

ГОТФРИД ЛЮДМИЛА ГЕННАДЬЕВНА

**ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИНГИБИТОРЫ РЕПРОДУКЦИИ ВИЧ НА ОСНОВЕ
МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ И ХИМИЧЕСКИ
СИНТЕЗИРОВАННЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

1.5.10 – Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2026

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный руководитель:

Гашникова Наталья Матвеевна, кандидат биологических наук, исполняющая обязанности заведующего отделом ретровирусов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Официальные оппоненты:

Шестопалов Александр Михайлович, доктор биологических наук, профессор, директор Научно-исследовательского института вирусологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный Исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Мадонов Павел Геннадьевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки "Хабаровский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита состоится « 30 » октября 2026 г. в 9-00 на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, тел. (383) 363-47-00.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук,
доцент

Т.Н. Ильичёва

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

По данным UNAIDS на 2025 год во всем мире число людей, живущих с ВИЧ (ЛЖВ), составило почти 40 млн человек. В 2020 г. для борьбы с эпидемией была пересмотрена стратегия «90-90-90» и принята «Новая глобальная стратегия по ВИЧ-инфекции на 2021-2026 г.г.» – «95-95-95» (95% ВИЧ-положительных людей знают свой статус; 95% людей, знающих о своем положительном ВИЧ-статусе, получают лечение, а 95% пациентов на лечении достигают снижения вирусной нагрузки), в которой большое внимание направлено на увеличение охвата лечением ЛЖВ, так как только 30,7 млн человек из всего числа ВИЧ-положительных людей получали антиретровирусную терапию (АРТ).

В настоящее время ВИЧ является одним из хорошо изученных объектов современной вирусологии. Достаточно глубоко исследованы механизмы передачи, жизненный цикл и строение вириона, что позволило создать препараты, направленные на отдельные этапы жизненного цикла вируса и имеющие отличающиеся механизмы взаимодействия с вирусным материалом.

Поскольку антиретровирусные (АРВ) препараты направлены на разные стадии жизненного цикла ВИЧ, их применение в виде комбинаций позволяет эффективно подавлять репродукцию ВИЧ в организме человека до неопределяемого значения. Несмотря на положительные успехи АРТ, терапия не в состоянии полностью избавить организм от вируса, который сохраняется в клетках в латентном состоянии, что требует обязательного пожизненного приема препаратов. Прекращение приема АРТ может привести к быстрому восстановлению вирусной популяции в организме. При продолжительной АРТ возможно появление побочных эффектов, которые снижают приверженность пациентов к терапии, что в комплексе со способностью обратной транскриптазы вируса к формированию мутаций может приводить к образованию и распространению резистентных форм ВИЧ, требующих тщательного подбора препаратов для эффективной терапии инфекции. Антиретровирусные препараты широко используются не только для лечения, но и для профилактики (доконтактной и постконтактной), для предотвращения передачи ВИЧ от матери ребенку при его рождении.

Не всегда теоретические расчеты по эффективности использования современных препаратов реализуются в жизни. Например, по данным ВОЗ о лекарственной устойчивости ВИЧ за 2024 год, в мире регистрируется развитие резистентности ВИЧ-1 к наиболее успешному современному препарату – ингибитору интегразы вируса долутегравиру (DTG) на уровне, превышающем 12-14%, что оказалось выше прогнозируемого более, чем в 3 раза. При этом в ряде стран широкое применение DTG началось лишь после 2021-2022 г.

С 2020 года, начиная с Канады, а затем и в странах Европы и США одобрены к применению в качестве АРТ и профилактики заражения ВИЧ новые препараты на основе каботегавира длительного действия. Предполагалось, что широкое применение таких препаратов позволит быстро достичь целевых показателей по прекращению распространения ВИЧ-инфекции в мире. Однако среди лиц, пользователей PrEP на основе каботегавира длительного действия, также регистрируются случаи сероконверсии, во всех таких случаях у ВИЧ наблюдались мутации, обуславливающие перекрестную устойчивость не только к каботегавиру, но и к долутегравиру.

По данным трех международных исследований вирусологическая неудача при применении инъекционного антиретровирусного препарата длительного действия на основе каботегавира и рилпивирина (CAB/RPV) составила 1,4%. При этом наиболее высоким риском неудачи обладали люди с мутациями устойчивости ВИЧ к RPV - риск вирусологической неудачи терапии был в 25 раз выше, чем с ВИЧ без устойчивости к RPV. Вторым предиктором неудачи были лица, инфицированные субтипом А6 (широко распространен в России и Восточной Европе) или А1 ВИЧ-1 (распространен в странах Восточной Африки), риск вирусологической неудачи лечения которых был в 15 раз выше.

В 2025 году были опубликованы новые данные по перечню мутаций, связанных с резистентностью ВИЧ к препаратам АРТ. В том числе, был расширен список мутаций резистентности к новейшему препарату ленакапавиру, а для каботегавира в перечень мутаций

была добавлена мутация L74I как основная, связанная с развитием резистентности ВИЧ. При этом данная мутация среди российского геноварианта ВИЧ суб-субтипа А6 встречается с крайне высокой частотой, в ряде регионов России более 90% А6 ВИЧ-1 несет данную мутацию.

Несмотря на снижение темпов эпидемии постоянно увеличивается количество лиц, принимающих препараты АРТ, регистрируются случаи неэффективного лечения, повышается частота инфицирования людей ВИЧ, резистентными к широко применяемым в клинической практике лекарствам. Ограничения возможности использования современных препаратов заслуживают пристального внимания в контексте повышения качества и эффективности пожизненной АРТ.

Изложенные факты указывают на то, что, несмотря на наличие в портфеле клиницистов успешных современных препаратов для терапии ВИЧ-инфекции, поиск и углубленное исследование новых лекарственных средств являются актуальными вне всяких сомнений.

Цель работы. Изучить способность модифицированных ген-направленных олигонуклеотидов и химически синтезированных соединений блокировать репродукцию ВИЧ-1 и исследовать интернализацию перспективных ингибиторов вируса.

Задачи исследования

1. Выбрать мишени в геноме ВИЧ-1 для воздействия олигонуклеотидов с целью подавления репродукции вируса
2. Провести поэтапную оценку противовирусной активности последовательно модифицированных олигонуклеотидов с целью поиска оптимальных показателей их противовирусного действия с использованием лабораторных и первичных культур клеток человека, инфицированных высокопродуктивным штаммом ВИЧ-1
3. Для олигонуклеотидов с наилучшими результатами антиретровирусной активности изучить проникновение в клетку и клеточную интернализацию для лимфоидных клеток человека, используя методы конфокальной микроскопии и проточной цитометрии с визуализацией
4. Исследовать различные группы природных и химически синтезированных соединений и их компонентов на их способность ингибировать репродукцию ВИЧ-1 в экспериментах *in vitro*.

Научная новизна

1. Для исследования способности модифицированных антисмысловых олигонуклеотидов ингибировать репродукцию ВИЧ-1 в качестве мишени были выбраны высоко консервативные участки генома вируса, ранее не рассматриваемые для олигонуклеотид-направленного воздействия.
2. Впервые исследована антиретровирусная активность LNA-олигонуклеотидов, несущих модификацию на различных областях остова, в отношении ВИЧ-1 и выявлены различия в способности олигонуклеотидов блокировать ВИЧ-1 в зависимости от введения LNA-модификации по 3'или 5' концу.
3. Впервые продемонстрировано усиление противовирусной эффективности модифицированных ген-направленных олигонуклеотидов при использовании комбинаций олигонуклеотидов с учетом разнонаправленности их мишеней.
4. Впервые использованная комбинация методов микроскопии и проточной цитометрии с визуализацией доказала высокую эффективность проникновения модификаций LNA/фосфотиоат-олигонуклеотидов в клетку и их равномерное распределение в цитоплазме лимфоидных клеток, что является критическим для разработки на их основе перспективных средств терапии.
5. Впервые исследована и продемонстрирована антиретровирусная активность производного 2,4,5-тризамещенного пиримидина – препарата нового типа диарилпиримидинов, перспективного в качестве разработки ненуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ-1 (ВВ 0284050).
6. Продемонстрирована анти-ВИЧ эффективность нового перспективного ингибитора проникновения ВВ 0274001 на модели лимфоидных клеток человека, инфицированных высоко репродуктивным штаммом ВИЧ-1. Изучение производных с различными химическими модификациями структурного типа не подтвердили теоретические предположения об увеличении противовирусной активности направленно модифицированных соединений.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты исследования расширяют представления о способности модифицированных олигонуклеотидов, направленных на высоко консервативные участки генома ВИЧ-1, подавлять репродукцию вируса на модели, максимально приближенной к реальному процессу инфекции. Оценка противовирусной активности модифицированных олигонуклеотидов показала наличие специфического подавления репликации ВИЧ-1 и выявила различия в показателях 50%-й эффективной концентрации (IC_{50}) для олигонуклеотидов в зависимости от выбранной мишени в геноме ВИЧ-1 и химической модификации остова. Проведенные исследования методом микроскопии показали, что внедрение трех остатков додецила в состав фосфотиоатных олигонуклеотидов позволяют им проникать в ядро клетки, что может быть использовано при разработке новых подходов лечения не только вирусных, но и генетических заболеваний.

Использование комбинации современных методов микроскопии и проточной цитометрии с визуализацией позволило получить новые данные о клеточной интернализации олигонуклеотидов, несущих различные химические модификации. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования олигонуклеотидов для разработки средств генной терапии и профилактики ВИЧ-инфекции.

В процессе исследования получены данные об отсутствии противовирусной активности у соединений, сочетающих в себе природный терпеновый блок и азотсодержащий гетероцикл, соединенные между собой различными линкерами, а также изоалантолактонов, тиосемикарбазонов и бициклических кетонов в отношении ВИЧ-1. Проведенная оценка 50%-го цитотоксического действия (CC_{50}) для данных соединений может быть полезна для дальнейшего поиска препаратов на их основе для лечения или профилактики других инфекционных заболеваний.

Получены данные по отсутствию противовирусной активности в отношении ВИЧ-1 у соединений производных цис-аннелированного пирролидина с различными химическими модификациями, которые вносили конформационные изменения в структуры молекул в соответствии с теоретически прогнозируемым улучшением их противовирусных свойств. Данные соединения потенциально относились к классу ингибиторов проникновения и ранее не были исследованы на модели живого вируса *in vitro*.

Проведенное исследование химических соединений выявило наличие способности ингибировать репродукцию ВИЧ-1 для производного 2,4,5-тризамещенного пиримидина ($SI=440,1$). Данное соединение теоретически разработано как новый нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы ВИЧ-1 (ННИОТ) и относится к новым типам диарилпиримидинов.

Для исследования антиретровирусной активности использована разработанная модель на основе российского штамма суб-субтипа А6 ВИЧ-1, обладающего высокими репродуктивными и цитопатическими свойствами, что позволяет проводить скрининг препаратов на анти-ВИЧ активность, используя параллельно два метода – МТТ (по оценке сохранения жизнеспособности клеток, более быстрого и экономически выгодного) и ИФА (позволяющего выполнить количественную оценку изменения концентрации вирусного белка p24 в исследуемых пробах).

Методология и методы исследования

В ходе выполнения диссертационной работы для достижения цели и решения поставленных задач были применены современные вирусологические подходы. Для исследования свойств модифицированных олигонуклеотидов и химически синтезированных соединений в работе были использованы: иммуноферментный анализ (ИФА) для оценки противовирусной активности; МТТ-тест для определения цитотоксичности и оценки противовирусной активности; конфокальная микроскопия и проточная цитометрия с визуализацией для изучения клеточной интернализации.

Положения выносимые на защиту

1. Консервативные области в генах gag, pol и области Pbs ВИЧ-1 могут являться мишенями для ген направленного воздействия олигонуклеотидов
2. Оценка способности модифицированных олигонуклеотидов ингибировать репродукцию ВИЧ-1 на культуре лимфоидных клеток человека МТ-4 показала, что не только тип модификации

остова, но и место внедрения модификации влияет на реализацию антиретровирусной активности олигонуклеотидов.

3. Продемонстрировано усиление противовирусной эффективности модифицированных ген-направленных олигонуклеотидов при использовании комбинаций модифицированных олигонуклеотидов с учетом разнонаправленности их мишеней.

4. Введение тиофосфатных и LNA-тиофосфатных модификаций позволяет олигонуклеотидам проникать внутрь лимфоидных клеток человека МТ-4 без использования трансфецирующих агентов и иной стимуляции, распределяться и длительно сохраняться в клетке, что является необходимым условием для дальнейшей разработки антиретровирусных конструкций на основе модифицированных олигонуклеотидов.

5. Производные 2,4,5-тризамещенного пиримидина могут быть использованы в дальнейших исследованиях для создания нового анти-ВИЧ препарата – нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы вируса.

Соответствие паспорту научной специальности

Диссертация отвечает требованиям, предъявляемым к научной специальности 1.5.10 «Вирусология» (биологические науки). Её содержание соответствует пунктам 10 и 11 паспорта специальности.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов по антиретровирусной активности, цитотоксичности и клеточной интернализации обусловлена использованием современных молекулярно-биологических, биоинформатических и статистических методов исследования.

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на 2 международных и 2 всероссийских конференциях различного уровня: Международной конференции «2022 International Conference on Biotechnology and Bioengineering (12th ICBB)», в онлайн-формате (г.Познано, Италия, сентябрь, 2022); Конгресс с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность - 2023» (Москва, апрель, 2023); X Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания»-2023 (Сочи, ноябрь, 2023); XI Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания»-2024 (Сочи, ноябрь, 2024).

Декларация личного участия автора

Культивирование клеточных линий, наработка и оценка вирусного материала, планирование и постановка экспериментов по исследованию антиретровирусной активности и цитотоксичности проводились автором лично. Проведение иммуноферментного анализа и МТТ-тестов, а также обработка полученных результатов проводилась совместно с сотрудником отдела микроскопических исследований М.П. Гашниковой. Подготовка проб для исследования клеточной интернализации проводилась автором лично. Исследование методом конфокальной микроскопии и проточной цитометрии с визуализацией и статистический анализ проводилась совместно с младшим научным сотрудником отдела ретровирусов К.А. Елфимовым.

Основные разделы диссертационной работы (обзора литературы, материалы и методы, выводы и заключение) были подготовлены лично автором. Публикации по теме диссертации были подготовлены самостоятельно или при непосредственном участии автора.

Работа осуществлялась под руководством заведующей отделом ретровирусов, к.б.н. Н.М. Гашниковой. Работа была выполнена в 2021-2025 гг.

Публикации

По результатам диссертации опубликовано 16 публикаций: в том числе 5 статей в журналах, индексируемых в базах РИНЦ, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для защиты диссертаций, 11 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях.

Объем и структура диссертации

Объём диссертации составляет 156 страниц машинописного текста. Она включает в себя следующие разделы: введение; обзор литературы; материалы и методы исследования; результаты

собственных исследований; заключение; выводы; список сокращений и условных обозначений; список литературы, включающий 187 источника, из которых 13 — на русском языке, а 164 — на иностранных. В работе также представлены 56 иллюстрации и 13 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследования

В работе использовалась иммортализованная клеточная культура МТ-4, клетки которой являются Т-лимфоцитами человека. Для оценки противовирусной активности был использован высокопродуктивный штамм ВИЧ-1 суб-субтипа А6.

Исследование противовирусной активности методом иммуноферментного анализа (ИФА)

Серии разведений препаратов (в трех независимых повторах) переносили на 96-ти луночный планшет, предварительно засеянный клетками. Культуру клеток с внесенными препаратами инфицировали постоянной дозой вируса, соответствующей 300 TCID₅₀. Инкубация с вирусом составляла 5 суток в CO₂ инкубаторе при температуре 37 °C и 5% CO₂. В конце инкубации вируса отбирались пробы культуральной среды для количественного определения белка р24 методом иммуноферментного анализа с помощью набора ВИЧ-1 р24-антиген-ИФА-БЕСТ (Вектор-Бест, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. В качестве положительных контролей использованы субстанции фармакологических препаратов ралтегравир и эфавиренз. Данные собирали для трех независимых постановок. Приведенные в работе значения представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение. Учёт и обработку полученных результатов проводили с помощью программы SoftMaxPro 4,0.

Исследование цитотоксичности МТТ-методом

Определение цитотоксичности исследуемых препаратов методом МТТ-теста проводили в 96-луночном планшете. Отдельно проводили титрование препаратов в трех биологических повторах, которые добавляли в соответствующие лунки планшета с культурой клеток. Инкубирование клеток МТ-4 с исследуемыми разведениями препаратов проводили 5 суток в CO₂ инкубаторе при температуре 37 °C и 5% CO₂. После этого в каждую лунку с образцами и в контроль клеток добавляли раствор МТТ-реагента. Через 2 часа дополнительного инкубирования в термостате из лунок планшета удаляли культуральную среду, а образовавшийся осадок формазана растворяли в изопропанол-е при встряхивании в течение 30 минут. После растворения кристаллов в изопропанол-е интенсивность синего окрашивания измеряли с помощью спектрофотометра (Varioskan LUX, ThermoFisherScientific, Finland) на двух длинах волн (540 и 690 нм). Жизнеспособность клеток оценивали по интенсивности превращения ими растворимого МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид) в кристаллы формазана. Учёт и обработку полученных результатов проводили с помощью специальной программы SoftMax Pro 4,0.

Исследование антиретровирусной активности МТТ-методом

Определение антиретровирусной активности исследуемых препаратов методом МТТ-теста проводили в 96-луночном планшете. Отдельно проводили титрование препаратов в трех биологических повторах, которые добавляли в соответствующие лунки планшета с культурой клеток и проводили инфицирование постоянной дозой вируса, соответствующей 300 TCID₅₀. Экспозиция с вирусом составляла 5 суток в CO₂ инкубаторе при температуре 37 °C и 5 % CO₂. На 5-е сутки в каждую лунку добавляли раствор МТТ-реагента. Через 2 часа дополнительного инкубирования в CO₂-инкубаторе из лунок планшета удаляли культуральную среду, а образовавшийся осадок формазана растворяли в изопропаноловом буферном растворе при встряхивании в течение 20 минут. Интенсивность полученного синего окрашивания раствора измеряли с помощью Varioskan LUX (ThermoFisherScientific, Finland) на двух длинах волн (540 и 690 нм). Учёт и обработку полученных результатов проводили с помощью специальной программы SoftMax Pro 4,0.

Проточная цитометрия с визуализацией

Клетки МТ-4 с олигонуклеотидами инкубировались 1, 4, 12, 24, 36 и 48 часов. Для оценки способности олигонуклеотидов проникать внутрь клеток был использован метод проточной цитометрии с визуализацией на платформе Amnis FlowSight (Cytex® Biosciences, США). Перед

проведением анализа отбирался 1×10^6 клеток. Клеточную суспензию трижды отмывали центрифугированием ($300 \times g$, 5 мин, $4^\circ C$) в 1 мл $1 \times DPBS$ (Gibco, США) для удаления остатков питательной среды и несвязавшихся олигонуклеотидов. После финальной отмывки клетки ресуспендировали в 100 мкл $1 \times DPBS$ (Gibco, США). За 5 минут до анализа к суспензии добавляли 5 мкл раствора пропидия йодида (PI; 0,1 мг/мл; Lumiprobe, США) для дифференциации жизнеспособных (PI⁻) и некротических (PI⁺) клеток. Для возбуждения флуоресцентной метки – остатка красителя 6-карбоксифлуоресцеина (FAM), конъюгированной с олигонуклеотидами, витального красителя PI и светлопольного изображения использовался лазер с длиной волны 488 нм и мощностью в 60 mW (светофильтры 532/55, 610/30 и 457/45 соответственно). Изображения были получены при общем увеличении в 20 раз (числовая апертура объектива = 0,6) и размере пикселя 1×1 мкм.

Конфокальная микроскопия

Клетки MT-4 с олигонуклеотидами инкубировались 4 часа. Для контрастирования цитоплазматической мембраны клетки окрашивались антителами к поверхностному рецептору CD4. Антитела были конъюгированы с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 700 (экстинкция/эмиссия: 696/719; клон RM4-5, Thermo Fisher Scientific, США). Перед микроскопией клетки, с добавленными FAM-олигонуклеотидами и антителами к CD4 с AF700, фиксировали в 2 % растворе формалина (Биовитрум, Российская Федерация) в $1 \times PBS$. Фиксация составляла 15 минут при комнатной температуре, затем клетки центрифугировали, супернатант удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в $1 \times PBS$ для достижения концентрации $1 \times 10^6/100$ мкл. После фиксации 50 мкл клеток капали на предметное стекло (Superfrost™ Plus Microscope Slides, Thermo Fischer Scientific, США). К 50 мкл суспензии добавляли 5 мкл монтажной среды с красителем DAPI (Abcam, Великобритания). Для возбуждения флуоресценции DAPI использовали лазер с длиной волны 405 нм, FAM – 488 нм, фазовый контраст с светлопольным изображением – 640 нм. Постобработка фотографий, которая включала наложение масштабной сетки и повышение контраста изображения, проводили в программном обеспечении Fiji (Johannes Schindelin et al., 2022).

Статистический анализ

Для указания 50% ингибирующей концентрации (IC₅₀) и 50% цитотоксической концентрации (CC₅₀) использовали указание среднего значения со стандартным отклонением между тремя биологическими повторами. Для описательной статистики данных проточной цитометрии нормальность распределения была проверена тестом Шапиро-Уилка. Гомогенность дисперсии определялась тестом Левена. Для описания количественных данных (большая часть параметров) использовалось среднее значение с указанием стандартного отклонения, для описания качественных параметров (% жизнеспособных клеток) – медианное значение с указанием 95% доверительного интервала (95% ДИ). Значимость различий в группах сравнения была определена с помощью ANOVA с указанием критерия Фишера (F-критерий). Для оценки различий между отдельными модификациями олигонуклеотидов использовался однофакторный дисперсионный анализ, за которым следовали попарные сравнения с использованием критерия Тьюки с поправкой на множественные сравнения (Tukey HSD). Величина эффекта оценивалась с помощью омега-квадрат (ω^2), отражающей долю изменчивости признака, объясняемую различиями между модификациями. Для оценки влияния времени инкубации на изучаемые признаки в рамках каждой модификации применялся дисперсионный анализ с повторными измерениями. Для попарного сравнения временных точек использовались парные t-тесты (с поправкой Бенджамина-Хохберга на множественные сравнения). Эффект времени оценивался с помощью показателя - обобщенный эта-квадрат ($\eta^2 G$), который отражает долю изменчивости признака, обусловленную фактором времени с учётом внутригрупповой и межиндивидуальной вариации между репликами. При использовании всех критериев сравнения значимым считали р-значение $< 0,05$. Статистический анализ проводился с помощью языка программирования R (v. 4.3.0, R Development Core Team, 2012; Вена, Австрия). Визуализация данных проводилась в ПО GraphPad Prism version 10.0.0 (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выбор мишени и химической модификации олигонуклеотидов

Проведя анализ нуклеотидных последовательностей и отобрав референсные последовательности основных субтипов ВИЧ-1 и рекомбинантных форм, распространенных в России и странах СНГ, с помощью специализированной базы данных “Los Alamos HIV Sequence Database” (<http://www.hiv.lanl.gov/>), изучив изменчивость нуклеотидной последовательности генома ВИЧ-1 и функциональной значимости областей генома, были выбраны мишени для олигонуклеотид-направленного блокирования репродукции ВИЧ-1, расположенные в генах *pol* (фрагменты областей, кодирующих интегразу и обратную транскриптазу вируса), *gag* ВИЧ-1 и в области праймер-связывающего сайта (PbS) (Рисунке 1).

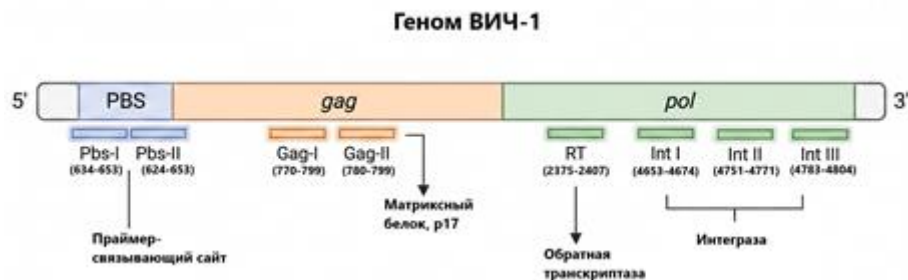


Рисунок 1 - Геном ВИЧ-1 с указанием мест связывания выбранных целевых олигонуклеотидов Int I, Int II, Int III, Pbs1, Pbs2, Gag1, Gag2, R со своими мишенями.

Выбранные для исследования в качестве мишеней базовые структуры, блокирующих PBS-сайт олигонуклеотидов для последующих химических модификаций, составляют весь сайт Pbs с двумя дополнительными нуклеотидами на 5'-конце и располагаются с 634 по 653 нуклеотиды (Pbs-I) и с 624 по 653 нуклеотиды (Pbs-II).

Предлагаемая структура олигонуклеотидов:

1. GTCCSTGTTTCGGGCGCCACT;
2. GTCCSTGTTTCGGGCGCCACTGCTAGAGATT.

Для воздействия на область гена *gag* ВИЧ-1 были выбраны базовые структуры олигонуклеотидов, блокирующих участок, отвечающий за матриксный белок (МА, p17) и располагающиеся с 780 по 799 нуклеотиды (Gag-I) и с 770 по 799 нуклеотиды (Gag-II).

Предлагаемая структура олигонуклеотидов:

1. Gag-I – TCGCACCCATCTCTCTCCTT;
2. Gag-II – TCGCACCCATCTCTCTCCTTCTAGCCTCCG.

В гене *pol* располагаются области, кодирующие ферменты ВИЧ-1 – интегразу и обратную транскриптазу. В области, кодирующей интегразу вируса, было выбрано три последовательности: IntI- IntIII.

Предлагаемая структура олигонуклеотидов:

1. IntI – 5'-ССААТССССССТТТТСТТТТАА-3' (с 4751 по 4771 нуклеотид, область сРРТ, которая кодирует сРРТ-праймер, участвующий в синтезе (+)цепи ДНК провируса)
2. IntII – 5'-ААТАСТГССАТТТГТАСТГСТ-3' (с 4783 по 4804 нуклеотид)
3. IntIII – 5'-СТТГАСТТТГГГГАТТГТАГГГ-3' (с 4653 по 4674 нуклеотид)

В области гена *pol* ВИЧ-1 находится участок, кодирующий фермент обратная транскриптаза. Для воздействия на данную область выбрана базовая структура олигонуклеотида с 2375 по 2407 нуклеотид (R). Предлагаемая структура олигонуклеотида:

1. ССТССААТССССССТАТСАТТТТТГГТТТССАТ.

Антиретровирусная активность и цитотоксичность модифицированных олигонуклеотидов

Поскольку известно, что не модифицированные олигодезоксирибонуклеотиды самостоятельно не способны эффективно проникать в клетку, первоочередной задачей работы был выбор оптимальной модификации олигонуклеотида, позволяющей реализовать их доставку в клетки человека.

Первым этапом была проверка возможности проникновения в трудно трансфецируемые лимфоидные клетки человека модельных не специфичных (random) дезоксиолигонуклеотидов, содержащих одну, две или три молекулы додецильных остатка ([Dcyl]). Исследование эффективности проникновения модифицированных дезоксиолигонуклеотидов (ДОН) в различные линии клеток выявило прямую зависимость накопления олигонуклеотидов внутри клеток от количества введенных в них додецильных остатков и показало, что наиболее активно проникали олигонуклеотиды, в составе которых содержались три молекулы остатков додецила.

Эксперименты по изучению возможности применения дезоксиолигонуклеотидов, содержащих три молекулы додецильных остатка, в качестве [Dcyl]-«доставщика» в клетку целевого олигонуклеотида, комплементарного «доставщику», также продемонстрировали высокую проникающую способность для целевых дезоксиолигонуклеотидов.

На следующем этапе были синтезированы и исследованы олигодезоксирибонуклеотиды, направленные на участки генома ВИЧ-1, кодирующие интегразу вируса, под номерами Int I, Int II, Int III (Таблица 1). В качестве средств доставки данных олигонуклеотидов внутрь клеток использовали частично комплементарные им короткие 13-звенные олигонуклеотиды-доставщики, содержащие три додецильных остатка ([Dcyl]) в своей структуре: ТдI, ТдII, ТдIII (Таблица 1). Для олигонуклеотидов Int I, Int II, Int III была определена 50% ингибирующая концентрация (IC₅₀), в отношении ВИЧ-1 суб-субтипа А6 через 5 суток после инфицирования клеток человека МТ-4 в дозе составляющей 300 TCID.

Таблица 1 – Последовательности исследованных олигонуклеотидов и данные по определенной для олигонуклеотидов 50% ингибирующей концентрации (IC₅₀) в отношении ВИЧ-1 суб-субтипа А6 через 5 суток после инфицирования клеток человека МТ-4

Обозначение олигонуклеотида	Последовательность 5'-3'	IC ₅₀ , мкМ
Олигонуклеотиды, направленные на участки генома ВИЧ-1 в области, кодирующей вирусный фермент интегразу:		
Int I	CCAATCCCCCCTTTTCTTTTAA-NH ₂	5,30±0,11
Int II	AATACTGCCATTTGTACTGCT-NH ₂	5,60±0,15
Int III	CTTGACTTTGGGGATTGTAGGG-NH ₂	2,20±0,11
Олигонуклеотиды для доставки Int I, Int II, Int III в клетки:		
ТдI	T-[Dcyl] [Dcyl] [Dcyl]-TAAAAGAAAAGGG	н/в
ТдII	T-[Dcyl] [Dcyl] [Dcyl]-AGCAGTACAAATG	н/в
ТдIII	T-[Dcyl] [Dcyl] [Dcyl]-CTACAATCCCCAA	н/в

Технические повторы эксперимента показали, что наилучшее значение IC₅₀ продемонстрировал олигонуклеотид Int III, поэтому данный олигонуклеотид был отобран для сравнительного изучения влияния модификаций его остова на проявление противовирусной активности (Таблица 2). Исследование противовирусной активности олигонуклеотидов проводили на суспензионной культуре клеток МТ-4 в отношении штамма ВИЧ-1 суб-субтипа А6, аналогично предыдущему эксперименту.

Таблица 2 – Химические модификации олигонуклеотида Int III, исследованные в работе, и определенная для них 50% ингибирующая концентрация (IC₅₀) в отношении ВИЧ-1 суб-субтипа А6 через 5 суток после инфицирования клеток человека МТ-4

Обозначение олигонуклеотида (модификация)	Последовательность 5'-3'	IC ₅₀ , мкМ
Int III(О)*(3'-фосфорилгуанидин)	CTTGACTTTGGGGATTGTAG ^X G ^X G	1,90±0,04

Int III(XOX)*(5'-3'фосфорилгуанидин)	$C^X T^X T^X G^X A^X C^X T^X T T G G G G A T T^X G^X T^X A^X G^X G^X G$	7,10±0,20
Int III(X)* (фосфорилгуанидин)	$T T C^X T^X T^X G^X A^X C^X T^X T^X T^X G^X G^X G^X G^X A^X T^X T^X G^X T^X A^X G^X G^X G$	7,80±0,16
Int III(S)* (тиофосфат)	$C^S T^S T^S G^S A^S C^S T^S T^S T^S G^S G^S G^S G^S A^S T^S T^S G^S T^S A^S G^S G^S G^S G$	0,09±0,01
Int III(OMe)* (О-метил+3'-фосфорилгуанидин)	$C U U G A C U U U G G G G A U U G U A G^X G^X G$	4,00±0,12

^X – фосфорилгуанидиновая модификация; ^S – тиофосфатная модификация;

Данные, полученные в ходе изучения противовирусной активности олигонуклеотида Int III показали, что активность подавления репродукции вируса для олигонуклеотида в фосфотиоатной модификации (Int III(S)) является наиболее перспективной для дальнейших исследований.

На следующем этапе были синтезированы олигонуклеотиды, направленные на область, кодирующую обратную транскриптазу ВИЧ-1: олигодезоксирибонуклеотиды R и RS (Таблица 3). В олигодезоксирибонуклеотид R на 3'-конец были введены две фосфорилгуанидиновые модификации для защиты от нуклеаз, а на 5'-конец были присоединены три додецильных остатка для улучшения проникновения в клетки. Олигонуклеотид RS является синтезированным PS-аналогом олигонуклеотида R.

Дополнительно были синтезированы олигонуклеотиды, последовательность которых была направлена на консервативные участки генома ВИЧ-1 в области праймер-связывающего сайта (Pbs) и гена *gag* (Таблица 3). Для модификации данных олигонуклеотидов была выбрана тиофосфатная модификация. Для всех синтезированных олигонуклеотидов было проведено исследование противовирусной активности и определение 50% концентрации (IC₅₀), ингибирующей репродукцию ВИЧ-1 (Таблица 3).

Таблица 3 – Последовательности модифицированных олигонуклеотидов, исследованных в работе, и определенная для них 50% ингибирующая концентрация (IC₅₀) в отношении ВИЧ-1 суб-субтипа А6 через 5 суток после инфицирования клеток человека МТ-4

Обозначение олигонуклеотида	Последовательность 5'-3'	IC ₅₀ , мкМ
Олигонуклеотиды, направленные на участок генома ВИЧ-1 в области, кодирующей фермент обратную транскриптазу:		
R	$T[Dcyl][Dcyl][Dcyl]CCTCCAATTCCCCCTATCATTTTTGGTTCC^X A^X T$	0,29±0,01
RS	$C^S C^S T^S C^S C^S A^S A^S T^S T^S C^S C^S C^S C^S C^S T^S A^S T^S C^S A^S T^S T^S T^S T^S TSG^S G^S T^S T^S T^S C^S C^S A^S T$	0,10±0,04
Олигонуклеотиды, направленные на участки генома ВИЧ-1 в области праймер-связывающего сайта и гена <i>gag</i> :		
PbS-I	$G^S T^S C^S C^S C^S T^S G^S T^S T^S C^S G^S G^S G^S C^S G^S C^S C^S A^S C^S T$	0,45±0,05
PbS-II	$G^S T^S C^S C^S C^S T^S G^S T^S T^S C^S G^S G^S G^S C^S G^S C^S C^S A^S C^S T^S G^S C^S T^S A^S G^S A^S G^S A^S T^S T$	0,09±0,01
Gag-I	$T^S C^S G^S C^S A^S C^S C^S C^S A^S T^S C^S T^S C^S T^S C^S T^S C^S C^S T^S T$	0,15±0,02
Gag-II	$T^S C^S G^S C^S A^S C^S C^S C^S A^S T^S C^S T^S C^S T^S C^S T^S C^S C^S T^S T^S C^S T^S A^S G^S C^S C^S T^S C^S C^S G$	0,043±0,01

[Dcyl] – ненуклеотидное додецил-содержащее звено; NH₂ - гексаметиленовый линкер; x – фосфорилгуанидиновая модификация; s – тиофосфатная модификация

Наилучшие показатели IC_{50} были получены для тиофосфатных олигонуклеотидов R(S) и удлиненных вариантов тиофосфатных олигонуклеотидов Gag-2 и PbS-II: $0,10 \pm 0,04$, $0,09 \pm 0,01$ мкМ и $0,043 \pm 0,01$ мкМ соответственно.

Следующим шагом было изучение влияния на противовирусную активность введения LNA-модификации олигонуклеотидов. Для LNA-модификации были отобраны олигонуклеотиды, показавшие наилучшую способность подавления репродукции вируса (Int III, PbS-I, Gag-I). Была исследована способность блокирования ВИЧ для олигонуклеотидов с введенной LNA-модификацией на 3'-конце и/или 5'-конце нуклеотидной последовательности. В качестве контроля были использованы PS-олигонуклеотиды, аналогичные целевым, не имеющие в своем составе LNA-модификацию. Структура олигонуклеотидных производных приведена в Таблице 4. Исследование противовирусной активности олигонуклеотидов проводили на суспензионной культуре клеток MT-4 аналогично предыдущим этапам (Таблица 4).

Таблица 4 – Последовательности модифицированных олигонуклеотидов, исследованных в работе, и их 50% ингибирующая концентрация (IC_{50}) в отношении ВИЧ-1 суб-субтипа A6 через 5 суток после инфицирования клеток человека MT-4.

Обозначение олигонуклеотида	Последовательность 5'-3'	IC_{50} , мкМ
Олигонуклеотиды, направленные на участок генома ВИЧ-1 в области праймер-связывающего сайта:		
PbS-I	$G^S T^S C^S C^S C^S T^S G^S T^S T^S C^S G^S G^S G^S C^S G^S C^S C^S A^S C^S T$	$0,45 \pm 0,04$
PbS-I_3'-LNA	$G^S T^S C^S C^S C^S T^S G^S T^S T^S C^S G^S G^S G^S C^S G^L C^L C^L A^L C^L T$	$3,27 \pm 0,14$
PbS-I_5'-LNA	$L^L G^L T^L C^L C^L C^L T^L G^L T^L T^L C^L G^L G^L G^L C^L G^L C^L C^L A^L C^L T$	$3,37 \pm 0,14$
PbS-I_5'/3'-LNA	$L^L G^L T^L C^L C^L C^L T^L G^L T^L T^L C^L G^L G^L G^L C^L G^L C^L C^L A^L C^L T$	$13,98 \pm 0,93$
Олигонуклеотиды, направленные на участок, кодирующий интегразу ВИЧ-1:		
Int III	$C^S T^S T^S G^S A^S C^S T^S T^S T^S G^S G^S G^S G^S A^S T^S T^S G^S T^S A^S G^S G^S G$	$0,09 \pm 0,013$
Int III_3'-LNA	$C^S T^S T^S G^S A^S C^S T^S T^S T^S G^S G^S G^S G^S A^S T^S T^S G^L T^L A^L G^L G^L G$	$1,30 \pm 0,03$
Int III_5'-LNA	$L^L C^L T^L T^L G^L A^L C^L T^L T^L T^L G^L G^L G^L G^S A^S T^S T^S G^S T^S A^S G^S G^S G$	$1,12 \pm 0,03$
Int III_5'/3'-LNA	$L^L C^L T^L T^L G^L A^L C^L T^S T^S T^S G^S G^S G^S G^S A^S T^S T^S G^L T^L A^L G^L G^L G$	$11,75 \pm 0,64$
Олигонуклеотиды, направленные на участок гена <i>gag</i> ВИЧ-1:		
Gag-I	$T^S C^S G^S C^S A^S C^S C^S C^S A^S T^S C^S T^S C^S T^S C^S T^S C^S T^S T$	$0,15 \pm 0,018$
Gag-I_3'-LNA	$T^S C^S G^S C^S A^S C^S C^S C^S A^S T^S C^S T^S C^S T^S C^L T^L C^L C^L T^L T$	$2,34 \pm 0,07$
Gag-I_5'-LNA	$L^L T^L C^L G^L C^L A^L C^S C^S C^S A^S T^S C^S T^S C^S T^S C^S T^S C^S T^S T$	$2,11 \pm 0,07$
Gag-I_5'/3'-LNA	$L^L T^L C^L G^L C^L A^L C^S C^S C^S A^S T^S C^S T^S C^S T^S C^L T^L C^L C^L T^L T$	$15,80 \pm 0,84$

^S – тиофосфатная модификация, ^L – LNA-модификация.

Данные полученных значений ингибирующей активности олигонуклеотидов указывают на то, что введение LNA-модификации снижает их противовирусное действие. Наилучший показатель IC_{50} был получен для PS-олигонуклеотида, направленного на участок гена *pol* ВИЧ-1 в области, кодирующей вирусный фермент интегразу (IC_{50} составил $0,09 \pm 0,013$ мкМ) и PS-олигонуклеотида, направленного на участок гена *gag* (IC_{50} составил $0,15 \pm 0,018$ мкМ).

Для соединений с наилучшими значениями IC_{50} , была изучена их 50% токсичная концентрация (CC_{50}) методом МТТ-теста и определен индекс селективности (SI). Все исследованные олигонуклеотиды продемонстрировали умеренную цитотоксичность ($CC_{50} > 70$ мкМ) и их SI составил от 61,6 до 1477,8.

Антиретровирусная активность комбинаций олигонуклеотидов

Так как среди олигонуклеотидов с различными химическими модификациями наилучшую противовирусную эффективность имели олигонуклеотиды в тиофосфатной модификации, они

были отобраны для дальнейшего поиска наиболее эффективных купажей – различных комбинаций олигонуклеотидов, направленных на мишени в геноме ВИЧ, ответственные за разные стадии его жизненного цикла (Таблица 5). Исследование проводили методом «профилактика» («pre-treatment»), который подразумевает введение выбранных соединений в клетку до встречи клетки с вирусом и позволяет смоделировать ситуацию доконтактной профилактики (PrEP).

Таблица 5 – Данные по оценке противовирусной активности комбинаций и моно-олигонуклеотидов на клетках человека МТ-4, инфицированных ВИЧ-1 суб-субтипа А6

Обозначение комбинации олигонуклеотидов	Мишени в геноме ВИЧ-1	IC ₅₀ , мкМ
Gag-2+RS	Область гена <i>gag</i> + область гена <i>pol</i>	0,034 ± 0,003
Gag-2+R		0,033 ± 0,004
Gag-2+Int (S)	Область гена <i>gag</i> + область гена <i>pol</i>	0,030 ± 0,002
Gag-2+PbS-2	Область гена <i>gag</i> + область праймер-связывающего сайта	0,034 ± 0,003
PbS-2+RS	Область праймер-связывающего сайта + область гена <i>pol</i>	0,029 ± 0,002
PbS-2+R		0,046 ± 0,004
Int (S)	Область гена <i>pol</i> (вирусный фермент – интеграз)	0,087 ± 0,005
RS	Область гена <i>pol</i> (вирусный фермент – обратная транскриптаза)	0,100 ± 0,005
R		0,285 ± 0,009
Gag-2	Область гена <i>gag</i>	0,058 ± 0,004
PbS-2	Область праймер-связывающего сайта	0,085 ± 0,005

Для моно-олигонуклеотидов получены значения IC₅₀, аналогичные данным ранее проведенных исследований. Наилучшим подавлением ВИЧ-1 обладал олигонуклеотид Gag-2 (IC₅₀=0,058 ± 0,004 мкМ). Олигонуклеотиды, направленные на область, кодирующую интегразу вируса Int (S) и область праймер-связывающего сайта PbS-2, проявили схожую противовирусную активность с показателями 0,087 ± 0,005 мкМ и 0,085 ± 0,005 мкМ соответственно. Различия в активности олигонуклеотидов возможны из-за биологической доступности мишеней в геноме вируса, что может указывать на перспективность изучения высоко консервативного участка области гена *gag* как наиболее доступной цели для антисмыслового воздействия.

Использование комбинаций олигонуклеотидов, нацеленных на разные мишени, приводит к усилению противовирусной эффективности олигонуклеотидов по сравнению с аналогичными моно-олигонуклеотидами. Наилучший показатель IC₅₀ (0,029 ± 0,002 мкМ) получен для комбинации PbS-2+RS (область гена *gag* + область праймер-связывающего сайта). При этом аналогичная комбинация, но в связке с не тиофосфатной модификацией олигонуклеотида, а додецил-содержащим олигонуклеотидом (PbS-2+R), показала значение IC₅₀ 0,046 ± 0,004 мкМ несколько ниже, чем остальные исследованные комбинации.

Исследование модифицированных олигонуклеотидов с помощью конфокальной микроскопии

Для углубленного исследования эффективности проникновения в клетку модифицированных олигонуклеотидов и их локализации в клетке с помощью конфокальной микроскопии были синтезированы олигонуклеотиды различных модификаций, меченные FAM: Так как FAM несут именно олигонуклеотиды, а не доставщик Тд, фиксация сигнала в клетке будет указывать именно на проникновение олигонуклеотидов (Таблица 6).

Таблица 6 – Последовательности олигонуклеотидов, исследованных на их способность проникать в лимфоидные клетки человека МТ-4

Обозначение олигонуклеотидов	Последовательность 5'-3'
FAM-ON-PS	[FAM]-A ^S G ^S T ^S C ^S T ^S C ^S G ^S A ^S C ^S T ^S T ^S G ^S C ^S T ^S A ^S C ^S C
FAM-ON-O	[FAM]-A ₀ G ₀ T ₀ C ₀ T ₀ C ₀ G ₀ A ₀ C ₀ T ₀ T ₀ G ₀ C ₀ T ₀ A ₀ C ₀ C ₀
Тд «доставщик»	T[Dcyl][Dcyl][Dcyl]-GGTAGCAAGTCGAGA ^x C ^x T

[Dcyl] – нунуклеотидное додецил-содержащее звено; NH₂ - гексаметиленовый линкер; x – фосфорилгуанидиновая модификация; s – тиофосфатная модификация.

Известно, что PS-олигонуклеотиды способны самостоятельно проникать в некоторые типы клеток без применения трансфецирующих агентов. Поскольку клетки лимфоидного типа являются трудно трасфецируемыми, дополнительно была изучена способность PS-олигонуклеотида (FAM-ON-PS) и дезоксирибонуклеотида (FAM-ON-O) проникать в клетки МТ-4 с использованием контрольных неспецифичных олигонуклеотидов, содержащих на 5'-конце флуоресцентный краситель (Таблица 6). Также оценка проникновения была проведена для выбранных олигонуклеотидов в комплексе в виде дуплекса с частично комплементарным олигонуклеотидом-доставщиком (Тд, Таблица 1).

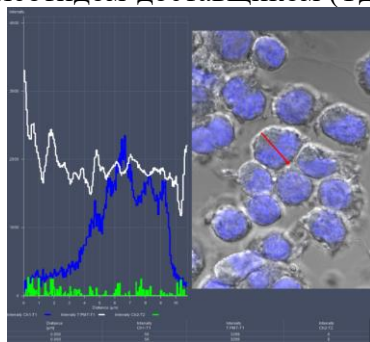


Рисунок 2 – Профили интенсивности сигналов в клетках МТ-4 после инкубации с **FAM-ON-O**, с использованием лазеров с длиной волны 405 нм (синий – DAPI) и 488 нм (зелёный – FAM)

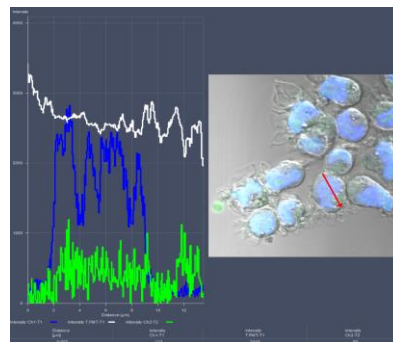


Рисунок 4 – Профили интенсивности сигналов в клетках МТ-4 после инкубации с **FAM-ON-PS**, с использованием лазеров с длиной волны 405 нм (синий – DAPI) и 488 нм (зелёный – FAM)

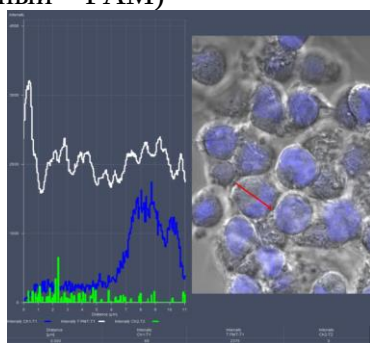


Рисунок 3 – Профили интенсивности сигналов в клетках МТ-4 после инкубации с дуплексом **Тд+FAM-ON-O**, с использованием лазеров с длиной волны 405 нм (синий – DAPI) и 488 нм (зелёный – FAM)

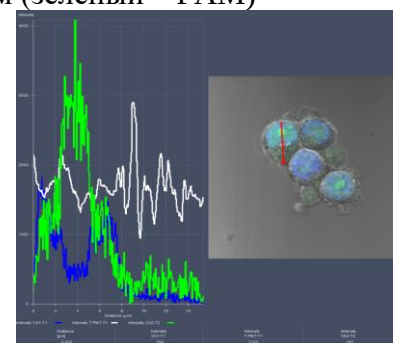


Рисунок 5 – Профили интенсивности сигналов в клетках МТ-4 после инкубации с дуплексом **Тд+FAM-ON-PS**, с использованием лазеров с длиной волны 405 нм (синий – DAPI) и 488 нм (зелёный – FAM)

Анализ полученных изображений показал, что на оптических срезах, проходящих через ядро клетки и цитоплазму, распределение олигонуклеотидов различается в зависимости от их химических модификаций. Показано, что FAM-ON-O практически не способен самостоятельно

проникать в клетку, тогда как в дуплексе с «доставщиком» (Тд+FAM-ON-O) после инкубации в цитоплазме клеток достоверно регистрировался слабый сигнал FAM. В отличие от FAM-ON-O, фосфотиоатный олигонуклеотид (FAM-ON-PS) способен самостоятельно эффективно проникать в клетку, а в дуплексе с «доставщиком» (Тд+FAM-ON-PS) олигонуклеотид эффективно проникает в цитоплазму и ядро клетки (Рисунки 2-5).

На следующем этапе работы было проведено сравнительное исследование способности проникновения в клетки PS-олигонуклеотидов, несущих LNA-модификацию по 3'- и/или 5'-концу нуклеотидной последовательности (Таблица 7). Для исследования была выбрана последовательность олигонуклеотида, направленного на область, кодирующую интегразу ВИЧ-1, поскольку для него была выявлена наилучшая способность подавлять репликацию вируса (Int III). Для изучения способности к интернализации, объясняющей различия в противовирусной активности олигонуклеотидов, были синтезированы LNA-(PS)-олигонуклеотиды на основе последовательности олигонуклеотида Int III (Таблица 7).

Таблица 7 – Олигонуклеотиды, исследованные на их способность к клеточной интернализации

Обозначение олигонуклеотида	Последовательность 5'-3'
FAM- Int III	[FAM]-C ^S T ^S T ^S G ^S A ^S C ^S T ^S T ^S T ^S G ^S G ^S G ^S G ^S A ^S T ^S T ^S G ^S T ^S A ^S G ^S G ^S G
FAM- Int III 3'-LNA	[FAM]-C ^S T ^S T ^S G ^S A ^S C ^S T ^S T ^S T ^S T ^S G ^S G ^S G ^S G ^S A ^S T ^S T ^S G ^L T ^L A ^L G ^L G ^L G
FAM- Int III 5'-LNA	[FAM]- ^L C ^L T ^L T ^L G ^L A ^S C ^S T ^S T ^S T ^S G ^S G ^S G ^S G ^S A ^S T ^S T ^S G ^S T ^S A ^S G ^S G ^S G
FAM- Int III 5'/3'-LNA	[FAM]- ^L C ^L T ^L T ^L G ^L A ^S C ^S T ^S T ^S T ^S G ^S G ^S G ^S G ^S A ^S T ^S T ^S G ^L T ^L A ^L G ^L G ^L G

^S – PS-модификация; ^L – LNA-модификация; [FAM] – 6-карбоксифлуоресцеин-содержащего звена

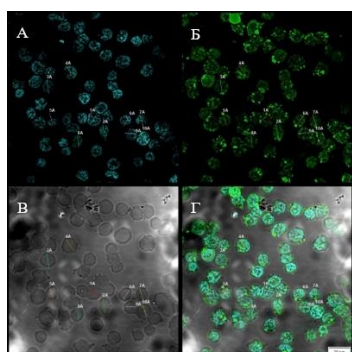


Рисунок 6 – Конфокальная микроскопия клеток MT-4 после инкубации с PS-олигонуклеотидом **FAM-Int**.

- А) Клетки с окрашенными ядрами (синий – DAPI длина волны 405 нм)
 Б) Клетки с олигонуклеотидом-FAM (зеленый – FAM длина волны 488 нм)
 В) Изображение клеток MT-4.
 Г) Совмещенное изображение

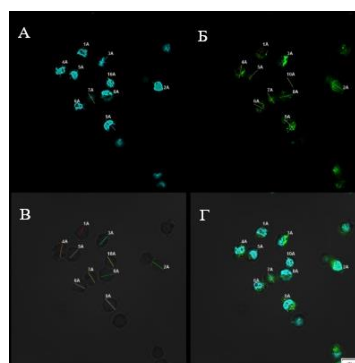


Рисунок 8 – Конфокальная микроскопия клеток MT-4 после инкубации с PS-олигонуклеотидом **FAM-Int 5'-LNA**.

- А) Клетки с окрашенными ядрами (синий – DAPI длина волны 405 нм)
 Б) Клетки с олигонуклеотидом-FAM (зеленый – FAM длина волны 488 нм)
 В) Изображение клеток MT-4.
 Г) Совмещенное изображение

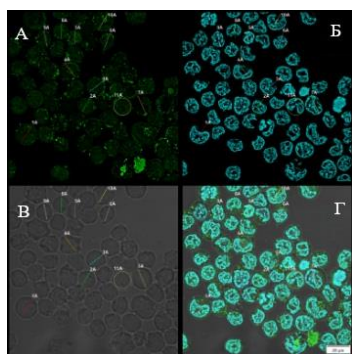


Рисунок 7 – Конфокальная микроскопия клеток MT-4 после инкубации с PS-олигонуклеотидом **FAM-Int_3'-LNA**.
 А) Клетки с окрашенными ядрами (синий – DAPI длина волны 405 нм)
 Б) Клетки с олигонуклеотидом-FAM (зеленый – FAM длина волны 488 нм)
 В) Изображение клеток MT-4.
 Г) Совмещенное изображение

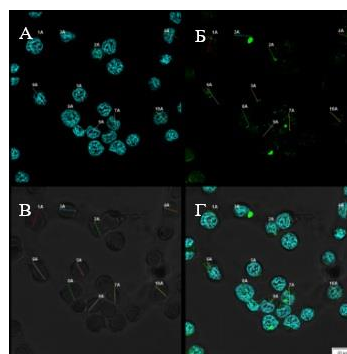


Рисунок 9 – Конфокальная микроскопия клеток MT-4 после инкубации с PS-олигонуклеотидом **FAM-Int_5'3'-LNA**.
 А) Клетки с окрашенными ядрами (синий – DAPI длина волны 405 нм)
 Б) Клетки с олигонуклеотидом-FAM (зеленый – FAM длина волны 488 нм)
 В) Изображение клеток MT-4.
 Г) Совмещенное изображение

Конфокальная микроскопия показала, что LNA-модифицированные PS-олигонуклеотиды способны проникать внутрь лимфоидных клеток человека MT-4 без использования трансфецирующих агентов и иного стимулирования, но применение фосфотиоатной модификации в связке с LNA-модификацией не повышает их трансфецирующую способность, что согласуется с данными по противовирусной активности исследованных олигонуклеотидов (Рисунки 6-9).

Исследование модифицированных олигонуклеотидов с помощью проточной цитометрии с визуализацией

Существующие методы оценки интернализации, такие как конфокальная микроскопия и классическая проточная цитометрия, имеют существенные ограничения, связанные с низкой пропускной способностью или отсутствием информации о локализации сигнала. Поэтому для проведения количественной оценки проникновения был применен метод проточной цитофлуориметрии с визуализацией. Проведенное исследование позволило оценить интернализацию отдельно в каждой клетке (предоставив визуализацию) для всей клеточной популяции. Данным методом были исследованы PS-олигонуклеотиды, PS-олигонуклеотиды с LNA-модификацией по 3'- и/или 5'-концу нуклеотидной последовательности (Таблица 7).

При проведении флуоресцентного анализа клеточных популяций была проведена дифференциация жизнеспособных и некротических клеток, так как повреждение цитоплазматической мембраны в погибших клетках приводит к неспецифическому связыванию флуоресцентных зондов и может сопровождаться повышенным уровнем автофлуоресценции. С этой целью в работе был применен селективный маркер жизнеспособности клеток — пропидий йодид, обладающий способностью проникать в исключительно мертвые клетки, окрашивая их ДНК. Результаты оценки жизнеспособности клеток в зависимости от модификации олигонуклеотида представлены на Рисунке 10А.

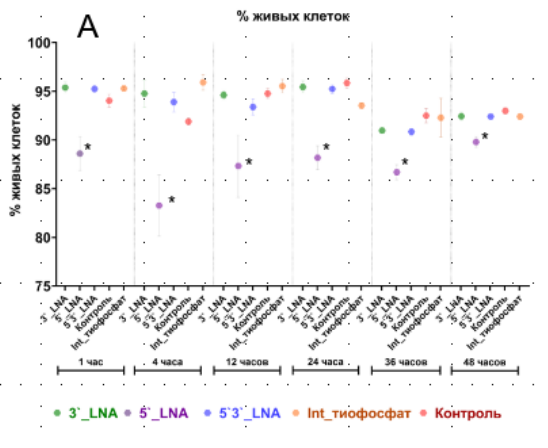


Рисунок 10А – график жизнеспособности клеток в зависимости от добавленной модификации олигонуклеотида по времени;
*значение статистически значимо различалось в сравнении с другими значениями данной хронологической точки отбора проб ($p < 0,05$)

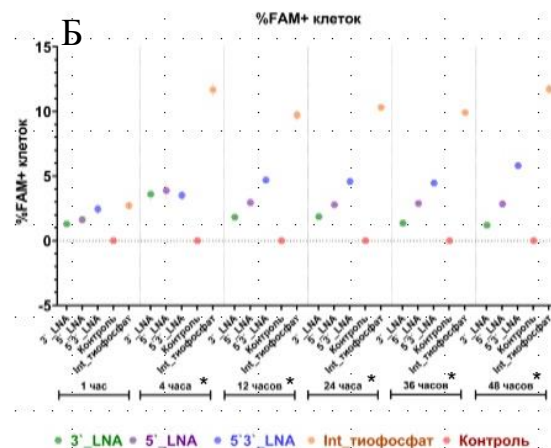


Рисунок 10В – график абсорбции олигонуклеотидов клетками МТ-4 по времени;
*все значения имели статистически значимые различия на всем временном промежутке начиная с 4 часов инкубации ($p < 0,05$)

Полученные экспериментальные данные демонстрируют, что все изученные химические модификации олигонуклеотидов способны взаимодействовать с клеточной поверхностью (Рисунок 10В). Однако их эффективность существенно отличается в зависимости от места внедрения модификации. Наибольшая эффективность абсорбции наблюдалась у образца в PS-модификации (Int).

Однако наиболее важной метрикой эффективности олигонуклеотидов является их способность проникать в цитоплазму клетки, то есть интернализация. Результаты измерения количества клеток, несущих сигнал от олигонуклеотидов в цитоплазме клетки представлены на Рисунке 11А.

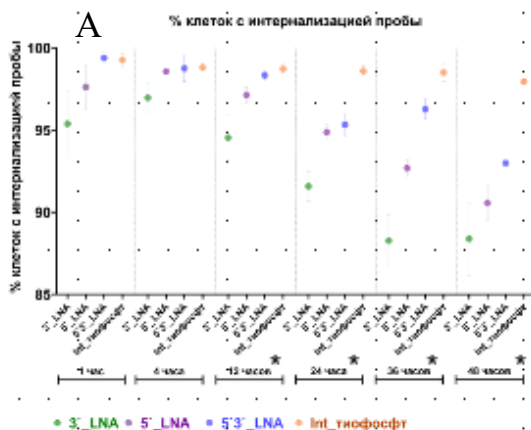


Рисунок 11А – доля клеток с внутриклеточной локализацией сигнала FAM;
*все значения имели статистически значимые различия на всем временном промежутке начиная с 12 часов инкубации ($p < 0,05$)

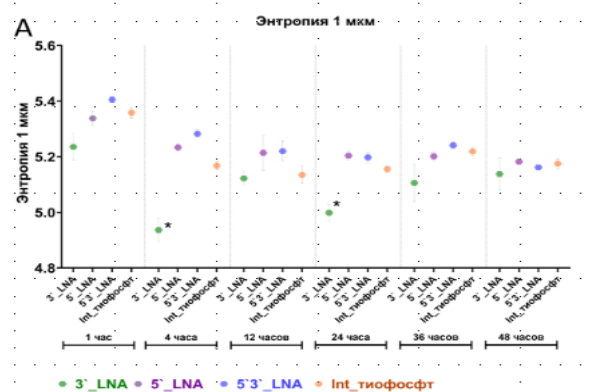


Рисунок 11В – среднее значение энтропии с указанием средней ошибки в зависимости от модификации и времени культивирования
*значение статистически значимо различалось в сравнении с другими значениями данной хронологической точки отбора проб ($p < 0,05$)

Проникновение олигонуклеотидов в клетку является необходимым, но недостаточным условием для реализации их функциональной активности. Для комплементарного связывания с вирусными нуклеиновыми кислотами олигонуклеотиды должны избежать деградации в эндосомах, после чего выйти в цитоплазму, а затем и в кариоплазму, где расположены основные мишени. Ключевым фактором эффективности выступает их способность к равномерному внутриклеточному распределению, что определяет доступность для взаимодействия с целевыми нуклеиновыми кислотами.

Для количественной оценки пространственного распределения соединений использовали параметр энтропии Шеннона, рассчитанный на основе интенсивности флуоресцентного сигнала FAM в пределах комбинированной маски, объединяющей цитоплазматическую область и канал флуоресценции FAM (Рисунок 11Б). Энтропия отражает степень неупорядоченности распределения молекул: более высокие значения соответствуют равномерной диффузии, тогда как низкие — агрегации или локализованному накоплению.

Результаты количественной оценки пространственного распределения олигонуклеотидов показывают, что все олигонуклеотиды достаточно эффективно распределяются по цитоплазме клеток, т.к. подавляющее большинство средних значений всех олигонуклеотидов на всем протяжении культивирования находилось в диапазоне ≥ 5 .

Скрининговое исследование природных соединений МТТ-методом

Синтез 98 природных соединений, потенциально обладающих антиретровирусной активностью, выполнен Новосибирским институтом органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН.

Проведены химические модификации (+)-камфоры с получением набора ацилигидразонов и семикарбазонов с фрагментами насыщенных N-гетероциклов. Среди полученной библиотеки варьировались длина и тип линкера, а также азагетероциклический структурный блок. На основе (+)- и (-)-камфоры были синтезированы азот- и серосодержащие производные, а именно – 2-иминотиазолидиноны, 5,5-диметил-2-иминотиазолидиноны и 2,3-дигидротиазолы. Получен ряд сложных эфиров (-)-борнеола, соединенных с гетероциклическими фрагментами линкерами различной длины. Синтезирован набор амидов с изоборнанным фрагментом, как с гетероциклическими, так и с ароматическими и алифатическими заместителями. Синтезирован ряд аналогов глицивир – соединения, обладающего значительной активностью в отношении ВИЧ - никотинатов глицирризиновой кислоты. Был синтезирован набор ацилигидразонов и семикарбазонов камфоры, соединенных с фрагментами N-гетероциклов линкерами различной длины.

Проведены химические модификации изоалантолактона содержащие пиримидиновый фрагмент через триазольный линкер; синтезированы производные дезоксихолево́й кислоты, модифицированное по 3-му положению различными гетероциклическими фрагментами; проведен синтез тиосемикарбазонов на основе гетероциклических соединений и бициклических кетонов.

Скрининг противовирусной активности и токсичности препаратов проводили на лимфоидной клеточной культуре МТ-4, как описано в главе «Материалы и методы». Антиретровирусную активность соединений исследовали в отношении ВИЧ-1 суб-субтипа А6 методом МТТ на 5-е сутки культивирования в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С и 5 % CO₂. Токсичность соединений оценивали на лимфоидной клеточной культуре МТ-4 МТТ-методом на 5-е сутки культивирования. Учёт и обработку полученных результатов проводили с помощью программы SoftMax Pro 4,0.

Скрининг полученных соединений методом МТТ не выявил препаратов с противовирусной активностью в отношении ВИЧ-1.

Антиретровирусная активность и цитотоксичность химических соединений

Синтез соединений проводился Химическим факультетом МГУ им. Ломоносова, г. Москва.

В результате теоретического анализа были направленно синтезированы химические соединения – производные пирролидина (ВВ 0284050, ВВ 0283870, ВВ 0283885, ВВ 0283886 и ВВ 0283888) и ранее исследованное на других модельных системах соединение производного 5-

арилпирролкарбоновой кислоты (BB 0274001) для изучения их способности ингибировать репродукцию ВИЧ-1 и цитотоксичности.

Для исследования противовирусной активности все препараты были приготовлены в исходном растворе DMSO с концентрацией 20 мг/мл. Начальная концентрация для исследования противовирусной активности составляла 80 мкг/мл. Исследование антиретровирусной активности проводили методом ИФА как описано в главе «Материалы и методы».

Контролями при проведении экспериментов являлись:

1. Отрицательный контроль – клетки МТ-4, инфицированные ВИЧ, без добавления препаратов.
2. Положительный контроль – клетки МТ-4, инфицированные ВИЧ, с добавлением коммерческого препарата эфавиренз (EFV).

При инкубировании ВИЧ-1 с добавлением препарата BB 0274001 установлена способность данного соединения ингибированию репродукции ВИЧ-1, 50% ингибирующая концентрация (IC_{50}) для ВИЧ-1 составила 0,16 мкг/мл.

При инкубировании ВИЧ-1 с добавлением препарата BB 0284050 выявило наличие противовирусной активности, 50 % ингибирующая концентрация (IC_{50}) для ВИЧ-1 составила 0,186 мкг/мл.

Соединения BB 0283870, BB 0283885, BB 0283886 и BB 0283888 представляли собой производные цис-аннелированного пирролидина с различными химическими модификациями, которые вносили конформационные изменения в структуры молекул для улучшения их противовирусных свойств. Проведенное исследование не выявило для них наличие противовирусной активности. Описанные введенные изменения химической структуры не дали прогнозируемого эффекта и привели к потере противовирусной активности препарата.

Для соединений BB 0284050 и BB 0274001 была исследована 50%-ая цитотоксическая доза (CC_{50}) МТТ-методом и определен индекс селективности (SI).

Соединение BB 0274001 является производным 5-арилпирролкарбоновой кислоты и представляет собой низкомолекулярный ингибитор широкого спектра действия, нацеленный на белок gp120 оболочки ВИЧ-1. Он блокирует проникновение вируса в клетку, мешая его взаимодействию с рецептором CD4 на поверхности клеток, SI=108,4.

Соединение BB 0284050 теоретически разработано как новый нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы ВИЧ-1 (ННИОТ). Соединение BB 0284050 представляет особый интерес, так как является производным 2,4,5-тризамещенного пиримидина и относится к новым типам диарилпиримидинов, SI=440,1.

ВЫВОДЫ

1. Создан набор нуклеотидных последовательностей в функционально значимых областях генома ВИЧ, кодирующих вирусные ферменты интегразу (4751-4771, 4783-4804, 4653-4674), обратную транскриптазу (235-2407), в областях праймер-связывающего сайта (634-653, 624-653) и гена gag (770-799, 780-799), представляющих собой перечень мишеней в геноме ВИЧ-1 для воздействия олигонуклеотидов с целью ингибирования репродукции вируса.

2. Выбранные целевые олигонуклеотиды, направленные на мишени в геноме вируса, способны ингибировать репродукцию ВИЧ-1 при их доставке в клетку с помощью специфичных модифицированных олигонуклеотидов-доставщиков, содержащих три молекулы додецила на 5'-конце нуклеотидной последовательности (50%-ная ингибирующая ВИЧ-1 концентрация (IC_{50}) составила от $2,20 \pm 0,11$ мкМ до $5,60 \pm 0,15$ мкМ).

3. Последовательный отбор химических модификаций целевых олигонуклеотидов на основе оценки их способности ингибировать репродукцию ВИЧ-1 на культуре лимфоидных клеток человека МТ-4 показал, что наилучшей противовирусной активностью обладают олигонуклеотиды в тиофосфатной модификации, их 50%-ная ингибирующая ВИЧ-1 концентрация (IC_{50}) не превышает 0,5 мкМ, показатель индекса селективности варьирует от 155 до 1627,9.

4. Показано, что использование комбинации олигонуклеотидов, направленных на разные мишени генома ВИЧ-1, синергетически усиливает противовирусный эффект по сравнению с применением моно-олигонуклеотидов, что позволяет создавать на основе модифицированных

олигонуклеотидов комбинированные анти-ВИЧ препараты. Среди исследованных купажей олигонуклеотидов наилучший показатель IC_{50} ($29 \pm 1,7$ нМ) получен для олигонуклеотидов, направленных на области гена *gag* и праймер-связывающего сайта Pbs.

5. Впервые совместным использованием методов микроскопии и проточной цитометрии с визуализацией доказана высокая эффективность проникновения LNA/тиофосфат-модифицированных олигонуклеотидов в клетку и их равномерное распределение в цитоплазме лимфоидных клеток, что является критически необходимым для разработки на их основе перспективных средств терапии. Показано, что оптимальными характеристиками проникновения в клетку, клеточной токсичности, клеточной интернализации и энтропии обладает фосфотиоатная модификация (PS) и LNA-олигонуклеотиды, модифицированные по 5' концу нуклеотидной последовательности.

6. Впервые выявлено наличие антиретровирусной активности соединения BB 0284050 (50%-ная ингибирующая ВИЧ-1 концентрация (IC_{50}) составила 0,186 мкг/мл, $SI=440,1$), являющегося производным 2,4,5-тризамещенного пиримидина – препарата нового типа диарилпиримидинов, перспективного в качестве разработки нового ненуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ-1.

7. На основе скрининга химически синтезированных соединений производных цис-аннелированного пирролидина с различными химическими модификациями и производного 5-арилпирролкарбоновой кислоты по наличию противовирусной активности в отношении ВИЧ-1 суб-субтипа А6 на культуре лимфоидных клеток человека МТ-4 показано наличие антиретровирусной активности для соединения NBD-11021 ($SI=108,4$), представляющего собой низкомолекулярный ингибитор широкого спектра действия, нацеленный на белок gp120 оболочки ВИЧ-1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящего исследования проведено изучение способности химически модифицированных олигонуклеотидов и новых химически синтезированных соединений подавлять репродукцию ВИЧ-1 в клетках человека.

На основании выбранных мишеней в геноме ВИЧ-1 для генотерапевтического воздействия синтезированы вирус-специфические олигонуклеотиды. Путем последовательного анализа способности отдельных химических модификаций олигонуклеотидов ингибировать репликацию ВИЧ-1 на модели лимфоидных клеток человека были отобраны наиболее оптимальные модификации олигонуклеотидов и их комбинации, обладающие низкой цитотоксичностью и высокой способностью к блокированию жизненного цикла вируса. Для наиболее перспективных олигонуклеотидов, имеющих различные модификации остова, на высоком технологическом уровне исследована их способность к интернализации.

Проведенное исследование указывает на то, что тиофосфатные олигонуклеотиды, нацеленные на экспериментально выбранные сайты связывания в геноме ВИЧ-1, действительно функционируют как эффективные ингибиторы репродукции вируса в клеточной культуре, а их комбинации, 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*.

Выполненные исследования позволили получить новые данные по терапевтическому потенциалу химически модифицированных олигонуклеотидов, что может быть использовано для разработки различных генотерапевтических вмешательств.

Показано, что олигонуклеотиды в PS-модификации имеют лучшие показатели IC_{50} по сравнению с остальными химическими модификациями. Выявленные различия в активности

между целевыми олигонуклеотидами в одной модификации, возможно, обусловлены биологической доступностью мишени в геноме вируса для связывания с олигонуклеотидом. Вместе с тем комплексное изучение PS-олигонуклеотидов с дополнительным введением LNA-модификации по 3'- и/или 5'-концам нуклеотидной последовательности показало, что LNA-модификация не приводит к усилению противовирусного эффекта, что отчасти объясняется полученными данными по особенностям внутриклеточного проникновения.

Исследованные PS-олигонуклеотиды с введенной LNA-модификацией обладали низкой токсичностью и хорошей способностью к проникновению через цитоплазматическую мембрану лимфоидных клеток человека. Кроме этого, показано, что коэффициент интернализации флуоресцентного сигнала от исследованных олигонуклеотидов находился в диапазоне >2 , то есть большая доля олигонуклеотидов не сорбировалась на поверхности цитоплазматической мембраны, а проникала внутрь клеток. Описанное равномерное распределение олигонуклеотидов в цитоплазме клеток подтверждает их способность к диффузии в клеточных компартментах, демонстрируя высокую резистентность в отношении эндосомальных нуклеаз и свойство равномерно распределиться по внутреннему содержимому клетки, что повышает шансы встречи олигонуклеотидов с целевой РНК, что также можно эффективно использовать при разработке новых противовирусных соединений.

Выполненный комплекс сравнительных исследований модифицированных олигонуклеотидов указывает на то, что фосфотиоатные олигонуклеотиды представляют перспективное направление для разработки терапии ВИЧ-1, сочетая высокую способность к интернализации и устойчивость к деградации во внутриклеточной среде и высокую противовирусную активность.

Исследована антиретровирусная активность и токсичность для клеток человека 98 препаратов на основе природных соединений и их компонентов. Скрининг показал, что отобранные химические соединения не имеют антиретровирусной активности.

Получены новые данные по способности соединений 2,4,5-тризамещенного пиримидина и производного 5-арилпирролкарбоновой кислоты блокировать репродукцию ВИЧ-1 в клетках человека.

Выполненная научная работа имеет высокую практическую значимость, так как описанные свойства по ингибированию ВИЧ-1 химически синтезированного вещества ВВ 0284050 (SI=440,1) позволяют рекомендовать его для дальнейших разработок на его основе препарата против ВИЧ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ СТАТЬИ:

1. 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. – 2024. – Т.19. – № 4. – С.57-67. doi: 10.18470/1992-1098-2024-4-5
2. Готфрид Л.Г., Гашникова М.П., Елфимов К.А., Тотменин А.В., Агафонов А.П., Гашникова Н.М. Противовирусная активность ген-направленных олигонуклеотидов с LNA-модификацией в отношении ВИЧ-1 на модели лимфоидных клеток человека // Естественные и технические науки. – 2025. – Т.7. – С.47-53
3. Elfimov K., Gotfrid L., Nokhova A., Gashnikova M., Baboshko D., Totmenin A., Agaphonov A., Gashnikova N. A Semi-Automated Imaging Flow Cytometry Workflow for High-Throughput Quantification of Compound Internalization with IDEAS and FluoSta Software // Methods and protocols. – 2025. – Т.8. – № 6. – P. 138:1-19. doi: 10.3390/mps8060138
4. Gotfrid L., Elfimov K., Gashnikova M., Totmenin A., Agaphonov A., Gashnikova N. Investigation of the activity of phosphothioate and phosphothioate-LNA-modified oligonucleotides against HIV-1 // Frontiers in medicine. – 2026. – Т.13. – P. 1719202:1-18. doi: 10.3389/fmed.2026.1719202

5. 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.19. – № 1. – С.57-67. doi: 10.18470/1992-1098-2024-4-5

ТЕЗИСЫ:

1. Готфрид Л. Г. и др. ОСОБЕННОСТИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ТИОФОСФАТНЫЕ МОДИФИКАЦИИ, ПОСЛЕ ТРАНСФЕКЦИИ В КЛЕТКИ ЛИНИИ МТ4 //Молекулярная диагностика и биобезопасность-2022. – 2022. – С. 239-239.

2. Готфрид Л. Г. и др. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОНИКНОВЕНИЯ В КЛЕТКИ ЛИНИИ VERO ФОСФОРИЛГУАНИДИНИЛИ ДОДЕЦИЛ-СОДЕРЖАЩИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ВЫЯВИЛО РАЗЛИЧИЯ В ИХ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ. //XIV Ежегодный Всероссийский конгресс по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского Инфекционные болезни в современном мире: текущие и будущие угрозы – 2022. – С. 49-49.

3. Готфрид Л.Г., Гашникова Н.М. ПРОНИКНОВЕНИЕ ДОДЕЦИЛ-СОДЕРЖАЩИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ В ЛИМФОИДНЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА МТ-4 // Материалы VIII Конгресса Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням, Журнал инфектологии, – 2022. – Приложение 1 Том 14 №2.

4. Готфрид Л.Г., Гашникова Н.М. СПОСОБНОСТЬ ПРОНИКНОВЕНИЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ТИОФОСФАТНЫЕ МОДИФИКАЦИИ, В ПЕРВИЧНЫЕ И ПЕРЕВИВАЕМЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА. // Международная конференция молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков — 2022, с.411.

5. Готфрид Л.Г., Тотменин А.В., Гашникова Н.М ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ГЕН-НАПРАВЛЕННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ИНГИБИРОВАТЬ РЕПРОДУКЦИЮ ВИЧ-1 НА МОДЕЛИ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА МТ-4. // Материалы IX Конгресса Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням, Журнал инфектологии, – 2023. Приложение 2 Том 15 №2.

6. Готфрид Л.Г., Тотменин А.В., Гашникова Н.М. АНТИРЕТРОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕН-НАПРАВЛЕННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, ИССЛЕДОВАННАЯ НА ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА В ОТНОШЕНИИ ВИЧ-1. //Материалы X Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания – 2023 – С. 55-57.

7. Готфрид Л.Г., Гашникова М.П., Тотменин А.В., Гашникова Н.М. ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ГЕННАПРАВЛЕННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ИНГИБИРОВАТЬ РЕПРОДУКЦИЮ ВИЧ-1 НА МОДЕЛИ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА МТ-4. // Материалы XVI Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням имени академика В.И.Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» – 2023 – С 59.

8. Готфрид Л.Г., Гашникова М.П., Тотменин А.В., Гашникова Н.М. СПОСОБНОСТЬ ЦЕЛЕВЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ LNA-МОДИФИКАЦИЮ ИНГИБИРОВАТЬ РЕПРОДУКЦИЮ ВИЧ-1 НА ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА // Материалы X Конгресса Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням Журнал Инфектологии, электронная, ПРИЛОЖЕНИЕ 2 Том 16, № 2 – 2024 – С. 36.

9. Готфрид Л.Г., Гашникова М.П., Тотменин А.В., Гашникова Н.М. СПОСОБНОСТЬ ФОСФОТИОАТНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, НЕСУЩИХ LNA-МОДИФИКАЦИЮ, ИНГИБИРОВАТЬ РЕПРОДУКЦИЮ ВИЧ-1. // Материалы IV Ежегодной конференции по инфекционным болезням «Покровские чтения» – 2024 – С. 16.

10. Готфрид Л.Г., Тотменин А.В., Гашникова Н.М. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ LNA-МОДИФИКАЦИЮ, В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРА РЕПРОДУКЦИИ ВИЧ-1. // Материалы XI Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» – 2024 – С. 55.

11. Готфрид Л.Г., Гашникова М.П., Елфимов К.А., Тотменин А.В., Гашникова Н.М. СПОСОБНОСТЬ ГЕН-НАПРАВЛЕННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ LNA-МОДИФИКАЦИЮ, ИНГИБИРОВАТЬ РЕПРОДУКЦИЮ ВИЧ-1 НА МОДЕЛИ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА. // Материалы Конгресса с международным участием Эпидемиология – 2025 (Москва, 15–16 октября 2025 года) / под ред. академика РАН В.Г. Акимкина. М.: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – 2025. – С. 382.

Благодарности

Выражаю благодарность ЛБМХ ИХБФМ СО РАН за синтез и предоставление модифицированных олигонуклеотидов.

Выражаю благодарность НИОХ СО РАН за синтез и предоставление природных соединений и их производных.

Выражаю благодарность Химическому факультету МГУ им. Ломоносова за синтез и предоставление химических соединений.

Выражаю благодарность С.И. Байбородину, к.б.н., заведующему ЦКП ИЦиГ СО РАН, за получение изображений клеток методом конфокальной микроскопии.

Выражаю благодарность сотрудникам отдела ретровирусов К.А. Елфимову, А.В. Тотменину и М.П. Гашниковой за помощь в планировании и выполнении экспериментальных исследований. Особую благодарность выражаю научному руководителю Наталье Матвеевне Гашниковой, за помощь, поддержку в проведении исследований и научное руководство.