диспергировали в воде с помощью ультразвука в течение 1–2 мин. Время реакции составляло 2 ч. Количество наночастиц рассчитывали так, чтобы соотношение числа аминогрупп $m\text{SiO}_2$ –R2 на одну модифицированную фосфатную группу олигонуклеотида составляло 5 : 1. По окончании реакции наночастицы отделяли центрифугированием и после удаления супернатанта дважды промывали водой. Емкость наноконцентра по олигонуклеотиду определяли по УФ-поглощению при 260 нм содержащегося в супернатанте и промывках не вступившего в комплексообразование олигонуклеотида (ϵ 159200).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мы показали, что антисмысловые олигонуклеотиды, нацеленные на мРНК

основного капсидного белка VP72 вируса африканской чумы свиней, в составе ионных наноконцентра с мезопористыми наночастицами диоксида кремния, модифицированными остатками 1,2-этилендиамина, более эффективно снижают титр вируса АЧС в инфицированных клетках Vero, чем те же олигонуклеотиды, но без наночастиц. Это можно объяснить тем, что наноконцентра более эффективно проникают в клетки по сравнению со свободными олигонуклеотидами (даже в присутствии Липофектамина 3000). Однако максимальное снижение количества вируса ($\sim 1.0 \log \text{TCID}_{50}/\text{мл}$) наблюдалось только при комбинированном использовании двух наиболее эффективных АСО в концентрации 500 нМ. Следует отметить, что антисмысловые олигонуклеотиды, способные снижать репликацию вируса АЧС, до сих пор не были известны из опубликованной литературы. В то же время противовирусная активность исследованных наноконцентра АСО, нацеленных на мРНК VP72, оказалась недостаточной для того, чтобы их можно было считать перспективными кандидатами для борьбы с АЧС. Тем не менее полученные данные могут служить отправной точкой для дальнейших исследований по повышению эффективности противовирусного действия наноконцентра антисмысловых олигонуклеотидов в отношении вируса африканской чумы свиней.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Е.А. Зеленцовой (Центр коллективного пользования “Масс-спектрометрические исследования” Международного томографического центра СО РАН) за регистрацию MALDI-TOF-масс-спектров олигонуклеотидов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-515-05007_Арм_а), а также Министерства образования и науки Российской Федерации (проект Новосибирского государственного университета FSUS-2020-0035).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данная статья не содержит описания выполненных кем-либо из авторов исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.В. Акобян и Е.А. Буракова внесли равный вклад в работу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Costard S., Mur L., Lubroth J., Sanchez-Vizcaino J.M., Pfeiffer D.U.* // *Virus Res.* 2013. V. 173. P. 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.030>
2. *Penrith M.-L., Vosloo W., Jori F., Bastos A.D.* // *Virus Res.* 2013. V. 173. P. 228–246. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.011>
3. *Sánchez-Vizcaino J.M., Mur L., Martínez-López B.* // *Vet. Microbiol.* 2013. V. 165. P. 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.030>
4. *Cisek A.A., Dąbrowska I., Gregorczyk K.P., Wyzewski Z.* // *Ann. Parasitol.* 2016. V. 62. P. 161–167. <https://doi.org/10.17420/ap6203.49>
5. *Gogin A., Gerasimov V., Malogolovkin A., Kolbasov D.* // *Virus Res.* 2013. V. 173. P. 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.007>
6. *Oganesyan A.S., Petrova O.N., Korennoy F.I., Bardina N.S., Gogin A.E., Dudnikov S.A.* // *Virus Res.* 2013. V. 173. P. 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.009>
7. *Gallardo M.C., Reoyo A.T., Fernández-Pinero J., Iglesias I., Muñoz M.J., Arias M.L.* // *Porcine Health Manag.* 2015. V. 1. P. 21. <https://doi.org/10.1186/s40813-015-0013-y>
8. *Zakaryan H., Revilla Y.* // *Vet. Microbiol.* 2016. V. 185. P. 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.01.016>
9. *Stephenson M.L., Zamecnik P.C.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1978. V. 75. P. 285–288. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.1.285>
10. *Uhlmann E., Peyman A.* // *Chem. Rev.* 1990. V. 90. P. 543–584. <https://doi.org/10.1021/cr00102a001>
11. *De Mesmaeker A., Haener R., Martin P., Moser H.E.* // *Acc. Chem. Res.* 1995. V. 28. P. 366–374. <https://doi.org/10.1021/ar00057a002>
12. *Goodchild J.* // *Methods Mol. Biol.* 2011. V. 764. P. 1–15. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-188-8_1
13. *Perry C.M., Balfour J.A.* // *Drugs.* 1999. V. 57. P. 375–380. <https://doi.org/10.2165/00003495-199957030-00010>
14. *Juliano R.L., Ming X., Nakagawa O.* // *Bioconjug. Chem.* 2012. V. 23. P. 147–157. <https://doi.org/10.1021/bc200377d>
15. *Parveen S., Misra R., Sahoo S.K.* // *Nanomedicine.* 2012. V. 8. P. 147–166. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.05.016>
16. Design, Synthesis, Multifunctionalization and Bio-medical Applications of Multifunctional Mesoporous Silica-Based Drug Delivery Nanosystems. / Ed. Chen Y. Springer, 2016.
17. *Ryabchikova E.I., Chelobanov B.P., Parkhomenko R.G., Korchagina K.V., Basova T.V.* // *Micropor. Mesopor. Mater.* 2017. V. 248. P. 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.04.006>
18. *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.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. P. 1229–1234. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813376116>
19. *Crooke S.T.* // *Nucleic Acid Ther.* 2017. V. 27. P. 70–77. <https://doi.org/10.1089/nat.2016.0656>
20. *Wagner A., Bock C.T., Fechner H., Kurreck J.* // *Future Med. Chem.* 2015. V. 7. P. 1637–1642. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.114>
21. *Warren T.K., Shurtleff A.C., Bavari S.* // *Antiviral Res.* 2012. V. 94. P. 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.02.004>
22. *Keita D., Heath L., Albina E.* // *Antivir. Ther.* 2010. V. 15. P. 727–736. <https://doi.org/10.3851/IMP1593>
23. *Vasilyeva S.V., Grin I.R., Chelobanov B.P., Stetsenko D.A.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2018. V. 28. P. 1248–1251. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.02.007>
24. *Vasilyeva S.V., Petrova A.S., Shtil A.A., Stetsenko D.A.* // *J. Saudi Chem. Soc.* 2020. V. 24. P. 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2019.09.007>
25. *Vallet-Regí M., Rámila A., del Real R.P., Pérez-Pariante J.* // *Chem. Mater.* 2001. V. 13. P. 308–311. <https://doi.org/10.1021/cm0011559>
26. *Castillo R.R., Colilla M., Vallet-Regí M.* // *Expert. Opin. Drug Del.* 2017. V. 14. P. 229–243. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1211637>
27. *Song Y., Li Y., Xu Q., Liu Z.* // *Int. J. Nanomedicine.* 2017. V. 12. P. 87–110. <https://doi.org/10.2147/IJN.S117495>
28. *Moreira A.F., Dias D.R., Correia I.J.* // *Micropor. Mesopor. Mater.* 2016. V. 236. P. 141–157. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.08.038>
29. *Xiao X., Liu Y., Guo M., Fei W., Zheng H., Zhang R., Zhang Y., Wei Y., Zheng G., Li F.* // *J. Biomater. Appl.* 2016. V. 31. P. 23–35. <https://doi.org/10.1177/0885328216637211>
30. *Guo Y., Sun J., Bai S., Jin X.* // *J. Biomater. Appl.* 2016. V. 31. P. 411–420. <https://doi.org/10.1177/0885328216653287>
31. *Manzano M., Ainaa V., Areán C.O., Balasa F., Cauda V., Colilla M., Delgado M.R., Vallet-Regí M.* // *Chem. Eng. J.* 2008. V. 137. P. 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.07.078>
32. *Wang J.G., Li F., Zhou H.J., Sun P.C., Ding D.T., Chen T.H.* // *Chem Mater.* 2009. V. 21. P. 612–620. <https://doi.org/10.1021/cm803124a>
33. *Gao C., Zheng H., Xing L., Shu M., Che S.* // *Chem. Mater.* 2010. V. 22. P. 5437–5444. <https://doi.org/10.1021/cm100667u>
34. *Cauda V., Argyo C., Schlossbauer A., Bein T.* // *J. Mater. Chem.* 2010. V. 20. P. 4305–4311. <https://doi.org/10.1039/B918590A>
35. *Szegedi A., Popova M., Goshev I., Mihály J.* // *J. Solid State Chem.* 2011. V. 184. P. 1201–1207. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2011.03.005>
36. *Szegedi A., Popova M., Goshev I., Klébert S., Mihály J.* // *J. Solid State Chem.* 2012. V. 194. P. 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2012.05.030>
37. *Bahrani Z., Badiei A., Atyabi F.* // *Chem. Eng. Res. Des.* 2014. V. 92. P. 1296–1303. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.11.007>

38. *Rehman F., Ahmed K., Airoidi C., Gaisford S., Buanz A., Rahim A., Muhammad N., Volpe P.L.O.* // *Mater. Sci. Eng. C.* 2017. V. 72. P. 34–41.
https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.040
39. *He Y., Luo L., Liang S., Long M., Xu H.* // *J. Biomater. Appl.* 2017. V. 32. P. 524–532.
https://doi.org/10.1177/0885328217724638
40. *Xu P., Wang H., Tong R., Du Q., Zhong W.* // *Colloid Polym. Sci.* 2006. V. 284. P. 755–762.
https://doi.org/10.1007/s00396-005-1428-9
41. *Eckstein F.* // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2009. V. 10. P. 117–121.
https://doi.org/10.1089/oli.1.2000.10.117
42. *Челобанов Б.П., Буракова Е.А., Прохорова Д.В., Фокина А.А., Стеценко Д.А.* // *Биоорг. химия.* 2017. Т. 43. С. 644–649. [*Chelobanov B.P., Burakova E.A., Prokhorova D.V., Fokina A.A., Stetsenko D.A.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. V. 43. P. 664–668.]
https://doi.org/10.1134/S1068162017060024
43. *Matano Y., Ohkubo H., Honsho Y., Saito A., Seki S., Imahori H.* // *Org. Lett.* 2013. V. 15. P. 932–935.
https://doi.org/10.1021/ol4000982
44. *Nikolaev V.A., Chiba J., Tomohiro T., Hatanaka Y.* // *Encyclop. Reag. Org. Synth.* 2015.
https://doi.org/10.1002/047084289X.rm069.pub2
45. *Stöber W., Fink A., Bohn E.* // *J. Colloid Interface Sci.* 1968. V. 26. P. 62–69.
https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5
46. *Atherton E., Sheppard R.C., Ward P.* // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* 1985. V. 10. P. 2065–2073.
https://doi.org/10.1039/P19850002065
47. *Прохорова Д.В., Челобанов Б.П., Буракова Е.А., Фокина А.А., Стеценко Д.А.* // *Биоорг. химия.* 2017. Т. 43. С. 45–50. [*Prokhorova D.V., Chelobanov B.P., Burakova E.A., Fokina A.A., Stetsenko D.A.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. V. 43. P. 38–42.]
https://doi.org/10.1134/S1068162017010071

Antiviral Activity of Nanocomplexes of Antisense Oligonucleotides Targeting the VP72 Protein in Vero Cells Infected with the African Swine Fever Virus

A. V. Hakobyan*, E. A. Burakova, ***, E. A. Arabyan*, A. A. Fokina**, ***, A. R. Kotsinyan*, S. V. Vasilyeva****, O. S. Zakaryan*, and D. A. Stetsenko**, ***, #**

Phone: +7 (383) 363-49-63; e-mail: d.stetsenko@nsu.ru

*Institute of Molecular Biology of the National Academy of Sciences of the Republic of Armenia, ul. Hasratyana 7, Yerevan, 0014 Armenia

**Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia

***Institute of Cytology and Genetics SB RAS, prosp. Akad. Lavrentieva 10, Novosibirsk, 630090 Russia

****Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, prosp. Akad. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

Antiviral activity of antisense oligodeoxyribonucleotides with phosphorothioate or mesyl phosphoramidate internucleotidic groups targeting the main capsid protein VP72 mRNA of the African swine fever virus (ASFV), either in a free form with Lipofectamine 3000 transfection or in the form of ionic complexes with amino-modified mesoporous silicon dioxide nanoparticles, has been evaluated in Vero cells infected with ASFV. Relatively high cytotoxicity of oligonucleotide nanocomplexes for Vero cells at concentrations above 500 nM was detected. Two sequences of antisense oligonucleotides were identified, which reduced the virus titer by an order of magnitude at 500 nM. The antiviral effect of nanocomplexes exceeded that of free oligonucleotides in the presence of Lipofectamine 3000, which indicates a more efficient delivery of nanocomplexes to the cells. Antisense oligonucleotides able to reduce the replication of ASFV were hitherto unknown from the literature. The obtained data can be used as a starting point for further research on the development of oligonucleotide-based antiviral drugs against the African swine fever virus.

Keywords: oligodeoxyribonucleotide, phosphorothioate, mesyl phosphoramidate, mesoporous silicon dioxide nanoparticles, inhibition of translation