

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-208

**СИНТЕЗ КОНФОРМАЦИОННО ЗАМКНУТЫХ ФОСФОРИЛГУАНИДИНОВЫХ
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ АКТИВНОСТИ
В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ГРИППА А**

**SYNTHESIS OF CONFORMATIONALLY LOCKED PHOSPHORYLGUANIDINE OLIGONUCLEOTIDES
AND INVESTIGATION OF THEIR ACTIVITY AGAINST INFLUENZA A VIRUS**

П. К. Ляпин^{1,3}, Е. С. Дюдеева², И. Р. Иматдинов³

¹Новосибирский государственный университет

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

³Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

P. K. Lyapin^{1,3}, E. S. Dyudeeva², I. R. Imatdinov³

¹Novosibirsk State University

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

³State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ lyapin_pk@vector.nsc.ru

Аннотация

Высокая изменчивость вируса гриппа А приводит к появлению новых вариантов, менее восприимчивых к противовирусным препаратам [1]. В связи с этим актуальна разработка новых терапевтических стратегий, в частности перспективна антисмысловая технология. В работе описаны конформационно замкнутые фосфорилгуанидиновые (PG-LNA) олигонуклеотиды — новый тип модифицированных аналогов ДНК, сочетающих повышенное сродство к РНК-мишеням и устойчивость к нуклеазам.

Abstract

The high variability of the influenza A virus leads to the emergence of new variants that are less susceptible to antiviral drugs [1]. In this regard, the development of new therapeutic strategies is relevant, in particular, antisense technology is promising. The paper describes conformationally locked phosphorylguanidine (PG-LNA) oligonucleotides, a new type of modified DNA analogues combining increased affinity for target RNAs and resistance to nucleases.

Грипп — острая респираторная инфекция, вызываемая РНК-содержащими вирусами с выраженной эпидемической и пандемической активностью. Особую опасность представляют зоонозные и зооантропонозные варианты (А/Н5N1, А/Н7N9), способные преодолевать межвидовые барьеры благодаря высокой антигенной изменчивости [2]. В настоящем исследовании с использованием биоинформатических методов подобраны PG-LNA-модифицированные антисмысловые олигонуклеотиды, нацеленные на относительно консервативные регионы сегментов генома вируса гриппа А. Произведен химический синтез олигонуклеотидов, в экспериментах *in vitro* показана их ингибирующая активность в отношении модельного рекомбинантного вируса гриппа А при сохранении пролиферативной активности клеток НЕК293Т.

Материалы и методы

На первом этапе проведен биоинформатический анализ генома прототипного штамма А/PR/8 (H1N1) «дикого типа» с идентификацией консервативных участков и расчетом свободной энергии вторичной структуры РНК, на основании которого подобраны 50 комплементарных антисмысловых олигонуклеотидов. На втором этапе осуществлен синтез нативных и конформационно замкнутых фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов (LNA-гапмеры, PG-гапмеры, PG-LNA гапмерные аналоги и PG-LNA аналоги с равномерным распределением PG-групп), часть из которых исследована в экспериментах *in vitro* на цитотоксическое действие и ингибирующую активность в отношении рекомбинантного генетически маркированного вируса на основе лабораторного штамма *А/PR/8 (H1N1), обеспечивающего экспрессию гена зеленого флуоресцентного белка mNeonGreen при проникновении и репродукции в перmissive клетках. Предварительную оценку цитотоксического действия нативных и модифицированных олигонуклеотидов на клетки линии НЕК293Т проводили методом изучения жизнеспособности и пролиферативной активности клеток, основанным на анализе флуоресцентного сигнала красителя AlamarBlue (метаболическое превращение нетоксичного водорастворимого резазурина во флуоресцентное производное ве-

щество резорурфин) при измерении флуоресценции через 24 и 48 ч после обработки. Исследование ингибирующей активности синтезированных олигонуклеотидов на культуре клеток НЕК293Т осуществляли в ходе анализа подавления экспрессии репортерного гена mNeonGreen и при оценке ингибирования формирования флуоресцирующих бляшек.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования продемонстрировали выраженную, но кратковременную (до 24 ч) ингибирующую активность нативных олигонуклеотидов в отношении вируса гриппа А, что подтверждалось снижением формирования флуоресцирующих бляшек в клеточном монослое. Для преодоления ограничений, связанных с быстрой деградацией немодифицированных соединений, была разработана серия PG-LNA-модифицированных аналогов, которые показали повышенную устойчивость к нуклеазам и сродство к РНК-мишеням благодаря гапмерной архитектуре, обеспечивающей образование стабильных дуплексов с вирусной РНК и последующую потенциальную активацию внутриклеточной РНКазы Н.

Установлена четкая корреляция между степенью модификации и цитотоксичностью: комбинированные PG-LNA аналоги снижали жизнеспособность клеток до 65,1 %, однако не нарушали их последующую пролиферативную активность. При этом PG-LNA гапмерные аналоги эффективно подавляли экспрессию репортерного гена mNeonGreen с практически полным подавлением роста флуоресцентных бляшек.

Полученные результаты указывают на перспективность дальнейшей разработки антисмысловой терапии с применением конформационно замкнутых фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов. Ключевыми направлениями будущих исследований станут подтверждение ингибирующего действия в экспериментах *in vitro* в отношении панели других лабораторных вариантов вируса гриппа А, точное определение цитотоксической (ЦД₅₀) и ингибирующей (ИД₅₀) доз, терапевтического индекса (ТИ), что позволит объективно оценить потенциал и подобрать структуру химически модифицированных олигонуклеотидов для создания прототипных средств специфической терапии на основе антисмысловой технологии.

Литература

1. Hujatullah M., Rabani N. G. Influenza virus genetic diversity and epidemiological profile in human population // Exp. Biol. (1563-0218). 2024. Vol. 101, No. 4.
2. Hui X. et al. A Review of Cross-Species Transmission Mechanisms of Influenza Viruses // Veterinary Sci. 2025. Vol. 12, No. 5. P. 447.