

Федеральное бюджетное учреждение науки
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И
БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека

На правах рукописи

Готфрид Людмила Геннадьевна

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

1.5.10 Вирусология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Гашникова Наталья Матвеевна

Кольцово

2026

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1 Вирус иммунодефицита человека.....	15
1.1.1 Строение вириона и структура генома ВИЧ-1.....	17
1.1.2 Цикл репликации ВИЧ-1.....	21
1.1.3 Антиретровирусная терапия (АРТ).....	29
1.2 Потенциальные ингибиторы ВИЧ-1.....	36
1.2.1 Препараты на основе модифицированных олигонуклеотидов.....	37
1.2.2 Препараты на основе природных соединений и их химически синтезированных компонентов.....	42
Заключение.....	45
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	46
2.1 Материалы.....	46
2.1.1 Культура клеток.....	46
2.1.2 Вирусный материал.....	46
2.2 Методы.....	48
2.2.1 Выделение мононуклеаров периферической крови здоровых доноров методом Воум.....	48
2.2.2 Исследование противовирусной активности методом иммуноферментного анализа (ИФА).....	49
2.2.3 Исследование цитотоксичности МТТ-методом.....	50
2.2.4 Исследование антиретровирусной активности МТТ-методом.....	50
2.2.5 Проточная цитометрия с визуализацией.....	51
2.2.6 Конфокальная микроскопия.....	52
2.2.7 Статистический анализ.....	53

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	55
3.1 Выбор мишени и химической модификации олигонуклеотидов.....	55
3.1.1 Антиретровирусная активность и цитотоксичность модифицированных олигонуклеотидов.....	58
3.1.2 Антиретровирусная активность комбинаций олигонуклеотидов.....	70
3.1.3 Исследование модифицированных олигонуклеотидов с помощью конфокальной микроскопии	73
3.1.4 Исследование модифицированных олигонуклеотидов с помощью проточной цитометрии с визуализацией.....	85
3.2 Скрининговое исследование природных соединений МТТ-методом.....	92
3.3 Антиретровирусная активность и цитотоксичность химических соединений.....	96
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	104
ВЫВОДЫ.....	111
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	113
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СООКРАЩЕНИЙ.....	117
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	121
Приложение 1. Список соединений, для которых провели скрининговое исследование на токсичность и антиретровирусную активность в отношении штамма ВИЧ-1 суб-субтипа А6.....	139

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

По данным UNAIDS на 2025 год во всем мире число людей, живущих с ВИЧ (ЛЖВ), составило почти 40 млн человек. [180]. 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) [180].

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 [117; 153]. Несмотря на положительные успехи АРТ, терапия не в состоянии полностью избавить организм от вируса, который сохраняется в клетках в латентном состоянии [161], что требует обязательного пожизненного приема препаратов [139; 153]. Прекращение приема АРТ может привести к быстрому восстановлению вирусной популяции в организме [25]. 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 [33; 65]. 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 [14].

С 2020 года, начиная с Канады, а затем и в странах Европы и США [89] одобрены к применению в качестве АРТ и профилактики заражения ВИЧ новые препараты на основе каботегавира длительного действия [63; 84]. Предполагалось, что широкое применение таких препаратов позволит быстро достичь целевых показателей по прекращению распространения ВИЧ-инфекции в мире. Однако среди лиц, принимающих препараты для доконтактной профилактики (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 [14].

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 A6 (широко распространен в России и Восточной Европе) или A1 ВИЧ-1 (распространен в странах Восточной Африки), риск вирусологической неудачи лечения которых был в 15 раз выше [130; 162].

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 субтипа А6 встречается с крайне высокой частотой, в ряде регионов России более 90% А6 ВИЧ-1 несут данную мутацию [85].

Не смотря 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 [31].

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.

Степень разработанности темы исследования.

Одним из подходов к разработке новых анти-ВИЧ препаратов может стать применение терапевтических олигонуклеотидов, которые уже используются для лечения наследственных и инфекционных заболеваний [36; 51; 123; 134; 173; 182]. Механизм действия терапевтических олигонуклеотидов основан на блокировании трансляции ключевых вирусных белков или деградации целевых молекул РНК/ДНК через активацию клеточных нуклеаз [148]. К настоящему времени одобрено более десяти терапевтических препаратов на основе нуклеиновых кислот включая фомивирсен и пегаптаниб, мипомерсен, нусинерсен, инотерсен, дефибротид, этеплирсен, голодирсен, вилтоларсен и казимерсен для лечения различных заболеваний [18; 48], что подтверждает перспективность изучения олигонуклеотидов в качестве подхода для лечения ВИЧ-инфекции [96; 144].

Продолжается исследование различных природных веществ в качестве противовирусных препаратов. Природные соединения и их синтетические производные являются крайне важными компонентами эффективных лекарственных средств [27; 141] и стали удобным источником исходных структурных блоков в синтезе противовирусных агентов [3; 10; 11]. Также пристального внимания заслуживают химически синтезированные соединения, которые относятся к классам цис-аннелированного пирролидина или пирролкарбоновой кислоты [158; 186].

Важно подчеркнуть, что современные международные клинические испытания препаратов выявляют всё больше субтип-специфических особенностей ответа ВИЧ-1 на противовирусную терапию. В том числе доказательство сниженной чувствительности российского геноварианта А6 ВИЧ-1 к новым современным препаратам пролонгированного действия, которые только начинают применяться в мире, указывают на крайнюю важность исследования противовирусной активности именно на российских специфических штаммах ВИЧ [53; 130].

В данной работе все исследования выполнены на штамме ВИЧ-1 субтипа А6, наиболее распространенном в России, который был нами выделен от инфицированного российского пациента. Данный штамм обладает высокими репликативными характеристиками на культуре моноклеарных клеток человека, что обуславливает корректное использование данной модели для оценки способности исследуемых препаратов блокировать репродукцию ВИЧ-1.

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. Продemonстрирована 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 не только в ядро клетки, но и ядрышко, 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 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.

Впервые для исследования антиретровирусной активности использована разработанная модель на основе российского штамма 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 р24 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 – ненуклеозидного 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 ICBV)», в онлайн-формате (г.Позцуоли, 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

Выбор мишеней в геноме ВИЧ-1 был осуществлен совместно с ведущим научным сотрудником отдела ретровирусов А.В. Тотмениным.

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 теме диссертационной работы опубликованы 16 научных работ, из них – 5 статей, опубликованных в журналах, индексируемых в базах РИНЦ, Scopus и Web of Science, а также 11 тезисов в сборниках материалов всероссийских и международных конференций и конгрессов.

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; приложение 1; список литературы, включающий 187 источника, из которых 13 — на русском языке, а 164 — на иностранных. В работе также представлены 56 иллюстрации и 13 таблиц.

Благодарности

Модифицированные олигонуклеотиды были синтезированы и любезно предоставлены ЛБМХ ИХБФМ СО РАН.

Природные соединения и их производные были синтезированы и любезно предоставлены НИОХ СО РАН.

Соединения производных пирролидина были синтезированы и любезно предоставлены Химическим факультетом МГУ им. Ломоносова.

Выражаю благодарность С.И. Байбордину, 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.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Вирус иммунодефицита человека

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) — возбудитель инфекционного заболевания, открытый в 1983 году в двух лабораториях независимо друг от друга — Институте Пастера во Франции и в Национальном институте рака в США. В 1986 году было установлено, что вирусы, которые были открыты в 1983 году учёными из Франции и США, генетически идентичны. Ранее использовавшиеся наименования вирусов были упразднены, им было дано общее название — вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) [68].

Вирус принадлежит к семейству *Retroviridae*, роду *Lentivirus* и с 2023 года имеет название *Lentivirus humimdef1* и *Lentivirus humimdef2* (Рисунок 1) [174].

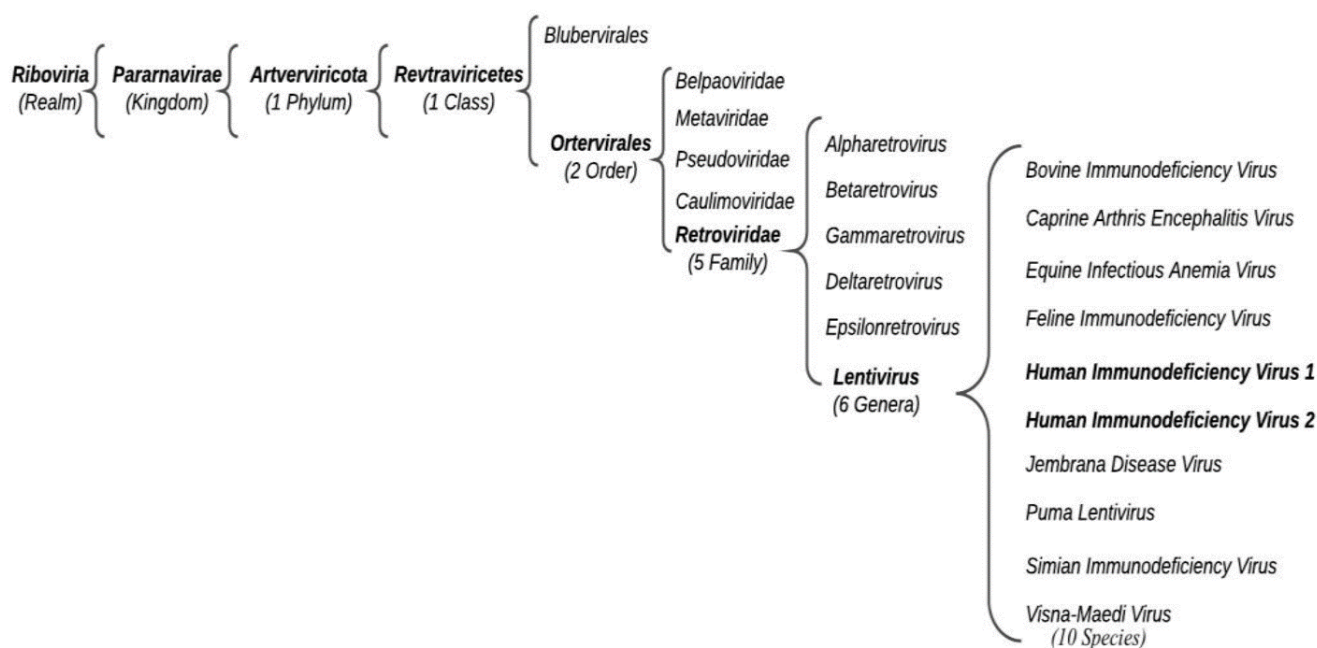


Рисунок 1 – Современная классификация ВИЧ-1/ВИЧ-2 (Адаптировано из Visual Taxonomy Browser [174])

ВИЧ-инфекцию могут вызывать два типа вируса иммунодефицита человека – ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Поскольку ВИЧ-2 менее патогенен и встречается в основном в районах Западной Африки, большую клиническую значимость представляет ВИЧ-1 и далее в контексте диссертации будет рассматриваться именно ВИЧ-1.

В настоящее время выделяют 4 группы ВИЧ-1: М (major, основной), О (outlier, побочный), N (non-M, non-O) и Р (putative, предполагаемый). Более 90% случаев заражения ВИЧ-инфекцией в мире приходится на группу М ВИЧ-1, которая подразделяется на 10 субтипов: А (А1-А8), В, С, D, Е, F (F1-F2), J, К и L. Дополнительно для ВИЧ-1 выделяют суб-субтипы А (А1-А8) и F (F1 и F2) [25]. Благодаря высокой генетической изменчивости вирус претерпевает изменения, приводящие к появлению новых генетических вариантов, которые могут обладать неизвестными или недостаточно изученными свойствами, что может играть важную роль в патогенезе, передаче, диагностике, лечении и разработке новых препаратов и методов лечения [124].

Вирус атакует клетки иммунной системы, на поверхности которых есть рецепторы CD4⁺. К таким клеткам относятся Т-хелперы, моноциты, макрофаги, клетки Лангерганса, дендритные клетки и клетки микроглии. Попадая в клетку, вирус начинает размножаться, при этом в процессе обратной транскрипции, при копировании генетического материала, отсутствует механизм самокорректирования [66]. В результате активного размножения ВИЧ может производить до 2×10^9 вирионов в день, что приводит к большой генетической изменчивости вируса. Как следствие в организме человека ВИЧ представлен множеством генетических вариантов (квазивидов), в том числе, содержащих мутации лекарственной устойчивости к антиретровирусным препаратам, что лежит в основе формирования резистентности ВИЧ к антивирусным препаратам, способной затруднять процесс лечения.

С момента первого зарегистрированного случая в 1978 году ВИЧ-инфекция унесла жизни более 35 млн человек, а по данным ЮНЭЙДС на 2025 год во всем мире число ЛЖВ составило более 40 млн человек, при этом из них только 30 млн получали антиретровирусную терапию [168]. Согласно данным статистики на конец 2025 года в России проживало более 1,2 миллионов человек с ВИЧ-положительным статусом и только 88% пациентов из числа состоящих на диспансерном наблюдении принимали АРТ.

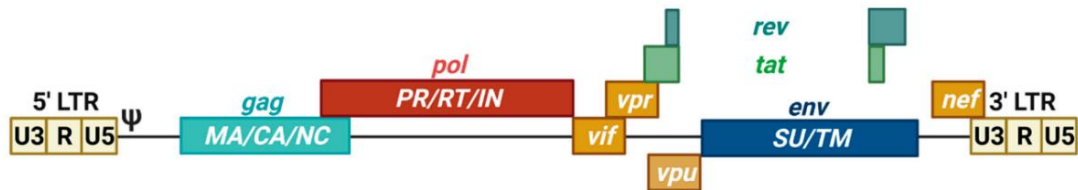
С момента обнаружения вируса сразу встал вопрос о лечении ВИЧ-инфекции. До появления антиретровирусных препаратов лечение пациентов было сосредоточено на лечении оппортунистических инфекций и их симптомов, поскольку не существовало терапии для подавления ВИЧ. Первым препаратом, одобренным для лечения ВИЧ в 1987 году, стал Зидовудин (AZT) [116], который являлся нуклеозидным ингибитором обратной транскриптазы (НИОТ) и использовался в качестве монотерапии. В скором времени стало ясно, что эффективность применения данного препарата снижается, так как вирус приобретает к нему лекарственную устойчивость (ЛУ) [64]. Вторым классом препаратов, одобренным для лечения ВИЧ-инфекции, стали ингибиторы протеазы (ИП), с их появлением началось использование комбинированной терапии для подавления репликации вируса на разных этапах его жизненного цикла [172]. Дальнейшее изучение строения вируса и его жизненного цикла привело к возникновению новых классов препаратов – ингибиторов интегразы (ИИ) [109], ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (ННИОТ) и ингибиторов проникновения [164]. В 2022 году был зарегистрирован и стал применяться препарат нового класса – ингибитор капсида (p24) ленакапавир [28; 83; 146; 163].

1.1.1 Строение вириона и структура генома ВИЧ-1

Вирусные частицы ВИЧ-1 имеют диаметр около 120 нм (Рисунок 2 А-Б). Оболочкой вириона является двухслойная липидная мембрана на которой находятся до 72 гликопротеиновых комплексов, состоящих из трех молекул gp120 (SU, тримеры внешнего гликопротеина, расположенные на поверхности вириона) и трех молекул gp41 (TM, трансмембранный связующий белок, пронизывающий липидную оболочку) [75]. Под оболочкой располагается слой матриксного белка p17 (MA), состоящего из 132 аминокислот, и капсид, состоящий из белка p24 (CA) [106; 171]. Внутри капсида находится белково-нуклеиновый комплекс, включающий вирусный геном (две цепочки РНК, которые своими 5'концами связаны с белком p7) и ферменты - обратная транскриптаза (RT, p66), протеаза (PR,

p11) и интегразы (IN, p31). Дополнительно в капсиде содержатся вспомогательные белки *vif*, *vpr* и *nef*, а также факторы, например тРНК_{Lys3}, который используется вирусом на стадии обратной транскрипции.

А) СТРОЕНИЕ ГЕНОМА ВИЧ-1



Б) СТРОЕНИЕ ВИРИОНА ВИЧ-1

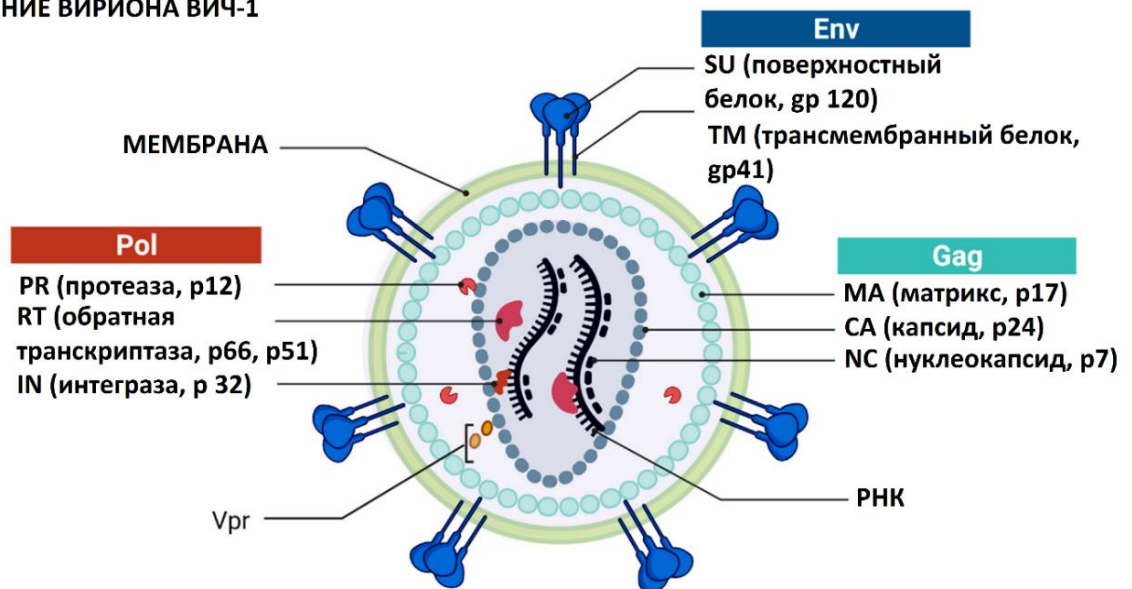


Рисунок 2 – А) Организация генома ВИЧ-1; Б) Строение вириона ВИЧ-1 (Адаптировано “Genome and Structure” в BioRender.com (2025); <https://app.biorender.com/biorender-templates>)

Каждая из двух молекул РНК ВИЧ-1 имеет длину 9749 н.п. и кодирует 3 структурных гена (*gag*, *env* и *pol*) и 6 регуляторных и вспомогательных генов (*tat* и *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu* и *nef*) (Рисунок 2А-Б) [103].

Структурными генами ВИЧ-1 являются: *gag* (*group-specific antigen*), *env* (*envelope*) и *pol* (*polymerase*) [55; 103].

Gag имеет длину около 2000 п.н. и кодирует белки, необходимые для сборки и высвобождения вирусных частиц: матриксный белок p17 (MA) направляет Gag/p55 к плазматической мембране и способствует включению гликопротеинов

вирусной оболочки; капсидный белок р24 (СА) управляет взаимодействиями Gag-Gag во время сборки; нуклеокапсидный белок (NC) упаковывает вирусную геномную РНК; белок р6 необходим для эффективного высвобождения частиц [43; 133].

Env – имеет длину около 2700 н.п. и кодирует поверхностные белки (gp120 и gp41), которые играют важную роль в цикле репликации вируса. С помощью данных гликопротеиновых комплексов происходит слияние вирусной и клеточной мембран во время процесса проникновения. Гликопротеины env синтезируются как полипротеиновый предшественник (gp160), который расщепляется на поверхностный гликопротеин gp120 и трансмембранный гликопротеин gp41. Во время сборки вирусной частицы комплекс gp120/gp41 включается в виде гетеротримерных шипов в липидный слой развивающихся вирионов [103].

Pol – имеет длину около 2900 н.п. и кодирует ферменты, необходимые для репликации вируса: обратная транскриптаза, протеаза и интеграз.

Обратная транскриптаза представляет собой гетеродимер, состоящий из двух субъединиц р66 (66 кДа) и р51 (51 кДа, образуется путем протеолитического расщепления р66). Преобразует вирусную РНК в двухцепочечную ДНК в процессе обратной транскрипции участвуя в процессе синтеза ДНК на матрице РНК, разрушении РНК в составе молекулы РНК-ДНК и достраивания второй цепи ДНК [44].

Протеаза (22 кДа) является вирусным ферментом и существует в виде гомодимера, каждая субъединица которого состоит из 99 аминокислотных остатков, относится к классу аспартатных протеаз и играет критически важную роль в жизненном цикле вируса: расщепляет вирусные полипротеины-предшественники Gag и Gag-Pol на зрелые и функциональные вирусные белки, в результате чего образуются структурные белки и ферменты [178; 184].

Интеграз (32 кДа) вирусный фермент, который играет ключевую роль в жизненном цикле [40]. Его основная функция заключается в участии процесса интеграции (включения) вирусной ДНК в геном клетки-хозяина. Интеграз функционирует как тетрамер и взаимодействует с клеточными белками, одним из

которых является белок LEDGF (хроматин-ассоциированный белок человека), который помогает направлять интегразу к определённым участкам генома. Интеграза ВИЧ-1 состоит из трёх основных доменов: N-концевой цинк-связывающий домен с мотивом HHCC (конкретно для ВИЧ-1 это His12, His16, Cys40, Cys43), каталитический центральный домен (CCD) и C-концевой ДНК-связывающий домен (CTD) [61].

Также ВИЧ-1 содержит гены, кодирующие белки, которые участвуют в регуляторных процессах. На ранних стадиях жизненного цикла особую роль играет белок *tat* (необходим для процессов инициации обратной транскрипции, увеличение ее скорости и регуляции сплайсинга) и *rev* (связывается с RRE (Rev Response Element) генома и участвует в экспорте вирусной мРНК из ядра клетки в цитоплазму и сохранении ее целостности). Данные белки накапливаются в ядре и отвечают за специфическое взаимодействие с РНК вируса. Белок *tat* представляет собой мощный транскрипционный активатор, играющий ключевую роль в репликации вируса почти во всех системах культивирования *in vitro*. Он активен только в присутствии клеточного кофактора циклина T1 [103].

Оба белка, *tat* и *rev*, стимулируют транскрипцию, что приводит к превращению провирусной ДНК ВИЧ-1 в РНК. Они способствуют удлинению РНК ВИЧ-1, участвуют в её транспорте из ядра в цитоплазму и необходимы для трансляции. Белок *rev* также играет роль фактора ядерного экспорта, обеспечивая переход от синтеза регуляторных белков на ранней стадии к производству структурных компонентов вириона на поздней стадии [92; 150].

Вспомогательными являются белки *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu*, которые способствуют вирусной репликации [103].

Nef вызывает подавление экспрессии антигенов CD4, CD8, CD28, CD3, SERINC3/5, тетерина и HLA класса I на поверхности инфицированных клеток. Для этого *nef* вмешивается в механизмы внутриклеточного транспорта, включая везикулы, покрытые клатрином, содержащие белки клеточной поверхности. Снижение экспрессии этих поверхностных маркеров уменьшает противовирусный

иммунный ответ, увеличивает инфекционность ВИЧ и приводит к более высоким темпам вирусной репликации;

Vif – белок, экспрессирующийся на поздних стадиях вирусного цикла, который ингибирует активность АРОВЕС3G (человеческий фермент семейства цитозиндезаминаз, повреждающий вирусную растущую ДНК посредством мутаций (заменяет цитозин (C) на урацил (U) [22];

Vpr является компонентом преинтеграционного комплекса и взаимодействует с компонентами ядерной мембраны, облегчая транспортировку вирусной ДНК в ядро клетки. В отсутствие vpr вирус менее эффективно инфицирует макрофаги и покоящиеся Т-клетки;

Vri блокирует действие противовирусного белка тетерина и способствует выходу вирионов из клетки. Кроме того, vri участвует в деградации комплексов CD4-gp120, увеличивая количество белка env, доступного для вирусной репликации.

1.1.2 Цикл репликации ВИЧ-1

При попадании вируса в организм человека на первом этапе происходит связывание вирусной частицы с рецептором CD4⁺ на поверхности Т-лимфоцитов или клеток макрофагального происхождения (тканевых макрофагов, моноцитов, клеток Лангерганса, эпителиальных клеток кишечника или шейки матки), затем вирусная частица связывается с корецептором (для макрофагов это рецептор CCR5, для Т-клеток — CXCR4) [97]. ВИЧ-1 различаются по своей способности взаимодействовать с клеточными корецепторами – «тропизмом». Вирусы, использующие CCR5 в качестве корецептора - «R5-тропные», CXCR4 - «X4-тропные» [115]. Также некоторые варианты вирусов имеют «двойной тропизм», т.е. могут использовать оба клеточных корецептора.

Вирион с помощью гликопротеина gp120 присоединяется к клеточному рецептору CD4 и корецепторам CCR5 или CXCR-4, на поверхности инфицируемой клетки [126]. Затем гликопротеин gp41 способствует слиянию вирусного капсида с

клеточной мембраной, что приводит к проникновению вируса внутрь клетки (Рисунок 3).

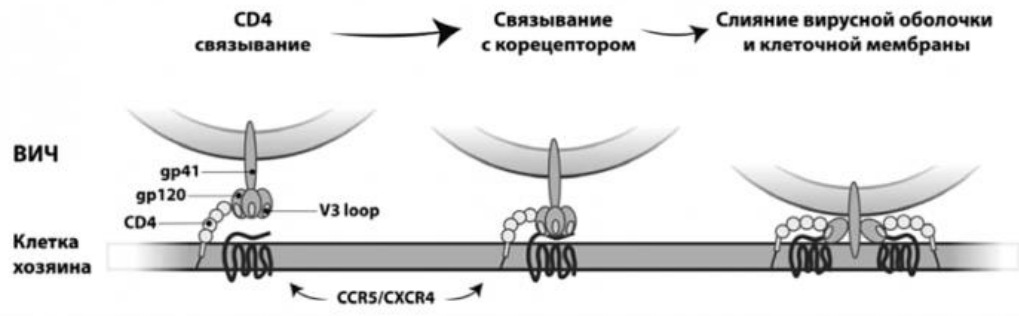


Рисунок 3 – Связывание вирусной частицы с клеткой (Адаптировано из [142])

После слияния вирусной и клеточной мембран вирусный капсид, попадая в цитоплазму, начинает движение к ядру клетки (Рисунок 4). По пути он подвергается процессу депротеинизации (высвобождение РНК и других вирусных компонентов).

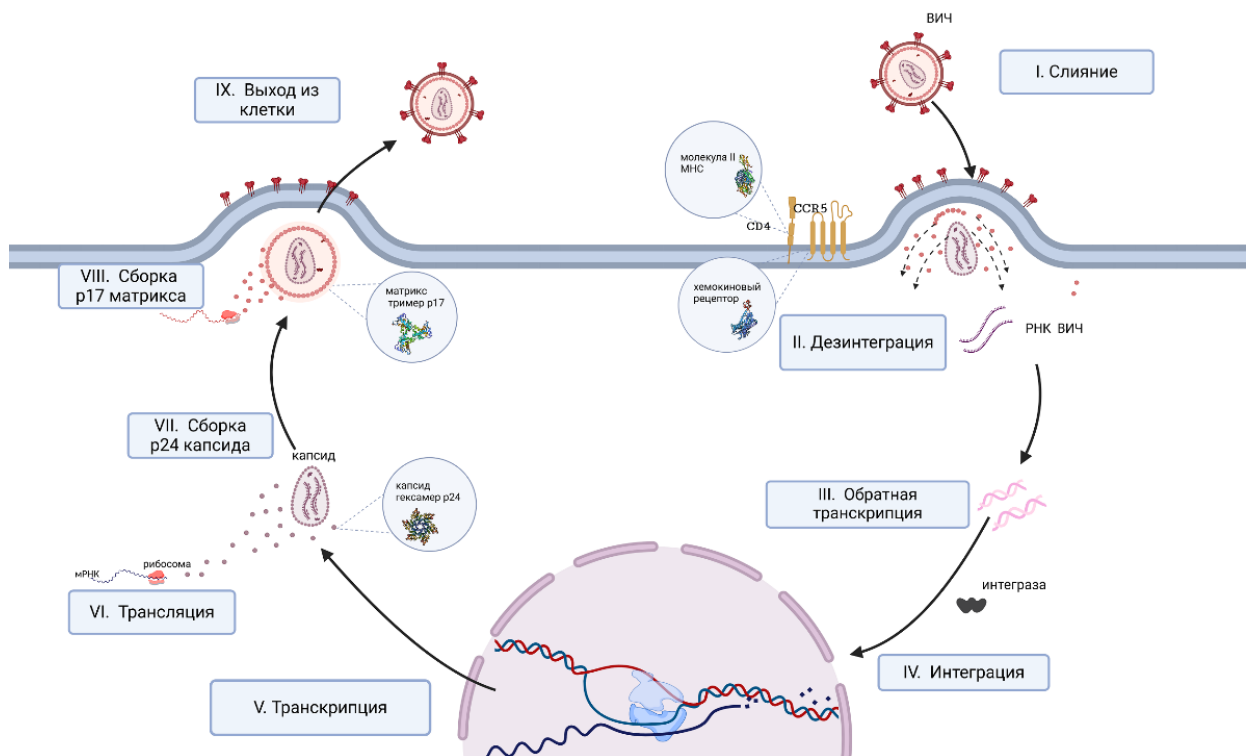


Рисунок 4 – Схема жизненного цикла ВИЧ (Адаптировано из [5])

Этап 2. Происходит удлинение праймера с образованием (–)первой цепи ДНК, которая содержит копии 5'-геномной последовательности U5- и R-областей. По мере удлинения праймера РНКазы Н разрушают последовательность РНК, которая уже была обратно транскрибирована.

Этап 3 - «первый прыжок». Для удлинения (–) цепи одноцепочечная ДНК переносится на 3'-конец генома.

Этап 4. После переноса (–)цепи продолжается ее удлинение и деградация РНКазы Н. Начинается синтез (+)цепи ДНК, который иницируется 15-нуклеотидным 3'-РРТ (полипуриновым тракт), расположенным перед 3'-геномной последовательностью U3. Вторым 15-нуклеотидным РРТ (сРРТ) с той же последовательностью, что и 3'-РРТ, расположен в центре генома в области, кодирующей интегразу.

Этап 5. Обратная транскрипция копирует области U3, R и U5 в минус-цепи ДНК, а также 18 нуклеотидов с 3'-конца праймера тРНК, тем самым восстанавливая PBS. Образованный продукт обозначается как (+)одноцепочечная ДНК.

Этап 6. Праймеры тРНК и РРТ в конечном итоге удаляются РНКазой Н из (–) и (+) цепей ДНК.

Этап 7. Перенос (+)цепи проводится отжигом комплементарных последовательностей PBS на 3' концах (+)одноцепочечной ДНК и (–)одноцепочечной ДНК.

Этап 8 – «второй прыжок». Затем следует кольцевание двух цепей ДНК и смещение рамки считывания для получения последовательностей LTR.

Шаг 9. (–) и (+) -цепи ДНК удлиняются, в результате чего получается линейная двуцепочечная ДНК с LTR на каждом конце.

В процессе обратной транскрипции могут возникать мутации (примерно от пяти до десяти ошибок на геном ВИЧ-1 за раунд репликации), что объясняет большую генетическую изменчивость ВИЧ-1. Как следствие в организме ВИЧ-1 представлен множеством генетических вариантов («квазивидов»).

В результате обратной транскрипции получается провирусная ДНК, которая при объединении с белками вируса и клетки образует преинтеграционный

комплекс (PIC), транспортирующийся в ядро клетки и внутри ядра с помощью вирусного фермента – интегразы, провирусная ДНК встраивается в геном клетки-хозяина.

Процесс интеграции ВИЧ происходит в два этапа: 3'-концевой процессинг и 3'-концевое присоединение (перенос цепи). В ходе реакции процессинга интегразы вируса удаляет динуклеотид GT с каждого конца последовательностей провирусной ДНК, полученных в процессе обратной транскрипции, оставляя следующий динуклеотид CA со свободной 3'-гидроксильной группой (Рисунок 6).

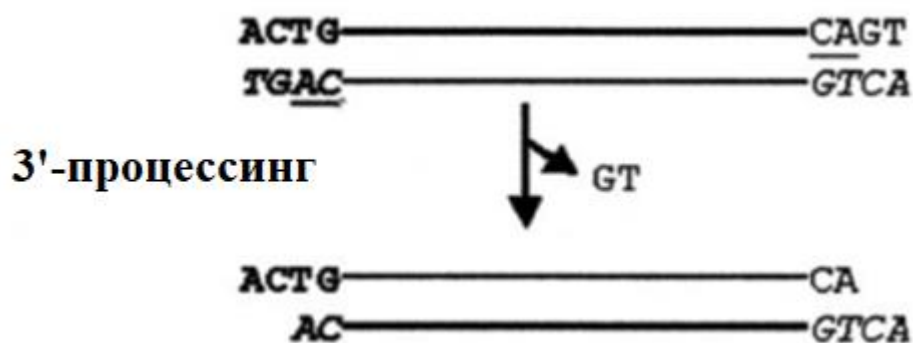


Рисунок 6 – Реакция 3'-концевой процессинга ВИЧ-1 (Адаптировано из [40])

Затем начинается реакция переноса цепи, в которой интеграза расщепляет целевую ДНК, встраивая оба 3'-конца провирусной ДНК. Процесс интеграции ВИЧ завершается встройкой 5'-концов провирусной ДНК и достройкой пяти недостающих нуклеотидов (Рисунок 7) [41].

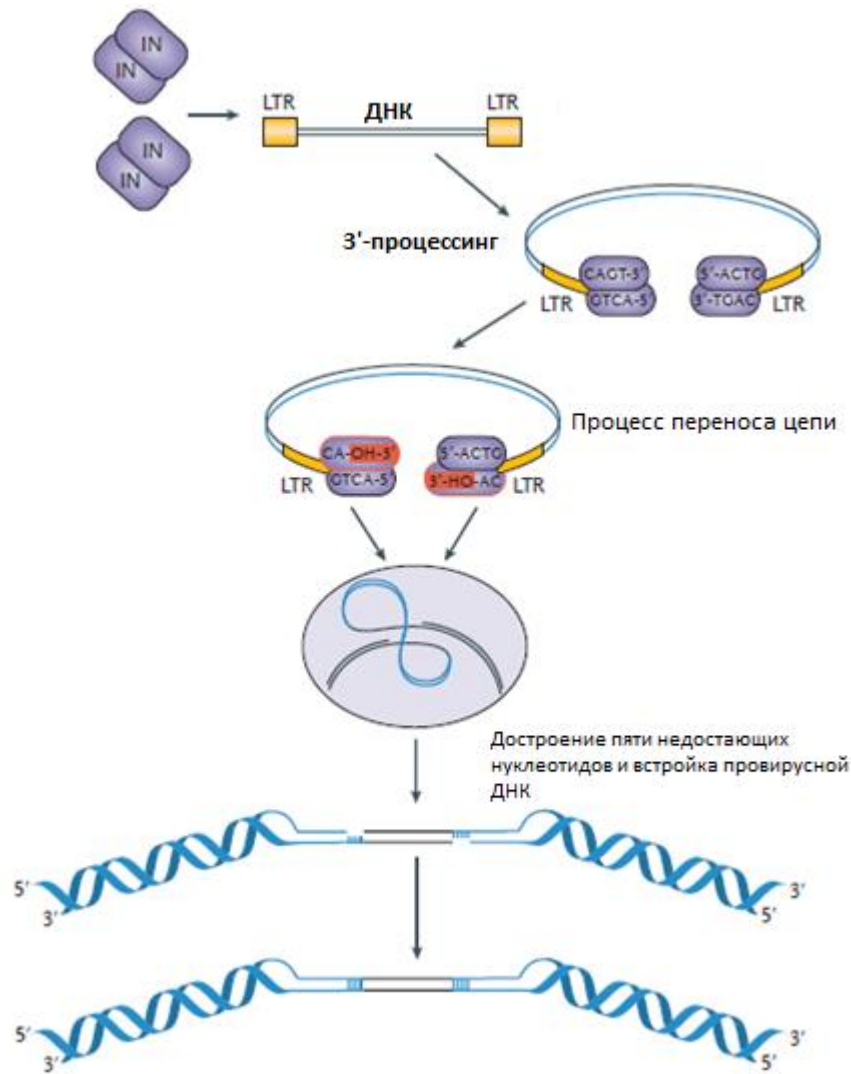


Рисунок 7 – Процесс интеграции вирусной ДНК в геном клетки (Адаптировано из [41])

Полученный провирус служит матрицей для синтеза вирусной РНК, необходимой для производства белков в рибосомах клетки. Синтезированные в ядре иРНК (предшественник мРНК) подвергается 5'-концевому кэпированию, 3'-концевому полиаденилированию и сплайсингу, в результате которого образуются различные мРНК, используемые для синтеза: несплайсированной РНК (белки gag и gag-pol); не полностью сплайсированной РНК (vif, vpr, vpr и env) и полностью сплайсированной РНК (tat, rev и nef) (Рисунок 8).

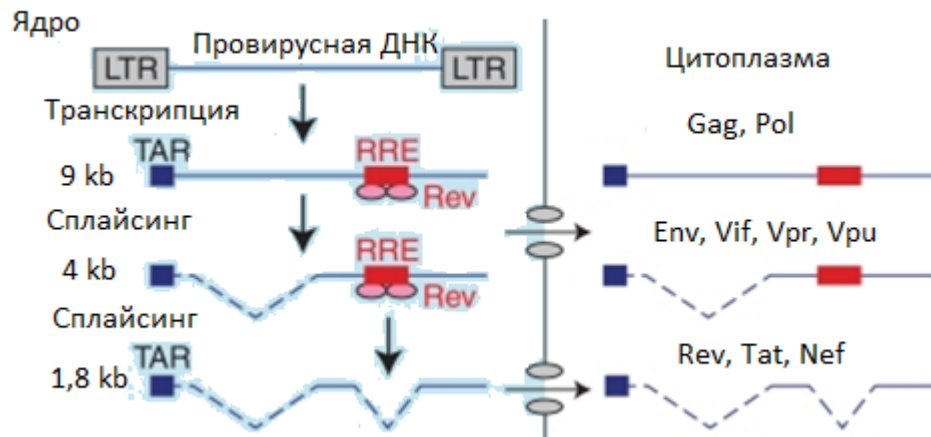


Рисунок 8 – Образование несплайсированных, сплайсированных и полностью сплайсированных РНК ВИЧ-1 (Адаптировано из [97])

Затем синтезированные белки и молекулы вирусной РНК транспортируются к местам сборки дочерних вирионов - к мембране.

В ходе сборки вирусной частицы протеаза расщепляет белки-предшественники до функциональных компонентов: Gag-Pol разрезается для высвобождения отдельных структурных белков МА (p17), СА (p24) и NC (p7), а также ферментов протеазы (PR), обратной транскриптазы (RT) и интегразы вируса (IN).

Несплайсированная геномная РНК ВИЧ-1 экспортируется из ядра и служит матрицей для трансляции Gag и Gag-Pol, которая происходит в рибосомах. Gag образуется как предшественник полипротеина массой 55 кДа, Pr55 Gag, в то время как полипротеин Gag-Pol массой 160 кДа образуется посредством сдвига рамки считывания на рибосоме, происходящего во время трансляции. Геномная РНК димеризуется и взаимодействует с областью нуклеокапсида (НК) Gag, выступая в качестве геномной РНК, которая упаковывается в незрелые частицы. Молекулы Gag взаимодействуют друг с другом и с липидными микродоменами на плазматической мембране (ПМ), формируя незрелую решетку Gag и вызывая искривление мембраны. Тем временем, однократно сплайсированная РНК ВИЧ-1 экспортируется из ядра и становится матрицей мРНК для трансляции Env (и Vpu) на рибосомах, связанных с эндоплазматическим ретикуломом (ЭР). Env образует тримеры в ЭР и продвигается по секреторному пути, где происходит расщепление

и гликозилирование. Достигнув ПМ, Env эндоцитируется посредством клатрин/АР-2-зависимого процесса. Расщепление Gag протеазой ВИЧ-1 приводит к значительным структурным перестройкам и приводит к формированию зрелого ядра ВИЧ, данный процесс называется созреванием и происходит одновременно с почкованием [158]. Зрелые инфекционные частицы завершают процесс почкования и высвобождаются из клетки.

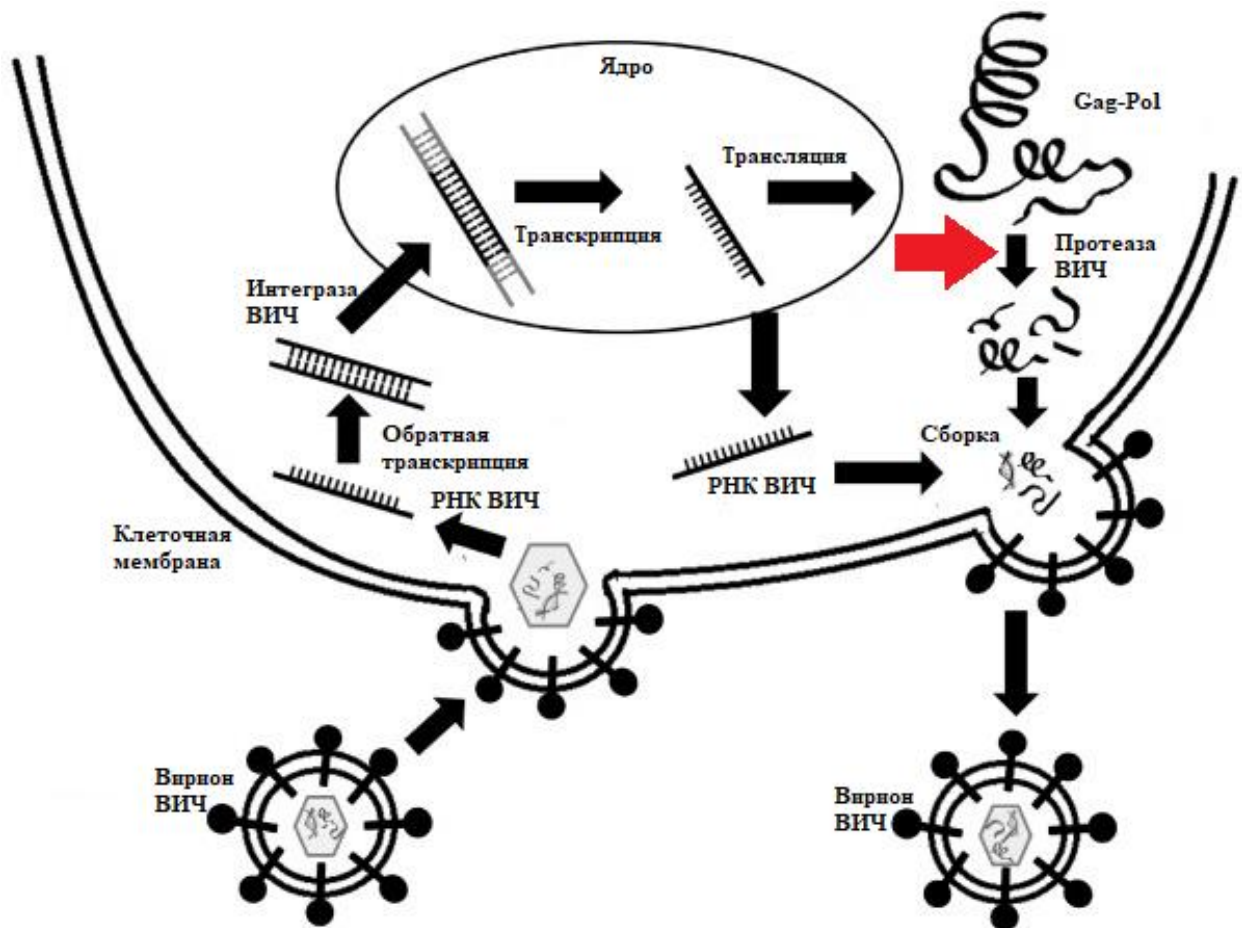


Рисунок 10 - Момент воздействия протеазы на полипротеин-предшественник Gag-Pol (красная стрелка) и процесс завершения сборки вириона 1 (Адаптировано из [196])

1.1.3 Антиретровирусная терапия (АРТ)

С момента открытия ВИЧ-1 в 1983 году и по сегодняшний день жизненный цикл вируса был глубоко изучен, что позволило разработать эффективные терапевтические препараты, подавляющие размножение ВИЧ-1 в организме человека [35].

Первым одобренным препаратом для лечения ВИЧ-инфекции является азидотимидин (AZT), который был выпущен почти через пять лет после открытия ВИЧ-1 и разрешен для лечения в 1987 году. Данный препарат стал первым соединением класса нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ) [167]. Лечение одним препаратом быстро выявило кратковременность успеха терапии, поскольку вирус быстро приобретал лекарственную устойчивость и имел высокую токсичность. Стало ясно, что одного препарата недостаточно для успешной терапии и в конце 80-х последовало появление других НИОТ-препаратов, таких как зальцитабин (Hivid (ddC), диданозин Videx (ddl) и ставудин (Zerit (d4T) [151]. Все они не смогли обеспечить длительный контроль виремии, поскольку все имели схожие механизмы действия и были нацелены только на один этап цикла репликации вируса [32].

В 1995-1996 годах были одобрены: первый ингибитор протеазы (ИП) саквинавир (SQV) и ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы (ННИОТ) невирапин (NVP). Сразу была предложена модель лечения, которая подразумевала одновременное применение препаратов, направленных на разные этапы жизненного цикла вируса. Обобщение клинической практики доказало, что комбинации НИОТ, ННИОТ и ИП способны длительное время замедлять прогрессирование заболевания [42; 93].

Использование новой модели лечения показало свою эффективность, но к началу 2000-х годов возникли препятствия в использовании АРТ. Высокая стоимость лечения, неудобное дозирование и долгосрочная токсичность способствовали плохому соблюдению режима лечения и появлению вирусов с лекарственной устойчивостью у многих пациентов [42]. Для тех пациентов, у

которых развилась резистентность к противовирусным препаратам, варианты лечения стали ограниченными и для предотвращения дальнейшего прогрессирования заболевания требовались более сложные схемы. Все это простимулировало дальнейшее изучение биологии ВИЧ для создания новых классов препаратов [167].

В 2000-ых годах появились ингибиторы интегразы (ИИ), ингибитор слияния энфувиртид (Т-20) и низкомолекулярный антагонист CCR5-корцептора маравирок (MVC) [80], а также новые препараты из ранее разработанных классов АРТ, которые позволили повысить эффективность терапии и превратить ВИЧ-инфекцию в управляемое хроническое инфекционное заболевание [42; 133; 135].

В настоящее время для лечения ВИЧ-инфекции применяют комбинированную антиретровирусную терапию, в которую входят шесть групп препаратов, направленных на различные этапы жизненного цикла вируса [5; 102; 125] (Рисунок 11).

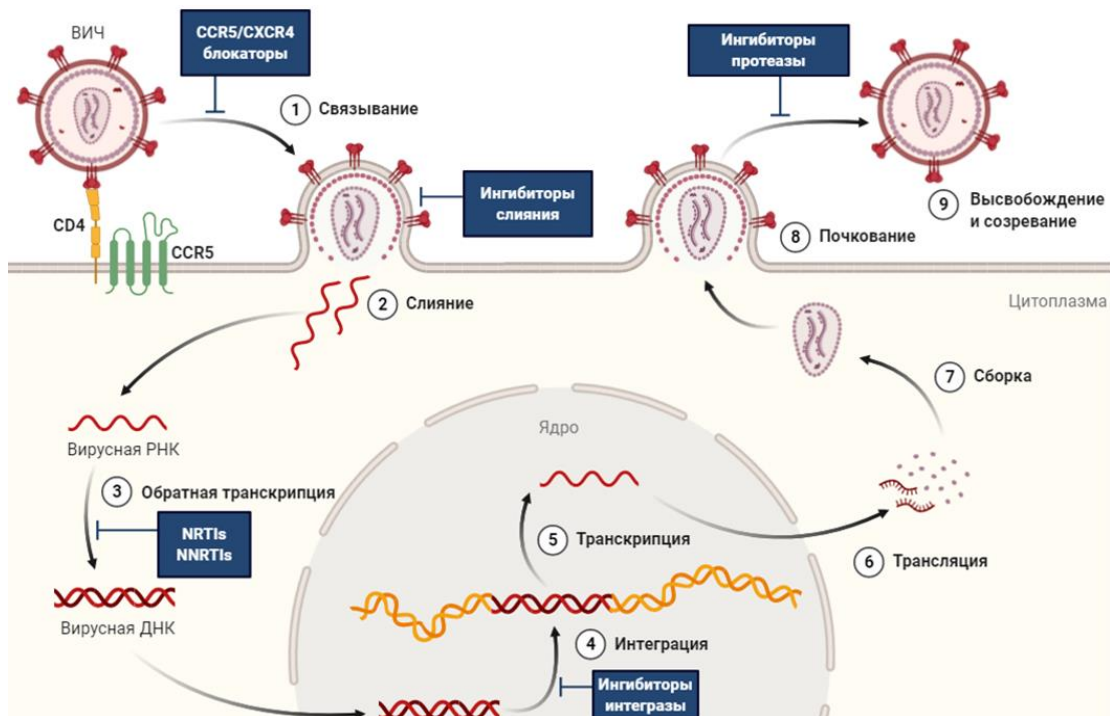


Рисунок 11 – Жизненный цикл ВИЧ-1 с указанием моментов для воздействия АРТ (Адаптировано из [99])

Ингибиторы проникновения - класс препаратов, блокирующие прикрепление [147] или проникновение вируса в клетку [180] (Рисунок 12). Ингибиторы проникновения ВИЧ-1 были разработаны на основе нескольких механизмов действия: ингибиторы связывания gp120-CD4, ингибиторы связывания gp120-корцептора и ингибиторы слияния [62].

Энфувиртид (Фузеон) является первым одобренным пептидным ингибитором ВИЧ-1 и действует как ингибитор слияния ВИЧ-1, связываясь с областью gp41 ВИЧ-1.

Маравирок (Selzentry) является первым в своем классе и единственным одобренным FDA препаратом в качестве ингибитора CCR5 для лечения пациентов с ВИЧ-1, инфицированных R5-тропным вирусом. Было обнаружено, что маравирок эффективен при нарушении связывания gp120-CCR5 и слияния вирусной и клеточной мембран, необходимого процесса проникновения ВИЧ-1 в клетку [170].

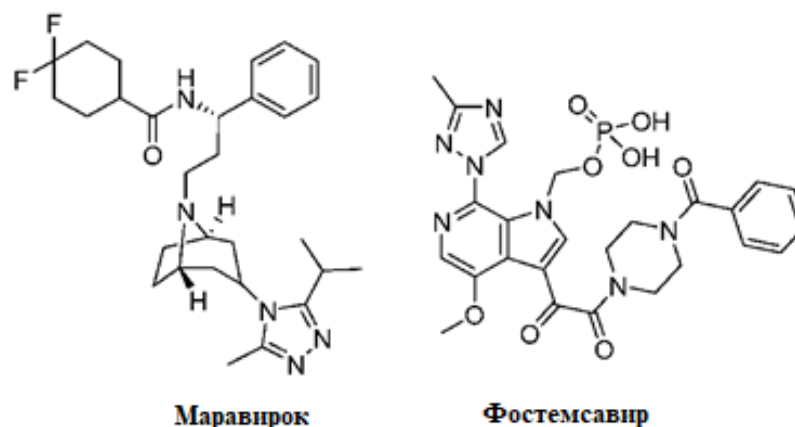


Рисунок 12 – Химическая структура маравирока (антагониста CCR5) и фостемсавира (ингибитора прикрепления)

В 2020 году для лечения пациентов с ВИЧ был одобрен фостемсавир [98]. Данный препарат стал применяться в комбинации с другими АРТ-препаратами для лечения ВИЧ-1 с множественной лекарственной устойчивостью у взрослых пациентов с ограниченными возможностями антиретровирусной терапии [120]. Также продолжается поиск новых молекул-ингибиторов проникновения [104].

Большой упор при разработке антиретровирусных препаратов был посвящен поискам препаратов, блокирующих функции обратной транскриптазы ВИЧ-1. В связи с этим было разработано и одобрено множество лекарственных средств, направленных на подавление активности обратной транскриптазы ВИЧ-1. Данные препараты относятся к двум классам АРТ: нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы и ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы.

Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ). Направлены на подавление вирусного фермента – обратной транскриптазы [8; 44; 185] (Рисунок 13). Данные препараты являются аналогами нуклеозидов/нуклеотидов, но отличаются от них незначительными изменениями в молекуле рибозы. Когда молекула препарата встраивается в синтезирующуюся ДНК, процесс её синтеза останавливается. В зависимости от того к какому именно нуклеозиду или нуклеотиду аналогична молекула препарата различают аналоги тимидина, цитидина, аденина и гуанина [177].

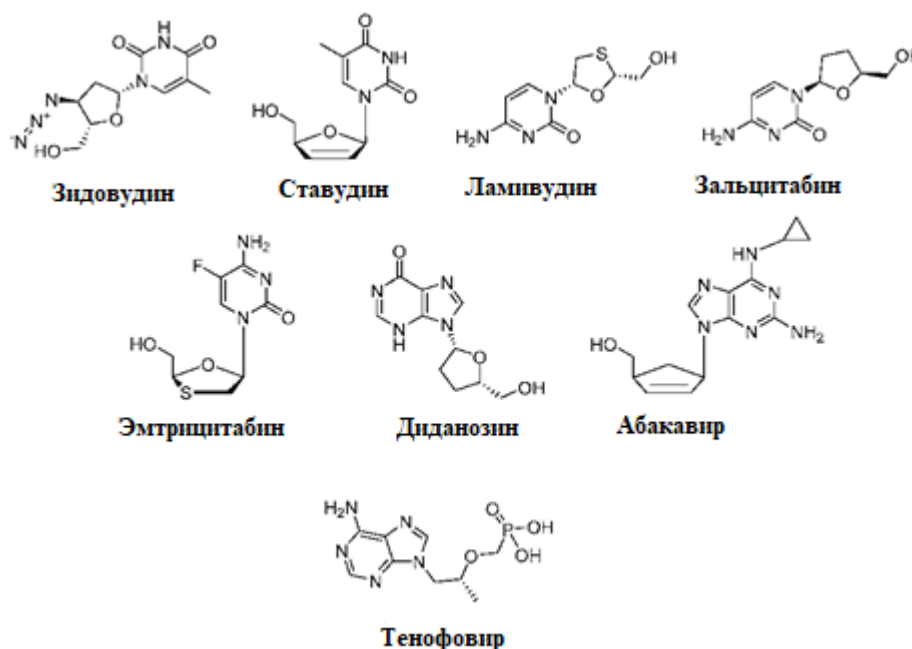


Рисунок 13 – Химическая структура одобренных Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (США) НИОТ

Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (ННИОТ) направлены также на обратную транскриптазу ВИЧ, но являются

неконкурентными ингибиторами фермента [44; 52; 175] (Рисунок 14). Молекулы препарата связываются с аллостерическим центром обратной транскриптазы ВИЧ, влияющим на мобильность и гибкость центра полимеризации, приводя к резкому снижению эффективности обратной транскриптазы ВИЧ-1 [171; 176].

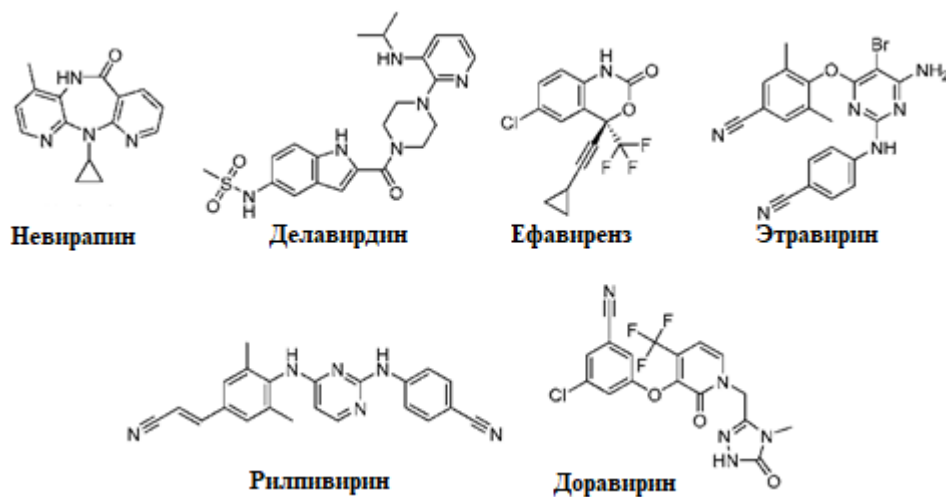


Рисунок 14 – Химическая структура одобренных Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (США) ННИОТ

Ингибиторы протеазы (ИП) подавляют репродукцию ВИЧ, связываясь с активным центром фермента протеазы [110; 162] (Рисунок 15). Происходит нарушение способности протеазы разрезать вирусный полипротеин gag-pol на функциональные субъединицы. Тем самым протеолитический сплайсинг прекращается и образуются неинфекционные вирусные частицы [112].

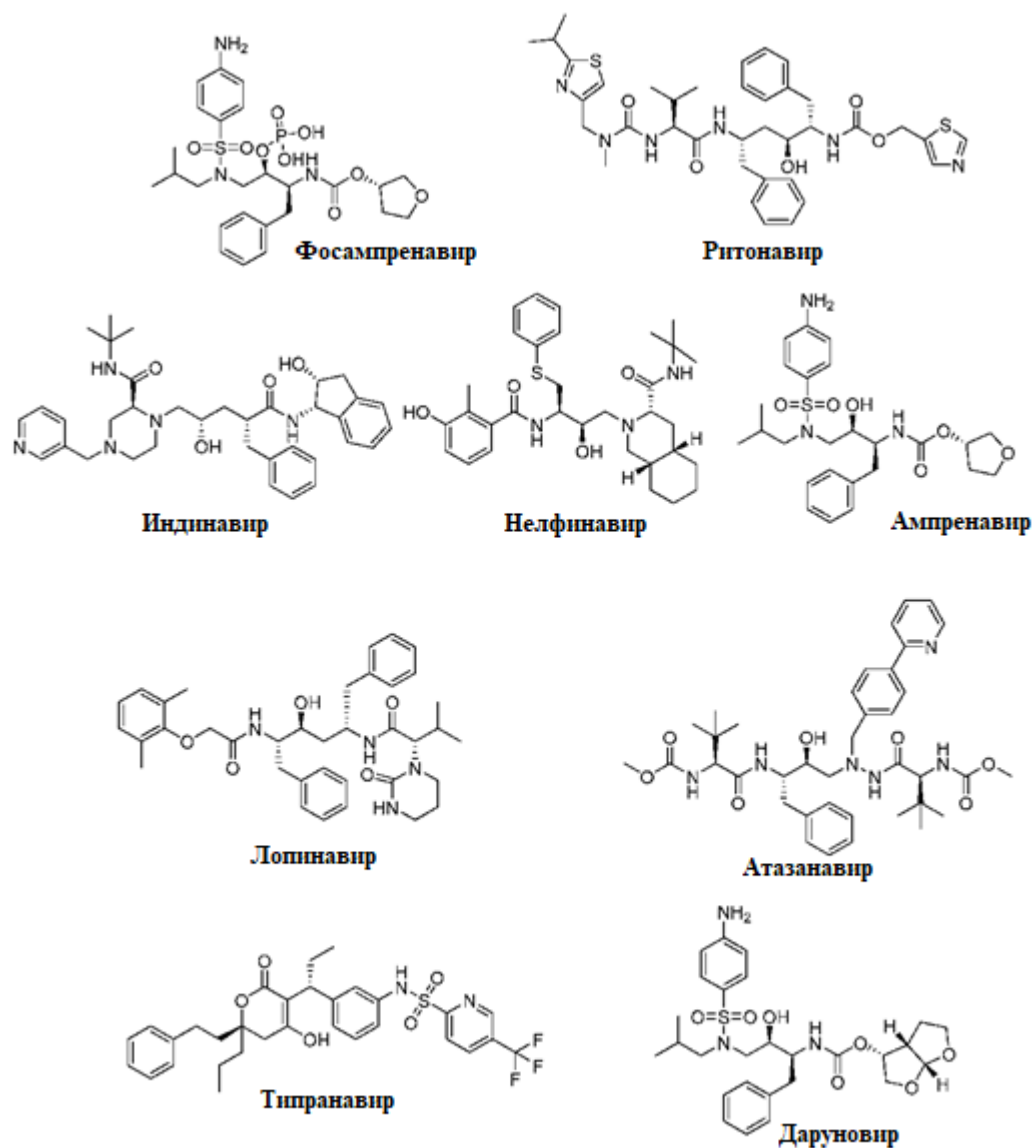


Рисунок 15 – Химическая структура одобренных Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (США) ингибиторов протеазы ВИЧ-1

Ингибиторы интегразы (ИИ) — подавляют активность фермента интегразы, что делает невозможным встраивание вирусной ДНК в геном клетки, с помощью связывания с ионом магния в активном центре фермента или связываться с С-концевым доменом фермента, который отвечает за связывание с ДНК [107; 109] (Рисунок 16).

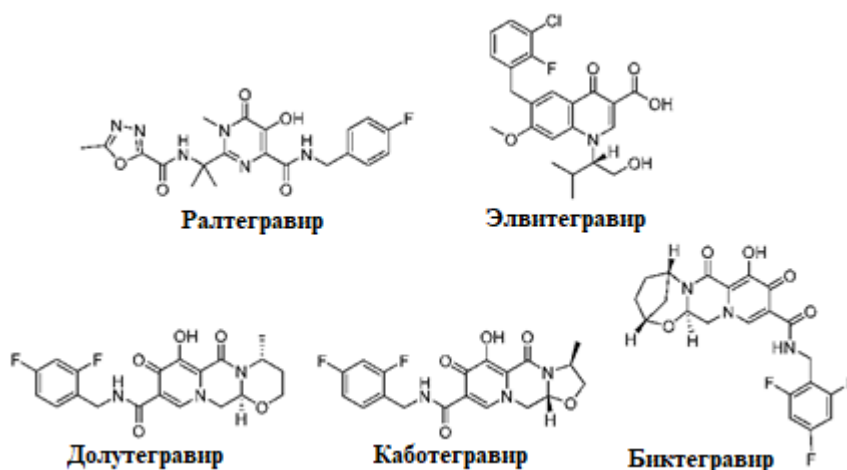


Рисунок 16 – Химическая структура одобренных Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (США) ингибиторов интегразы ВИЧ-1

Первым препаратом нового класса *ингибиторов капсида* (p24) является ленакапавир, разработанный Gilead Sciences Inc. [24]. В декабре 2022 года FDA (США) одобрило ленакапавир в комбинации с другими антиретровирусными препаратами для клинического применения у пациентов с множественной лекарственной устойчивостью ВИЧ-1. Ленакапавир (GSK-6207) является производным индазола и первым в своем классе одобренным ингибитором капсида длительного действия [60]. Благодаря своей высокой растворимости в липидах и проницаемости ленакапавир можно вводить перорально с интервалом дозирования до одной недели или в виде подкожных инъекций два раза в год [159].

1.2. Потенциальные молекулы-ингибиторы

Прогресс в области АРТ позволил значительно снизить смертность и заметно улучшить качество жизни ЛЖВ. Однако лекарственная устойчивость, токсичность, связанная с лечением, обязательное поддержание высокого уровня приверженности и необходимость пожизненной терапии остаются основными проблемами для успешного лечения.

Особое внимание было уделено исследованию различных подходов к использованию РНК-технологий и генной терапии для борьбы с различными заболеваниями [127; 165] и в том числе с ВИЧ-инфекцией [16; 36; 51; 81; 101; 140; 173; 181; 182]. С 1994 года было зарегистрировано более 35-ти клинических испытаний, исследующих новые способы ингибирования репликации вируса, таких как адаптивный перенос CAR-T-клеток, моноклональные антитела или редактирования генома с помощью CRISPR-Cas технологии [21; 29; 37; 87; 149; 186; 187], а также создания мРНК-вакцин [179].

За последние годы достигнут значительный прогресс в разработке инновационных методов клеточной и генной терапии для лечения инфекционных заболеваний [23; 155]. Генная терапия предполагает использование нуклеиновых кислот для восстановления, замены, добавления, подавления или удаления генетических последовательностей в геноме клеток человека в терапевтических, диагностических или профилактических целях [15; 169]. Недавние разработки в области новых методов точечной модификации нуклеиновых кислот привели к тому, что терапия на основе нуклеиновых кислот стала новым терапевтическим подходом среди других [38].

Синтез олигонуклеотидов был открыт и стал развиваться начиная с 1950-х годов (Рисунок 17) [94; 118; 143]. Несмотря на быстрое развитие методов синтеза и появление новых химических модификаций [114; 129], изучение олигонуклеотидов в качестве противовирусных препаратов впервые было проведено в 1978 году. Замецник и Стивенсон провели исследование способности антисмысловых олигодезоксирибонуклеотидов (ODN) ингибировать репликацию

вируса саркомы Рауса (RSV) [156]. Полученные данные подтвердили способность олигодезоксирибонуклеотидов подавлять репликацию вируса *in vitro* и послужили отправной точкой для дальнейших исследований.

Использование стратегии применения антисмысловых олигонуклеотидов (ASO) в терапевтических целях считается перспективным средством и на сегодняшний день более десяти препаратов получили разрешение на продажу от Управления по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) для лечения различных заболеваний, включая первый одобренный ASO-препарат Витравен для лечения цитомегаловирусного ретинита у ЛЖВ [30]. Также олигонуклеотиды применяются в качестве специфического лечения моногенных заболеваний и используются, например при болезни Гентингтона, муковисцидозе, спинальной мышечной атрофии и миодистрофии Дюшенна [17; 81; 100; 119; 145].

1.2.1 Препараты на основе модифицированных олигонуклеотидов

Олигонуклеотиды являются синтетическими одноцепочечными молекулами РНК или ДНК со средней длиной от 12 до 25 нуклеотидов, которые комплементарны последовательности их мишени, что обеспечивает специфичность их действия [50; 70]. Как правило они являются химическими модифицированными для улучшения их стабильности, снижения восприимчивости к разрушению нуклеазами, повышения специфичности и сродства их связывания с РНК-мишенью [34]. Олигонуклеотиды могут связываться с последовательностями РНК на различных стадиях их жизненного цикла, включая пре-мРНК, иРНК-рибонуклеарный белок или микроРНК [20; 86; 88].

Нуклеотидная последовательность молекул определяется мишенью, в то время как химический состав остова определяет его фармакокинетические свойства, например стабильность, растворимость и метаболизм [59]. Комбинация мишень/химическая модификация позволяет разрабатывать соединения для воздействия на заданную последовательность, обеспечивая значительный уровень

универсальности по сравнению с традиционными фармацевтическими препаратами [78; 95].

Принцип антисмыслового воздействия олигонуклеотидов можно разделить на два основных механизма [34; 70]: олигонуклеотид может связываться со своей целевой последовательностью (РНК) посредством спаривания оснований Уотсона–Крика (Рисунок 17), индуцируя расщепление РНК РНКазой Н или может вызывать блокирование РНК (стерические блокаторы) за счет расширенного связывания с мишенью в геноме (Рисунок 18).

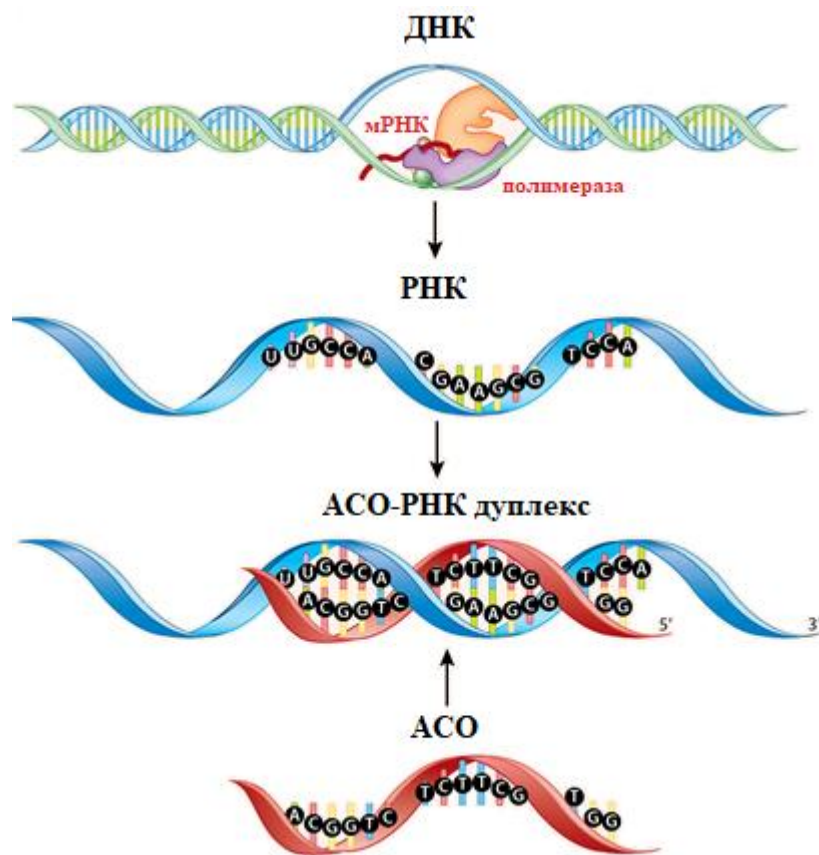


Рисунок 17 – Антисмысловый олигонуклеотид (АСО) связывается с целевой РНК. РНК-полимераза транскрибирует РНК с ДНК-матрицы. АСО (*красный*) связывается с целевой РНК (*синий*) по правилам спаривания оснований Уотсона–Крика (Адаптировано из [26])



Рисунок 18 - Механизм действия антисмысловых олигонуклеотидов, действующий по принципу «стерического блокирования». Олигонуклетид (красный) связываются с комплементарными участками матричной РНК (синий) и физически (стерически) блокируют работу клеточных ферментов или рибосом. (Адаптировано из [165])

Несмотря на значительные возможности данных подходов, ряд проблем препятствуют широкому клиническому применению олигонуклеотидов [26; 67]. Не модифицированные олигонуклеотиды быстро разлагаются под действием нуклеаз и выводятся из организма, поэтому считаются слишком нестабильными для терапевтического применения. В связи с этим проводимые исследования в области дизайна и функциональной доставки олигонуклеотидов сосредоточены на повышении стабильности, специфичности и эффективности проникновения через биологические мембраны тканей и клеток мишеней [67].

Разработка химических модификаций проводится начиная с конца 1970-х годов (Рисунок 19). Необходимость химической модификации олигонуклеотидов первого поколения состояла в том, чтобы уменьшить деградацию под действием нуклеаз путем замены одного из атомов кислорода в фосфатной группе либо на серные группы (фосфоротиоаты) [131], либо на метильные группы (метилфосфонаты), либо на амины (фосфорамидаты) [26; 79].

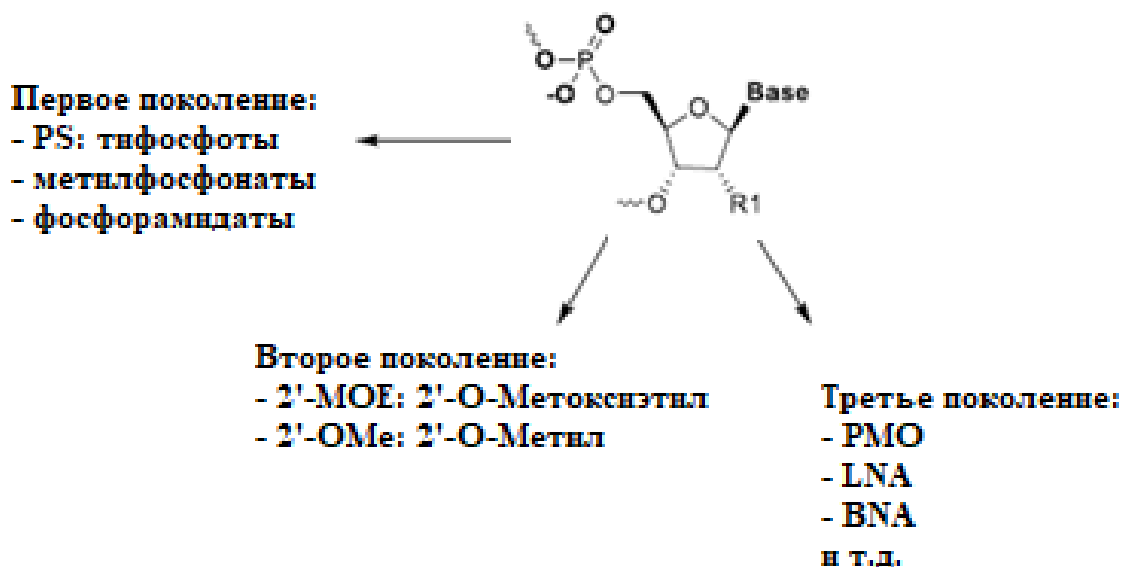


Рисунок 19 – Химические модификации олигонуклеотидов первого, второго и третьего поколения (Адаптировано из [131])

Сегодня одной из наиболее хорошо изученных и широко применяемых химических модификаций является фосфотиоатная модификация (PS). Синтез фосфотиоатных олигонуклеотидов был разработан Стеком [154] и дальнейшее его изучение и внедрение подтвердило эффективность его применения [46; 74]. Изучение фармакокинетики одноцепочечных фосфотиоатных (PS)-модифицированных олигонуклеотидов показало равномерное биораспределение и высокую способность поглощения клетками антисмысловых олигонуклеотидов [49; 70; 79]. Также при исследовании фармакокинетики была продемонстрирована высокая способность связывания олигонуклеотидов с белками сыворотки, такими как альбумин, что способствовало поддержке высокой концентрации таких олигонуклеотидов в кровотоке достаточно долго для распределения по тканям организма. При исследовании внутривенного или подкожного введения (PS)-модифицированных олигонуклеотидов фаза распределения из плазмы в ткани составляла от нескольких минут до нескольких часов, за которым следовала длительная фаза выведения [45; 47]. PS-модифицированные олигонуклеотиды широко распределяются в большинстве периферических тканей, при этом почки и печень накапливают самые высокие концентрации. Способность PS-модифицированных олигонуклеотидов к накоплению в организме и длительной

циркуляции может способствовать повышению эффективности их терапевтического воздействия [45; 47]. Важно отметить, что PS- модификация активирует РНКазу H, которая расщепляет целевую мРНК в комплексах ASO/мРНК. Данные характеристики фосфотиоатных олигонуклеотидов привели к созданию Фомивирсена, 21-мерный 2'-дезоксинуклеотида-фосфотиоатного олигонуклеотида, который считается олигонуклеотидом первого поколения и предназначен для нацеливания на фрагмент IE2 мРНК цитомегаловируса (ЦМВ) [45; 47; 73].

Это побудило исследователей разработать новые поколения ASO, которые были бы менее токсичными и более специфичными. Второе поколение ASO характеризуется алкильными модификациями в 2' положении рибозы [71]. Введение кислородсодержащей группы приводит к образованию 2'-О-метил (2'-OME) и 2'-О-метоксиэтил (2'-MOE) нуклеотидов. Данные модификации проявили меньшую токсичность, чем PS, и имели немного более высокое сродство к мишени. Антисмысловой эффект данных модификаций был обусловлен стерической блокадой трансляции [54]. После этого последовало развитие терапии для лечения таких заболеваний как диабетическая ретинопатия (антисмысловой олигонуклеотид второго поколения Iso-007, нацеленный на мРНК киназы C-gaf), гомозиготная семейная гиперхолестеринемия (антисмысловой олигонуклеотид второго поколения, Мипомерсен, специфически связывающийся с мРНК аполипопротеина В-100 (apoB-100) и наследственного транстретин-опосредованного амилоидоза (антисмысловой олигонуклеотид Инотерсен (Тегседи) [79; 132; 138].

Химические модификации олигонуклеотидов третьего поколения включают замкнутые нуклеиновые кислоты (LNA) и все чаще используются в качестве химической модификации олигонуклеотидов [71; 183]. Locked nucleic acid (LNA)-модификация представляет собой нуклеотиды, в которых дезоксирибоза изменена дополнительным мостиком, соединяющим 2'-кислородную группу с углеродом в сахарном фрагменте. Это создает фиксированную конформацию, которая повышает температуру плавления молекулы, что делает ее более устойчивой к

денатурации и действию нуклеаз [58]. Исследование LNA-модифицированных олигонуклеотидов позволило показать способность ингибирования репродукции вирусных заболеваний и других заболеваний, за счет увеличенной стабильности образующихся дуплексов олигонуклеотида с мишенью, повышенной аффинности к целевым последовательностям и большей устойчивости к нуклеазам [69; 137], что делает данную модификацию перспективной для исследования в отношении ВИЧ-1 [39; 76].

1.2.2 Препараты на основе природных соединений и химически синтезированных компонентов

Природные соединения и их синтетические производные являются крайне важными компонентами эффективных лекарственных средств [1; 6; 72]. Для борьбы с вирусными инфекциями исследуется широкий спектр природных лекарственных соединений, используемых для подавления инфекционного процесса [2; 6; 19]. Сюда входят препараты, которые влияют на иммунную систему, регулируют патологические процессы, устраняют симптомы и могут взаимодействовать с вирусом, как раз последние соединения являются целью поиска и играют ключевую роль, поскольку взаимодействуют непосредственно с вирусной частицей и направлены на конкретную мишень в жизненном цикле вируса [128].

В настоящее время существует широкий спектр противовирусных препаратов, которые различаются по своему механизму действия. Основные направления в разработке таких препаратов включают в себя: синтез молекул, обладающих антивирусной активностью; выделение отдельных компонентов или их смесей из природных источников; молекулярный дизайн и анализ взаимосвязи между структурой вещества и его активностью [11; 12; 13].

Большой интерес представляют низкомолекулярные соединения, относящиеся к метаболитам различных растений [11; 12; 13]. Проведено не мало исследований по изучению возможности применения различных природных агентов в качестве ингибиторов ВИЧ-1, таких как дитерпиноиды абиетанового ряда, кассанового и

розанового типов, а также атизанового типа. Например, выделенные из наземной части растения *Rosmarinus officinalis* L. карнозоловая кислота и ее производные проявили себя не только как активные ингибиторы ВИЧ-1, но и продемонстрировали ингибирующее действие против респираторных вирусов [11; 12; 13].

Среди коммерчески доступных соединений природного ряда особое внимание заслуживают вещества моно- и тритерпенового ряда [11; 12; 13]. В настоящее время доступные соединения терпенового ряда стали удобным источником исходных структурных блоков в синтезе эффективных противовирусных агентов [11; 12; 13]. Дитерпены применяются при лечении различных заболеваний, а его производное таншинон IIА и карнозоловая кислота проявили противовирусную активность в отношении SARS-CoV-2 при изучении *in vitro*. Также выделенный из растения *Salvia miltiorrhiza* компонент криптотаншинон был исследован в отношении гриппа А и проявил противовирусную активность в микромолярных концентрациях [11; 12; 13] (Рисунок 20).

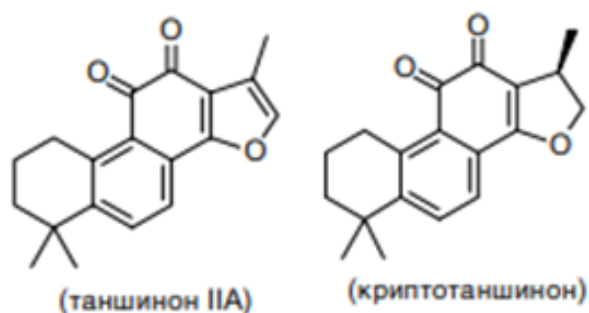


Рисунок 20 - Структуры таншинона IIА и криптотаншинон (Адаптировано из [12])

Стоит отметить, что соединения изопимарановых дитерпиноидов, выделенные из экстракта корневищ растения *Kaempferia pulchra*, оказали ингибирующее действие в отношении белка Vpr ВИЧ-1 в диапазоне от 1,56 до 6,25 мкМ, что может указывать на перспективность дальнейших исследований дитерпиноидов в качестве ингибиторов ВИЧ-1 [11; 12; 13].

Перспективными потенциальными противовирусными соединениями являются агенты, сочетающие в себе в одной молекуле природный терпеновый

блок и азотсодержащий гетероцикл, соединенные между собой различными линкерами. Каркасные монотерпеноиды с триметилбицикло-гептановым остовом (камфора, фенхон, борнеол) являются важными фармакофорными фрагментами, обеспечивающими активность в отношении различных вирусов, а наличие третичного азота, способного протонироваться, способствует накоплению соединения в клетке [11; 12; 13].

Различные типы линкеров, соединяющих полярный и неполярный сегмент, имеют определенные достоинства, способные существенно влиять на проявление противовирусной активности. Значительный интерес представляет исследование соединений с разными типами линкеров: семикарбазоновым и ацилгидразоновым. N-ацилгидразоновая группировка может быть распознана большим количеством рецепторов, что приводит к широкому спектру фармакологической активности [111]. Присутствие семикарбазонового фрагмента оказывает существенное влияние на растворимость в воде и биодоступность.

Ценность мочевины и семикарбазонов для медицинской химии обусловлена возможностью формирования стабильных водородных связей с белками и сайтами связывания рецепторов [11; 12; 13]. Ряд синтезированных мочевины и амидов, модифицированные карбоксильной группой, были исследованы в отношении вируса гепатита В. Показано, что данные соединения обладают противовирусной активностью путем снижения экспрессии вирусных белков. При дальнейшем исследовании в отношении ВИЧ-1 соединения стевiola и амида проявили ингибирующую способность на уровне контрольного препарата – ламивудина [11; 12; 13] (Рисунок 21).

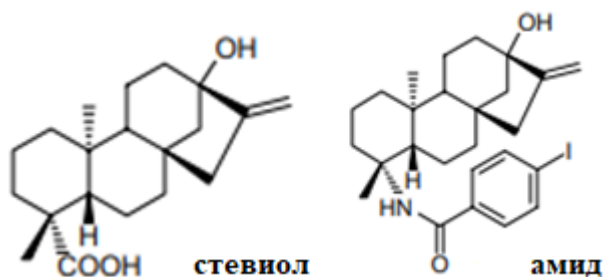


Рисунок 21 - Структуры стевiola и амида (Адаптировано из [12])

Таким образом существует множество природных молекул, которые могут являться перспективными противовирусными соединениями и требуют дальнейшего изучения.

Продолжаются поиски новых молекул-ингибиторов ВИЧ-1 или возможности доработки существующих препаратов для улучшения их свойств [3; 10; 56]. В качестве перспективных соединений были выбраны соединения цис-аннелированного пирролидина, производного 2,4,5-тризамещенного пиримидина и производного 5-арилпирролкарбоновой кислоты [169; 199].

Заключение

Начиная с 1980-х годов глобальные усилия ученых всего мира были направлены на поиск препаратов против ВИЧ-инфекции. Именно благодаря разработанным терапевтическим средствам темпы развития эпидемия ВИЧ-инфекции были значительно снижены. Тем не менее, способность вируса к быстрому уходу от применяемых препаратов и распространение резистентных форм ВИЧ делает поиск новых методов лечения актуальной задачей.

Одним из таких подходов может стать применение ген-направленных олигонуклеотидов, которые показали свою эффективность с развитием новых методов синтеза и увеличением числа различных химических модификаций остова.

Большой интерес вызывают новые соединения цис-аннелированного пирролидина и уже известные соединения производных 5-арилпирролкарбоновой кислоты. Изучение данных веществ на модели живого вируса может выявить перспективные молекулы для создания новых анти-ВИЧ препаратов.

В составе эффективных лекарственных препаратов ключевую роль играют как природные соединения, так и их синтетические аналоги. В частности, для борьбы с вирусными заболеваниями изучается множество природных соединений, которые могут помочь в подавлении инфекции.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Культура клеток

В работе использовалась иммортализованная клеточная культура МТ-4, клетки которой являются Т-лимфоцитами человека. Клеточная культура получена из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Клетки МТ-4 культивировали на среде RPMI-1640 (Servicebio, Китай), с добавлением 10% инаktivированной фетальной сыворотки (Servicebio, Китай), 2 mM L-глутамина (Servicebio, Китай) и 20 мкг/мл гентамицина в закрытой культуральной посуде в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °C и 5% CO₂. Посадочная концентрация составляла 350 000 клеток на 1 мл полной ростовой среды, пересев осуществлялся на 3-4 сутки культивирования.

2.1.2 Вирусный материал

Для оценки противовирусной активности был использован высокопродуктивный штамм ВИЧ-1. Выбор данного штамма для исследования противовирусной активности олигонуклеотидов обусловлен тем, что данный вирус был выделен в России и относится к популяции наиболее распространенной на территориях России и в странах Восточной Европы и Центральной Азии филогенетической группе суб-субтипа А6. Данный штамм характеризуется фенотипом rapid/high (на 5-е сутки культивирования концентрация вирусного белка p24 >700 000 пкг/мл) и обладает высокой цитопатической активностью (100%-ая гибель всех клеток на 5-е сутки культивирования). Данный штамм депонирован в Государственную коллекцию возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора под номером V647 – 12RU69831_MtZn.

Вируссодержащую жидкость предварительно получали путем наработки на культуре лимфоидных клеток человека МТ-4. Урожай инфекционных вирусных

частиц получали на 3 сутки культивирования. Культуральную среду отбирали, клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 1300 оборотов/мин в течении 5 минут, а супернатант разливали в криопробирки (Corning, США) по 1,0 мл, замораживали при - 70 °С в течении 24 часов и хранили в жидком азоте (-196) °С до востребования.

Определение инфекционности наработанного вируса проводили путем вычисления средней инфицирующей дозы (TCID₅₀) на 96-луночном культуральном планшете для суспензионных культур (Servicebio, Китай). Для тестирования использовали клетки МТ-4 в фазе логарифмического роста. Клетки в полной ростовой среде RPMI-1640 (Gibco, США) с концентрацией 3×10^5 в 1 мл разливали по лункам планшета в объёме 100 мкл. Вируссодержащую жидкость размораживали на водяной бане при 37 °С в течении 3-5 минут и готовили его последовательные разведения в отдельной посуде на среде RPMI-1640 (Gibco, США). Затем приготовленные разведения вируса в объёме 100 мкл добавляли в соответствующие лунки планшета с культурой, формируя по три биологических повтора для каждой концентрации вирусного материала. Далее инфицированные клетки в 96-ти луночном планшете культивировали в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С и 5% CO₂.

Определение числа лунок с инфицированными клетками проводили путем измерения концентрации белка р24 ВИЧ (ИФА) в культуральной жидкости, отобранной на 5 сутки культивирования. Количественное определение концентрации р24 ВИЧ при наработке вируссодержащей жидкости и оценку активности исследуемых соединений проводили методом ИФА с помощью набора ВИЧ-1 р24-антиген-ИФА-БЕСТ (Вектор-Бест, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. TCID₅₀ вируса определяли методом Рида – Менча [136].

2.2 Методы

2.2.1 Выделение мононуклеаров периферической крови здоровых доноров методом Boum

Для выделения мононуклеаров периферической крови (МПК) была отобрана кровь от двух здоровых доноров в вакутайнеры с антикоагулянтом ЭДТА объемом 8 мл. Кровь от каждого донора отдельно сливалась в пробирки объемом 50 мл и разводилась средой RPMI-1640 (Servicebio, Китай) в соотношении 1:1. В чистые пробирки объемом 15 мл был добавлен градиент Ficoll lypaque ($\rho=1,077$ г/мл), на который наслаивалась подготовленная донорская кровь в соотношении 1:3. Затем проводили центрифугирование (300g, 30 мин), после которого кольцо интерфазы аккуратно отбиралось в чистые пробирки и проводилась последующая трехкратная отмывкой средой RPMI-1640 (300g, 5 мин). После заключительной отмывки клетки ресуспендировались в 5 мл полной ростовой среды (RPMI-1640 с добавлением 15% инактивированной фетальной сыворотки, 2 mM L-глутамин, 20 мкг/мл гентамицина) и переносились в культуральный матрас. Затем отбиралась аликвота 10 мкл для подсчета концентрации и жизнеспособности клеток с добавлением 10 мкл 0,4% раствора трипанового синего. Расчет клеток производился на счетчике клеток (TC20, Automated Cell Counter, BioRad). Стимуляцию донорских МПК проводили 3 суток в полной ростовой среде с добавлением 5 мкг/мл фитогемагглютина (ФГА) (Sigma, USA) при концентрации МПК 3×10^6 кл/мл. Культивирование проводили в открытой культуральной посуде в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °C и 5% CO₂.

Для исследования методом конфокальной микроскопии, МПК от двух здоровых доноров отмывали от культуральной среды с ФГА центрифугированием (300g, 5 мин) и смешивали в пропорции 1:1. Дальнейшее исследование клеток проводилось как описано в главе «Конфокальная микроскопия».

2.2.2 Исследование противовирусной активности методом иммуноферментного анализа (ИФА)

Дуплексы олигонуклеотидов для исследования противовирусной активности готовили, смешивая целевой олигонуклеотид с соответствующим комплементарным ему додецил-содержащим производным (1:1), затем добавляли PBS (10х) из расчета 10 % к конечному объему смеси. Далее смесь нагревали 3 мин при 90 °С и охлаждали до комнатной температуры.

Разведения олигонуклеотидов готовили начиная с 10 мкМ с трехкратным шагом разведения непосредственно перед исследованием. Серии разведений олигонуклеотидов (в трех независимых повторах) переносили на 96-ти луночный планшет, предварительно засеянный клетками. Инкубация олигонуклеотидов с клетками МТ-4 до внесения ВИЧ-1 составляла 2 часа. Через 2 часа культуру клеток инфицировали постоянной дозой вируса, соответствующей 300 TCID₅₀. Инкубация с вирусом составляла 5 суток в CO₂ инкубаторе при температуре 37 °С и 5% CO₂. В конце инкубации вируса с олигонуклеотидами отбирались пробы культуральной среды для количественного определения белка р24 методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью набора ВИЧ-1 р24-антиген-ИФА-БЕСТ (Вектор-Бест, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. В качестве положительного контроля использована субстанция фармакологического препарата ралтегравир, ингибитора интегразы ВИЧ-1 (Субстанция Raltegravir (ISENTRESS / МК-0518) получена по программе NIH AIDS Reagent Program (cat. 11680).

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.

2.2.3 Исследование цитотоксичности МТТ-методом

Определение цитотоксичности исследуемых препаратов методом МТТ-теста проводили в 96-луночном планшете. В лунки планшета вносили по 40 000 клеток МТ-4 в 100 мкл полной ростовой среды RPMI-1640. Отдельно проводили титрование олигонуклеотидов с шагом разведения – три в трех биологических повторах, которые добавляли в соответствующие лунки планшета с культурой клеток. Инкубирование клеток МТ-4 с исследуемыми разведениями олигонуклеотидов проводили 5 суток в CO₂ инкубаторе при температуре 37 °С и 5% CO₂. После этого в каждую лунку с образцами ОН и в контроль клеток добавляли раствор МТТ-реагента в объеме 20 мкл. Через 2 часа дополнительного инкубирования в термостате из лунок планшета удаляли культуральную среду, а образовавшийся осадок формазана растворяли в изопропанолe при встряхивании в течение 30 минут. После растворения кристаллов в изопропанолe 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.

2.2.4 Исследование антиретровирусной активности МТТ-методом

Исследование противовирусной активности МТТ-методом проводили путем определения концентрации живых клеток. В лунки планшета вносили по 40 000 клеток МТ-4 в 100 мкл полной ростовой среды RPMI-1640. Разведения исследуемых соединений готовили с 5-ти кратным шагом разведения начиная с 400 мкг/мл. Затем по 3 повтора каждого разведения препарата 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-реактанта. 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.

2.2.5 Проточная цитометрия с визуализацией

Для инкубации клеток культуры МТ-4 с олигонуклеотидами к готовой питательной среде добавляли препараты до конечной концентрации 2 мкМ. Инкубация продолжалась на всем протяжении эксперимента с отбором проб для проточной цитометрии после 1, 4, 12, 24, 36 и 48 часов инкубации. При этом олигонуклеотиды присутствовали в среде в указанной концентрации на протяжении всего времени инкубации. 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°C) в 1 мл 1×DPBS (Gibco, США) для удаления остатков питательной среды и несвязавшихся олигонуклеотидов. После финальной отмывки клетки ресуспендировали в 100 мкл 1×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.

Для получения данных о интенсивности флуоресценции клеток в цитоплазме и за ее пределами были созданы маски Cytoplasm и Membrane. Маска Cytoplasm строилась на основе светлопольного изображения с параметром Adaptive Erode (M01, BF, 67); данная маска выделяла область цитоплазмы клетки из светлопольного изображения. Маска Membrane содержала параметры целой маски объекта по каналу светлопольного изображения, за вычетом маски Cytoplasm (Object(M01, BF, Tight) And Not AdaptiveErode(M01, BF, 67)).

На основе базовых и кастомных масок было создано несколько новых параметров в ПО IDEAS 6.2. Параметр Internalization был создан алгоритмом «Internalization», включенным в ПО, он использовался для измерения коэффициента интернализации (IC). Второй кастомный параметр Entropy_1 включал базовый параметр Entropy (энтропия Шеннона) со значением гранулярности 1 в области маски Cytoplasm; было выбрано минимальное значение гранулярность, поскольку размерность точек флуоресценции FAM не превышала 1 мкм^2 .

2.2.6 Конфокальная микроскопия

Конечная концентрация олигонуклеотидов в культуральной среде составляла 2 мкМ. Время экспозиции составляло 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 (Бiovитрум,

Российская Федерация) в 1x PBS. Фиксация составляла 15 минут при комнатной температуре, затем клетки центрифугировали, супернатант удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в 1x 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). Затем препарат накрывали покровным стеклом толщиной 0,17 мм.

Для возбуждения флуоресценции DAPI использовали лазер с длиной волны 405 нм, FAM – 488 нм, фазовый контраст с светлоструйным изображением – 640 нм. Постобработка фотографий, которая включала наложение масштабной сетки и повышение контраста изображения, проводили в программном обеспечении Fiji (Johannes Schindelin et al., 2022).

2.2.7 Статистический анализ

Для указания 50% ингибирующей концентрации (IC_{50}) и 50% цитотоксической концентрации (CC_{50}) 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 обобщенной эта-квадрат (η^2G), 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).

3. Результаты

3.1. Выбор мишени и химической модификации олигонуклеотидов

Как было сказано ранее, геном ВИЧ-1 имеет длину более 9 т.п.н. и кодирует девять генов, которые включают основные гены *gag*, *pol* и *env*.

Для анализа нуклеотидных последовательностей отбирались 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/>). Для построения множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей полных геномов ВИЧ-1 и гена интегразы использовали программы BioEdit и Muscle (<http://www.drive5.com/muscle>). Оптимизация структуры олигонуклеотидов проводилась с помощью программы Oligo 7.60.

Исследование полиморфизма в нуклеотидной последовательности депонированных в GenBank российских вариантов ВИЧ-1 позволило выбрать консервативные районы в областях генома ВИЧ-1. Для анализа были взяты все полногеномные последовательности российских ВИЧ-1, доступные на тот момент в международной базе данных GenBank. Среди выбранных в качестве потенциальных мишеней консервативных последовательностей в геноме ВИЧ-1 были отобраны участки, которые несут особую функциональную значимость и, в случае блокирования их транскрипции, возможно нарушение жизненного цикла вируса.

Обобщив данные анализа изменчивости 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).

PBS-сайт ВИЧ-1 (primer binding site) – данный сайт связывания представляет собой структурный элемент РНК, с которым связывается тРНК_{3Lys} для инициирования процесса обратной транскрипции. Сайт PBS состоит из 18 нуклеотидов и следует за областью U5 5'-длинного концевой повтора (LTR) ВИЧ-1. Нарушения этапа процесса обратной транскрипции приводит к невозможности синтеза двуцепочечной вирусной ДНК для дальнейшей интеграции в геном клетки-хозяина. Данный участок является высоко консервативным для разных изолятов ВИЧ-1.

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) (Рисунок 22).

Предлагаемая структура олигонуклеотидов:

1. GTCCCTGTTCGGGCGCCACT;
2. GTCCCTGTTCGGGCGCCACTGCTAGAGATT.

Участок гена *gag* ВИЧ-1 отвечает за производство комплекса структурных белков, которые образуют сердцевину вируса — нуклеокапсид и матриксную оболочку. Данные белки играют ключевую роль в сборке новых вирусных частиц и поддержании их структуры. При анализе нуклеотидных последовательностей была выявлена высокая консервативность для участка, отвечающего за матриксный белок (MA, p17), формирующий слой внутренней оболочки вириона. Нарушение синтеза данного белка может привести к препятствованию транспортировки Gag/p55 к плазматической мембране и включению гликопротеинов вирусной оболочки.

Для воздействия на область гена *gag* ВИЧ-1 были выбраны базовые структуры олигонуклеотидов, блокирующих участок, отвечающий за матриксный белок (MA, p17) и располагающиеся с 780 по 799 нуклеотиды (Gag-I) и с 770 по 799 нуклеотиды (Gag-II) (Рисунок 23). Стоит отметить, что расположение выбранной мишени соответствует региону, отвечающему за сигнал упаковки, так называемый

– Psi-сайт. Данный участок расположен сразу за основным сайтом донора сплайсинга (MSD), перед стартовым кодоном *gag*, имеющим решающее значение для упаковки вирусной геномной РНК.

Предлагаемая структура олигонуклеотидов:

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

В гене *pol* располагаются области, кодирующие ферменты ВИЧ-1 – интегразу и обратную транскриптазу. Интеграза вируса обеспечивает несколько этапов в цикле репродукции ВИЧ-1: отвечает за образование преинтеграционного комплекса, в составе которого осуществляет транспорт ДНК ВИЧ-1 в ядро клетки человека; катализирует реакцию 3'-процессинга вирусной ДНК; участвует во встраивании ДНК ВИЧ в ДНК клетки человека. Благодаря многофункциональности интегразы в качестве мишени могут быть выбраны различные участки ДНК, удовлетворяющие требованиям консервативности.

В области, кодирующей интегразу вируса, было выбрано три последовательности: Int1- Int3 (Рисунок 22).

Предлагаемая структура олигонуклеотидов:

1. Int1 – 5'-ССААТССССССТТТТСТТТТАА-3' (с 4751 по 4771 нуклеотид, область сРРТ, которая кодирует сРРТ-праймер, участвующий в синтезе (+)цепи ДНК провируса)

3. Int2 – 5'-ААТАСТGCCАТТТГТАСТГСТ-3' (с 4783 по 4804 нуклеотид)

4. Int3 – 5'-СТТГАСТТТGGGGАТТГТАGGG-3' (с 4653 по 4674 нуклеотид)

Также в области гена *pol* ВИЧ-1 находится участок, кодирующий фермент обратная транскриптаза. Данный фермент отвечает за преобразование вирусной РНК в двухцепочечную ДНК в процессе обратной транскрипции. Блокирование данного фермента целевыми олигонуклеотидами должно приводить к остановке синтеза ДНК-копии вируса с матрицы – геномной РНК.

Для воздействия на данную область, выбрана базовая структура олигонуклеотида с 2375 по 2407 нуклеотид (R). Предлагаемая структура олигонуклеотида:

1. CCTCCAATTCCCCCSTATCATTTTTGGTTTCCAT.

Таким образом, на основе теоретического анализа данных по структурно-функциональным особенностям ВИЧ-1 и с учетом разнообразия исследованных вариантов ВИЧ-1 были выбраны мишени для воздействия разрабатываемых олигонуклеотидов направленного действия – консервативные участки генома, функционально важные для реализации отдельных этапов жизненного цикла ВИЧ-1 (Рисунок 22).

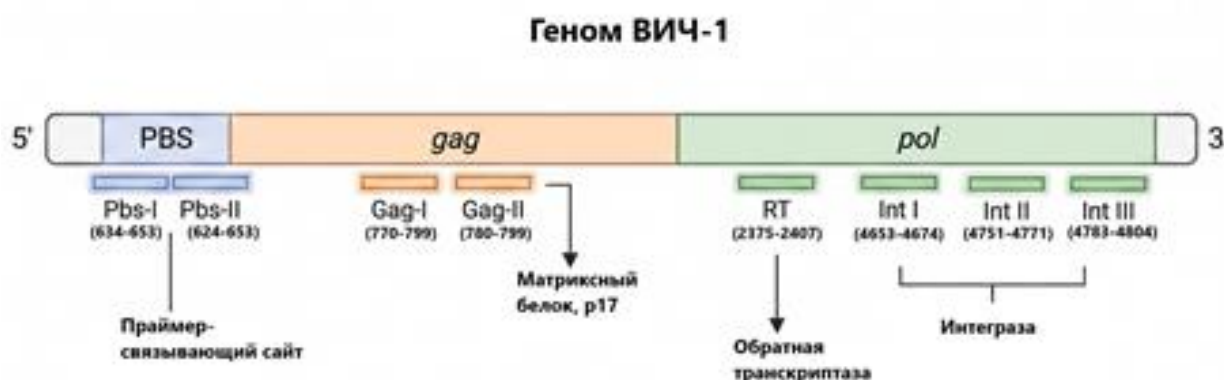


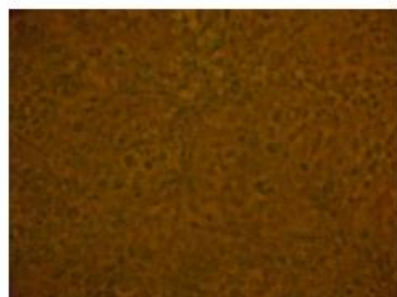
Рисунок 22 - Геном ВИЧ-1 с указанием мест связывания выбранных целевых олигонуклеотидов Int I, Int II, Int III, Pbs1, Pbs2, Gag1, Gag2, R со своими мишенями.

3.1.1 Анतिретровирусная активность и цитотоксичность модифицированных олигонуклеотидов

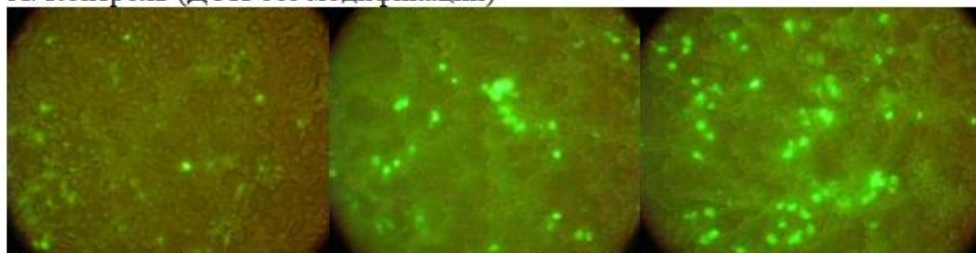
Поскольку известно, что не модифицированные олигодезоксирибонуклеотиды самостоятельно не способны эффективно проникать в клетку, следующей задачей работы был выбор оптимальной модификации олигонуклеотида, позволяющей реализовать их доставку в клетки человека.

Первым этапом была проверка возможности проникновения в трудно трансформируемые лимфоидные клетки человека модельных не специфичных (random) дезоксиолигонуклеотидов, конъюгированных с остатком красителя 6-карбоксифлуоресцеина (FAM), (в связи с тем, что целевые олигонуклеотиды ещё не были синтезированы), содержащих одну, две или три додецильных остатка ([Dcyl]) [113].

Исследование эффективности проникновения модифицированных дезоксиолигонуклеотидов (ДОН) в различные линии клеток выявило прямую зависимость накопления олигонуклеотидов внутри клеток от количества, введённых в них додецильных остатков (Рисунок 23). ДОН инкубировали с клетками в течение двух часов, затем производили 2-ух кратную отмывку фосфатным буфером.



А. Контроль (ДОН без модификаций)



Б. Dcyl-модификация (1,5 ч инкубации, 4мкМ ДОН) однократная, двукратная и трехкратная

Рисунок 23 – Изучение проникновения модифицированных дезоксиолигонуклеотидов (ДОН+Dcyl) в клетки линии Vero. А) Контроль проникновения ДОН без остатков додецила. Б) Проникновение модифицированных дезоксиолигонуклеотидов с одним, двумя и тремя остатками додецила. Для визуализации использовали флуоресцентный микроскоп Axio (Zeis) с 200-320- кратным увеличением. Использовались флуоресцентные фильтры для FAM FT510 (490, 520nm)

Визуально показано, что наиболее активно проникали олигонуклеотиды, в составе которых содержались три молекулы остатков додецила. Затем была исследована возможность использования коротких олигонуклеотидов, содержащих три додецильных остатка и частично комплиментарных целевому олигонуклеотиду (относительно нуклеотидной последовательности random), в качестве доставщика внутрь лимфоидных клеток МТ-4 (Рисунок 24).

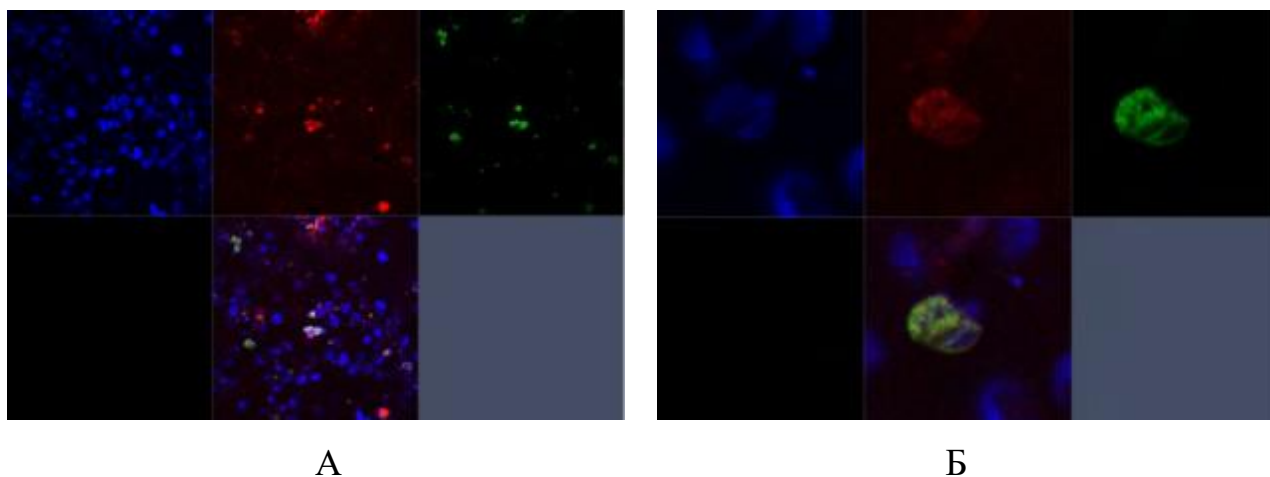


Рисунок 24 – Изучение проникновения в клетки линии МТ-4 дуплексов ДОН, образованных комплементарными ДОН, один «доставщик» содержал тройную додецил модификацию (А), а второй не содержал никакой модификации (Б). Использовались флуоресцентные фильтры для FAM FT510 (490,520nm)

Эксперименты по изучению возможности применения [Dcyl]-«доставщика» для включения в клетку целевого олигонуклеотида, комплементарного «доставщику», также продемонстрировали высокую проникающую способность для дезоксиолигонуклеотидов.

На следующем этапе были синтезированы и исследованы 21-22-звенные олигодезоксирибонуклеотиды, направленные на участки генома ВИЧ-1, кодирующие интегразу, 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). При этом олигонуклеотид-доставщик образовывал дуплекс лишь с определенным участком доставляемой последовательности, а додецильные остатки находились за пределами образуемого нуклеотидного комплекса («нависающий» конец комплекса).

Таблица 1. Последовательности исследованных олигонуклеотидов. [Dcyl] – ненуклеотидное додецил-содержащее звено; NH₂ - гексаметиленовый линкер

Обозначение олигонуклеотида	Последовательность 5'-3'
Олигонуклеотиды, направленные на участки генома ВИЧ-1 в области, кодирующей вирусный фермент интегразу:	
Int I	ССААТССССССТТТТСТТТТАА-NH ₂
Int II	ААТАСТGCCАТТТGTACTGCT-NH ₂
Int III	СТTGACTTTGGGGATTGTAGGG-NH ₂
Олигонуклеотиды для доставки Int I, Int II, Int III в клетки:	
ТдI	T-[Dcyl] [Dcyl] [Dcyl]-ТААААGАААAGGG
ТдII	T-[Dcyl] [Dcyl] [Dcyl]-AGCAGTACAAATG
ТдIII	T-[Dcyl] [Dcyl] [Dcyl]-СТАСААТСССССAA

Растворы олигонуклеотидов и их дуплексов готовили разбавлением до указанных концентраций из стоковых растворов непосредственно перед тестированием. Далее проводили исследование противовирусной активности, как описано в главе «Материалы и методы». В качестве отрицательного контроля и для оценки способности ингибирования ВИЧ олигонуклеотидами с введенными додецильными остатками были взяты олигонуклеотиды-доставщики без вирус-специфического олигонуклеотида. Исследование противовирусной активности олигонуклеотидов проводили на суспензионной культуре клеток МТ-4 в отношении штамма ВИЧ-1 суб-субтипа А6, как описано в главе «Материалы и методы» (Таблица 2).

Таблица 2. Данные по определённой для олигонуклеотидов Int I, Int II, Int III 50% концентрации (IC_{50}), ингибирующей репродукцию ВИЧ-1 через 5 суток после инфицирования клеток человека МТ-4.

Обозначение олигонуклеотида	IC_{50} , мкМ
Int I*	5,30±0,11
Int II*	5,60±0,15
Int III*	2,20±0,11
ТдI	Не выявлена
ТдII	Не выявлена
ТдIII	Не выявлена

*данные олигонуклеотиды доставляли в клетки в дуплексах с соответствующими им комплементарными додецил-содержащими олигонуклеотидами.

Таблица 2.1. Данные статистического анализа 50% концентрации (IC_{50}) с применением ANOVA с указанием критерия Фишера (F-критерий).

	Int I*	Int II*	Int III*
Int I*	-	p=0,058	p<0,001
Int II*	-	-	p<0,001
Int III*	-	-	-

*выявлены значимые различия между группами (p < 0,05) Int I-Int III/Int II-Int III.

50% концентрация (IC_{50}), ингибирующей репродукцию ВИЧ-1 через 5 суток после инфицирования клеток человека МТ-4 субстанции ралтегравир (RAL) составила 0,006 мкг/мл.

Технические повторы эксперимента показали, что наилучшее значение IC_{50} продемонстрировал олигонуклеотид Int III, поэтому данный олигонуклеотид был отобран для сравнительного изучения влияния модификаций его остова на проявление противовирусной активности.

Олигонуклеотид Int III был синтезирован в следующих модификациях (Таблица 3):

- олигодезоксирибонуклеотид, на 3'-конец которого были введены две фосфорилгуанидиновые модификации (х) для повышения устойчивости олигонуклеотида к действию нуклеаз (Int III(о);

- гапмерный олигодезоксирибонуклеотид, который содержит по семь фосфорилгуанидиновых модификаций с 5'- и 3'-концов (Int III(хох) [108];
- полностью модифицированный фосфорилгуанидиновый олигонуклеотид, содержащий два дополнительных тимидина на 5'-конце, присоединенных посредством фосфодиэфирных связей для лучшей растворимости (Int III(х));
- полностью тиофосфат-модифицированный (s) олигодезоксирибонуклеотид (Int III(s));
- олигорибонуклеотид, содержащий как 2'-ОМе модификации на протяжении всего остова, так и две фосфорилгуанидиновые модификации на 3'-конце (Int III(ОМе)).

Исследование противовирусной активности олигонуклеотидов проводили на суспензионной культуре клеток МТ-4 в отношении штамма ВИЧ-1 суб-субтипа А6, как описано в главе «Материалы и методы» (Таблица 4).

Таблица 3. Химические модификации олигонуклеотида Int III, исследованные в работе. ^X – фосфорилгуанидиновая модификация; ^S – тиофосфатная модификация; ** – ОМе – олигорибонуклеотид, содержащий 2'-ОМе модификацию на протяжении всего остова, обозначен курсивом

Обозначение олигонуклеотида	Последовательность 5'-3'
Олигонуклеотиды на основе последовательности интегразы (III), содержащие различные комбинации модификаций:	
Int III(O)	CTTGACTTTGGGGATTGTAG ^X G ^X G
Int III(XOX)	C ^X T ^X T ^X G ^X A ^X C ^X T ^X TTGGGGATT ^X G ^X T ^X A ^X G ^X G ^X G
Int III(X)	TTC ^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
Int III(S)	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
Int III(2'ОМе)**	<i>CUUGACUUUGGGGAUUGUAG</i> ^X G ^X G

Таблица 4. Данные по определённой 50% концентрации (IC_{50}) для олигонуклеотида Int III с введенными различными химическими модификациями, ингибирующей репродукцию ВИЧ-1 через 5 суток после инфицирования клеток человека MT-4.

Обозначение олигонуклеотида	IC_{50} , мкМ
Int III(O)*	1,90±0,04
Int III(X)*	7,10±0,20
Int III(XOX)	7,80±0,16
Int III(S)	0,09±0,01
Int III(2'-OME)	4,00±0,12
N162	не выявлена

Таблица 4.1. Данные статистического анализа 50% концентрации (IC_{50}) для олигонуклеотида Int III с введенными различными химическими модификациями с применением ANOVA с указанием критерия Фишера (F-критерий).

	Int III(O)	Int III(X)	Int III(XOX)	Int III(S)	Int III(2'-OME)
Int III(O)	-	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Int III(X)	-	-	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Int III(XOX)	-	-	-	p<0,001	p<0,001
Int III(S)	-	-	-	-	p<0,001
Int III(2'-OME)	-	-	-	-	-

*выявлены значимые различия между всеми группами ($p < 0,05$).

Данные, полученные в ходе изучения противовирусной активности олигонуклеотида Int III показали, что активность подавления репродукции вируса для олигонуклеотида в фосфотиоатной модификации (PS) является наиболее перспективной для дальнейших исследований [99].

На следующем этапе были синтезированы олигонуклеотиды, направленные на область, кодирующую обратную транскриптазу ВИЧ-1: 35-звенные олигодезоксирибонуклеотиды R и RS (Таблица 5). 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 20- и 30-звенные олигонуклеотиды, последовательность которых была направлена на консервативные участки генома ВИЧ-1 в области праймер-связывающего сайта (Pbs) и гена *gag* (Таблица 5). Для модификации данных олигонуклеотидов была выбрана тиофосфатная модификация. Для них также было проведено исследование противовирусной активности и определение 50% концентрации (IC_{50}), ингибирующей репродукцию ВИЧ-1 (Таблица 6).

Таблица 5. Последовательности модифицированных олигонуклеотидов, исследованных в работе. [Dcyl] – ненуклеотидное додецил-содержащее звено; NH_2 – гексаметиленовый линкер; x – фосфорилгуанидиновая модификация; s – тиофосфатная модификация.

Обозначение олигонуклеотида	Последовательность 5'-3'
Олигонуклеотиды, направленные на участок генома ВИЧ-1 в области, кодирующей фермент обратную транскриптазу:	
R	T[Dcyl][Dcyl][Dcyl]CCTCCAATCCCCCSTATCATTTTTGGTTT CC ^x A ^x T
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 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
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
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
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
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

Таблица 6. Данные по определённой для олигонуклеотидов 50% концентрации (IC_{50}), ингибирующей репродукцию ВИЧ-1 через 5 суток после инфицирования клеток человека МТ-4.

Обозначение олигонуклеотида	IC_{50} , мкМ
R	$0,29 \pm 0,01$
R(S)	$0,10 \pm 0,04$
PbS-I	$0,45 \pm 0,05$
PbS- II	$0,09 \pm 0,01$
Gag-I	$0,15 \pm 0,02$
Gag-II	$0,043 \pm 0,01$

Таблица 6.1. Данные статистического анализа 50% концентрации (IC_{50}) для олигонуклеотидов с применением ANOVA с указанием критерия Фишера (F-критерий).

	R(S)	PbS-I	PbS- II	Gag-I	Gag-II
R	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
R(S)	-	$p < 0,001$	-	-	-
PbS-I	-	-	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
PbS- II	-	-	-	-	-
Gag-I	-	-	-	-	$p = 0,005$
Gag-II	-	-	-	-	-

*выявлены значимые различия между всеми группами ($p < 0,05$).

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.

Задачей следующего этапа было изучение влияния на противовирусную активность олигонуклеотидов введения LNA-модификации.

Для LNA-модификацией были отобраны олигонуклеотиды, показавшие наилучшую способность подавления репродукции вируса (Int III, PbS-I, Gag-I) [4].

Была исследована способность блокирования ВИЧ для ОН 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 7. Исследование противовирусной активности олигонуклеотидов проводили на суспензионной культуре клеток МТ-4, как описано в главе «Материалы и методы» (Таблица 8).

Таблица 7. Последовательности модифицированных олигонуклеотидов, исследованных в работе. ^S – тиюфосфатная модификация, ^L - LNA-модификация.

Обозначение олигонуклеотида	Последовательность 5'-3'
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
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
PbS-I _5'-LNA	^L G ^L T ^L C ^L C ^L C ^L 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
PbS-I _5'/3'-LNA	^L G ^L T ^L C ^L C ^L C ^L 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
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
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
Int III _5'-LNA	^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
Int III _5'/3'-LNA	^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+A+G+G+G
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
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
Gag-I _5'-LNA	^L T ^L C ^L G ^L C ^L 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
Gag-I _5'/3'-LNA	^L T ^L C ^L G ^L C ^L 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

Таблица 8.1. Данные статистического анализа 50% концентрации (IC_{50}) для олигонуклеотидов с применением ANOVA с указанием критерия Фишера (F-критерий).

[illegible]

Gag-I 5'/3'- LNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
------------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

*выявлены значимые различия между многими группами ($p < 0,05$).

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 $0,09 \pm 0,013 \text{ мкМ}$) и PS-олигонуклеотида, направленного на участок гена *gag* (IC_{50} составил $0,15 \pm 0,018 \text{ мкМ}$).

Для соединений с наилучшими значениями IC_{50} , была изучена 50% токсичная концентрация (CC_{50}) методом МТТ-теста и определен индекс Селективности (SI). Все исследованные олигонуклеотиды продемонстрировали умеренную цитотоксичность (Таблица 9).

Таблица 9. Результат исследования 50% токсичной концентрации (CC_{50}) на клетки МТ-4 через 5 суток после добавления исследуемых олигонуклеотидов в культуральную среду МТТ-методом и рассчитанный индекс селективности (SI).

Обозначение олигонуклеотида	CC_{50} , мкМ	SI
Int III(S)	>70	777,7
RS		700
PbS-I		155,5
PbS-II		777,8
Gag-I		466,6
Gag-II		1627,9

3.1.2. 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. 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).

На первом этапе к клеткам MT-4 добавлялись исследуемые комбинации олигонуклеотидов и проводилась инкубация в течение 2 часов. Далее проводилось заражение клеток без отмывки олигонуклеотидов, после пяти дней культивирования ВИЧ на клетках MT-4 в присутствии комбинаций олигонуклеотидов проводилась оценка противовирусной активности методом ИФА как описано ранее (Таблица 10). В качестве контроля противовирусной активности были использованы инфицированные ВИЧ-1 клетки с аналогично введенными моно-олигонуклеотидами и клетки, инфицированные ВИЧ-1 без добавления олигонуклеотидов (контроль вируса).

Таблица 10. Данные по оценке противовирусной активности комбинаций и моно-олигонуклеотидов на клетках человека MT-4, инфицированных ВИЧ-1.

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	$0,034 \pm 0,003$
PbS-2+RS	Область праймер-связывающего сайта + область гена <i>pol</i>	$0,029 \pm 0,002$
PbS-2+R		$0,046 \pm 0,004$
Int (S)	Область гена <i>pol</i> (вирусный фермент – интеграз)	$0,087 \pm 0,005$
RS	Область гена <i>pol</i> (вирусный фермент – обратная транскриптаза)	$0,100 \pm 0,005$
R		$0,285 \pm 0,009$
Gag-2	Область гена <i>gag</i>	$0,058 \pm 0,004$
PbS-2	Область праймер-связывающего сайта	$0,085 \pm 0,005$

Таблица 10.1. Данные статистического анализа 50% концентрации (IC_{50}) комбинаций и моно-олигонуклеотидов с применением ANOVA с указанием критерия Фишера (F-критерий).

	PbS-2+R	Int (S)	RS	R	Gag-2	PbS-2
Gag-2+RS	-	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Gag-2+R	-	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Gag-2+Int (S)	$p = 0,011$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Gag-2+PbS-2	-	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
PbS-2+RS	$p = 0,006$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
PbS-2+R	-	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	-	$p < 0,001$
Int (S)	-	-	-	$p < 0,001$	$p < 0,001$	-
RS	-	-	-	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p = 0,019$
R	-	-	-	-	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Gag-2	-	-	-	-	-	$p < 0,001$
PbS-2	-	-	-	-	-	-

*выявлены значимые различия между многими группами ($p < 0,05$)

Для моно-олигонуклеотидов получены значения IC_{50} , аналогичные данным ранее проведенных исследований. Наилучшим подавлением ВИЧ-1 обладал

олигонуклеотид Gag-2 ($IC_{50}=0,058 \pm 0,004$ мкМ). Олигонуклеотиды, направленные на область, кодирующую интегразу вируса Int (S) и область праймер-связывающего сайта PbS-2, проявили схожую противовирусную активность с показателями $0,087 \pm 0,005$ мкМ и $0,085 \pm 0,005$ 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 их противовирусной эффективности по сравнению с аналогичными моно-олигонуклеотидами. Наилучший показатель IC_{50} ($0,029 \pm 0,002$ 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 IC_{50} $0,046 \pm 0,004$ мкМ несколько ниже, чем остальные исследованные комбинации.

3.1.3. 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 (Таблица 11):

FAM-ON-O – тип остова – дезокси, неспецифическая нуклеотидная последовательность, олигонуклеотид исследован при самостоятельном проникновении в клетку и в дуплексе с «доставщиком» Тд;

FAM-ON-PS, тип остова – тиофосфат, исследован при самостоятельном проникновении и в дуплексе с «доставщиком» Тд.

Так как FAM несут именно олигонуклеотиды, а не доставщик Тд, фиксация сигнала в клетке будет указывать именно на проникновение олигонуклеотидов.

Таблица 11. Последовательности исследованных олигонуклеотидов. [Dcyl] – ненуклеотидное додецил-содержащее звено; NH₂ - гексаметиленовый линкер; x – фосфорилгуанидиновая модификация; s – тиофосфатная модификация.

Обозначение олигонуклеотида	Последовательность 5'-3'
Олигонуклеотиды для изучения проникновения:	
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	T[Dcyl][Dcyl][Dcyl]-GGTAGCAAGTCGAGA ^x C ^x T

Известно, что PS-олигонуклеотиды способны самостоятельно проникать в некоторые типы клеток без применения трансфецирующих агентов [47]. Поскольку клетки лимфоидного типа являются труднотрансфецируемыми, дополнительно была изучена способность PS-олигонуклеотида (FAM-ON-PS) и дезоксирибонуклеотида (FAM-ON-O) проникать в клетки МТ-4 с использованием контрольных неспецифичных олигонуклеотидов (Таблица 1), содержащих на 5'-

конце флуоресцентный краситель. Также оценка проникновения была проведена для выбранных олигонуклеотидов в комплексе в виде дуплекса, с частично комплементарным олигонуклеотидом-доставщиком (Тд, Таблица 1) (Рисунки 25-34).

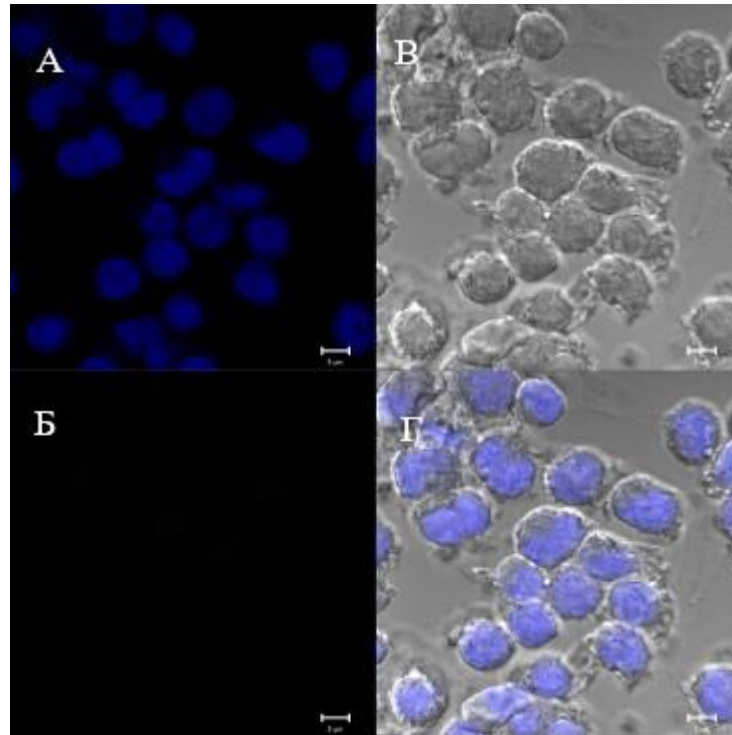


Рисунок 25 – Конфокальная флуоресцентная микроскопия клеток МТ-4 после инкубации с FAM-ON-О. Получены с помощью сканирующего микроскопа LSM 780 NLO, с использованием лазеров с длиной волны 405 нм (синий – DAPI) и 488 нм (зелёный – FAM) А) Клетки с окрашенными ядрами (синий – DAPI) Б) Клетки с FAM-ON (зеленый –FAM) В) Изображение клеток МТ-4. Г) Совмещенное изображение

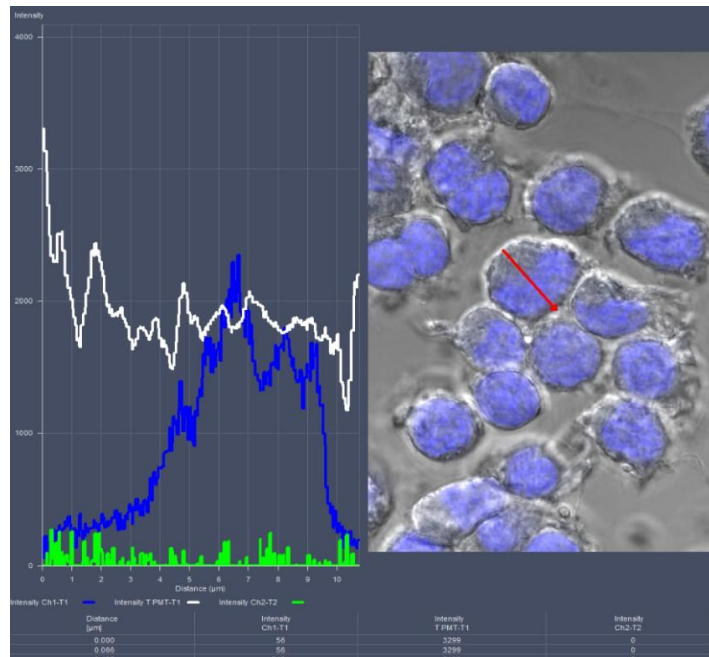


Рисунок 26 – Профили интенсивности сигналов в клетках МТ-4 после инкубации с FAM-ON-O. Получено с помощью сканирующего микроскопа LSM 780 NLO, с использованием лазеров с длиной волны 405 нм (синий – DAPI) и 488 нм (зелёный – FAM)

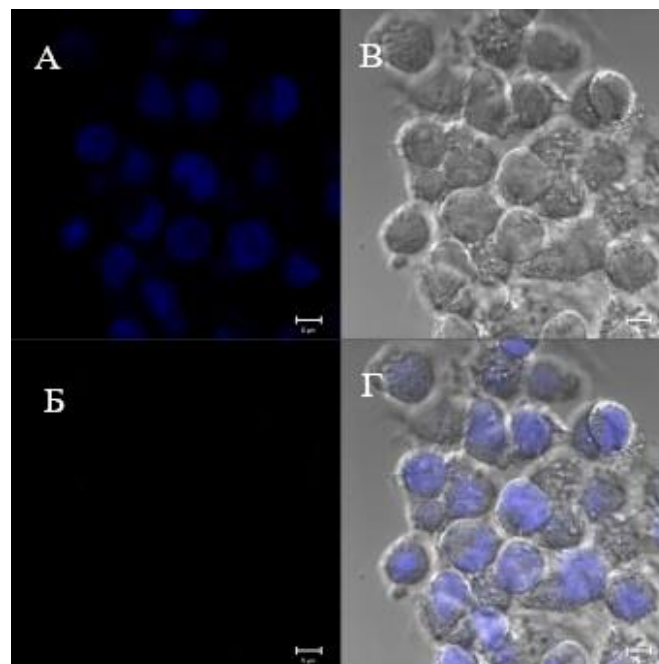


Рисунок 27 – Конфокальная флюоресцентная микроскопия клеток МТ-4 после инкубации дуплекса Тд+FAM-ON-O. Получены с помощью сканирующего микроскопа LSM 780 NLO, с использованием лазеров с длиной волны 405 нм (синий – DAPI) и 488 нм (зелёный – FAM) А) Клетки с окрашенными ядрами (синий – DAPI) Б) Клетки с FAM-ON-Тд (зеленый –FAM) В) Изображение клеток МТ-4. Г) Совмещенное изображение

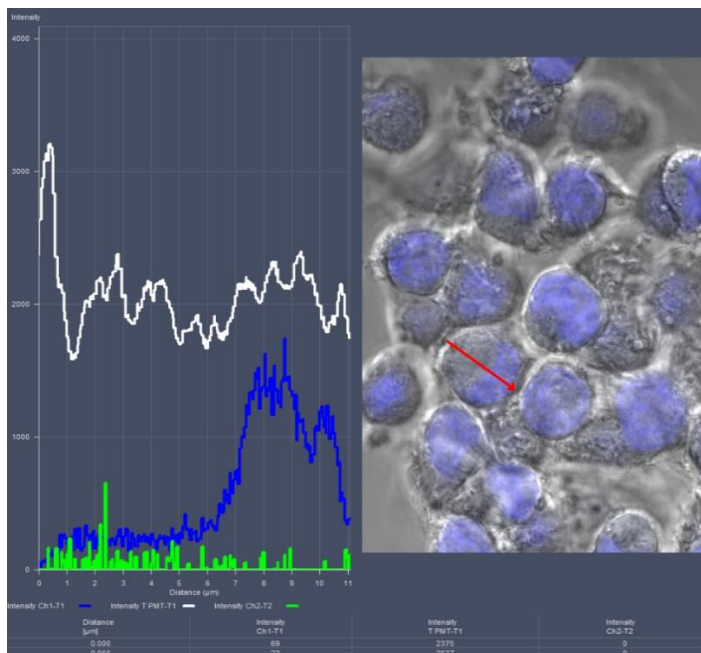


Рисунок 28 – Профили интенсивности сигналов в клетках МТ-4 после инкубации с дуплексом Тд+FAM-ON-O. Получено с помощью сканирующего микроскопа LSM 780 NLO, с использованием лазеров с длиной волны 405 нм (синий – DAPI) и 488 нм (зелёный – FAM)

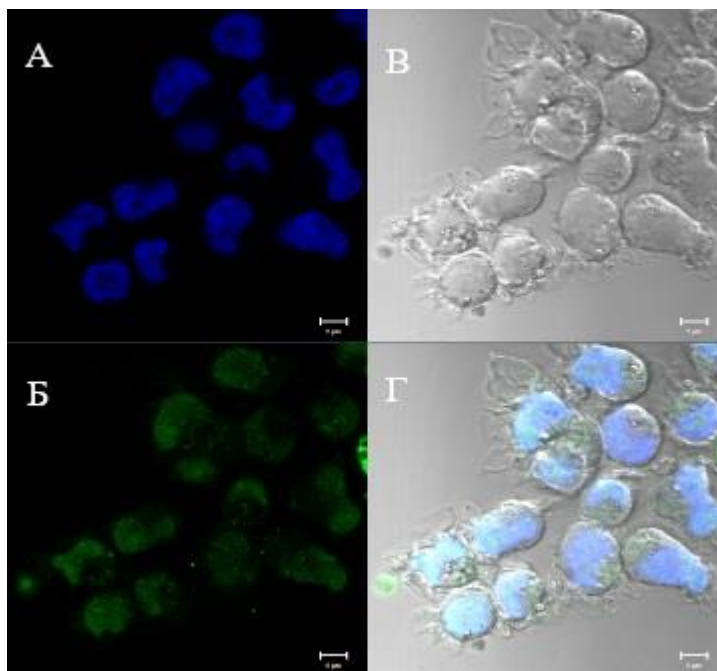


Рисунок 29 – Конфокальная флюоресцентная микроскопия клеток МТ-4 после инкубации с FAM-ON-PS. Получены с помощью сканирующего микроскопа LSM 780 NLO, с использованием лазеров с длиной волны 405 нм (синий – DAPI) и 488 нм (зелёный – FAM) А) Клетки с окрашенными ядрами (синий – DAPI) Б) Клетки с FAM-ON (зеленый –FAM) В) Изображение клеток МТ-4. Г) Совмещенное изображение

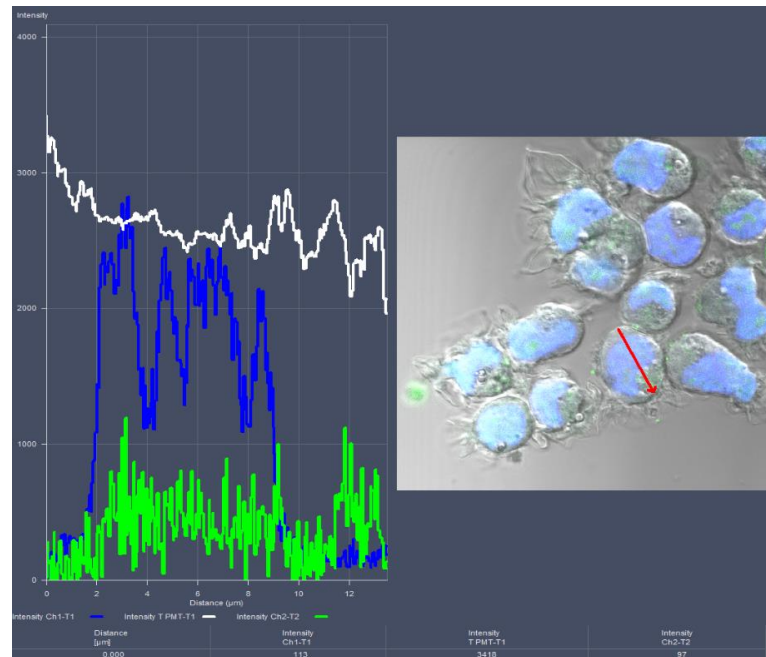


Рисунок 30 – Профили интенсивности сигналов в клетках МТ-4 после инкубации с FAM-ON-PS. Получено с помощью сканирующего микроскопа LSM 780 NLO, с использованием лазеров с длиной волны 405 нм (синий – DAPI) и 488 нм (зелёный – FAM)

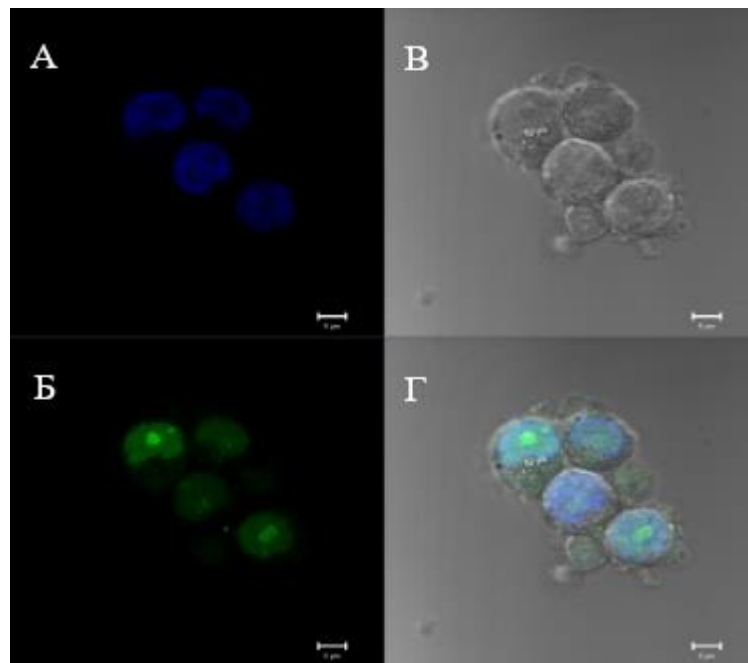


Рисунок 31 – Конфокальная флуоресцентная микроскопия клеток МТ-4 после инкубации дуплекса Тд+FAM-ON-PS. Получены с помощью сканирующего микроскопа LSM 780 NLO, с использованием лазеров с длиной волны 405 нм (синий – DAPI) и 488 нм (зелёный – FAM) А) Клетки с окрашенными ядрами (синий – DAPI) Б) Клетки с FAM-ON-Тд (зеленый –FAM) В) Изображение клеток МТ-4. Г) Совмещенное изображение

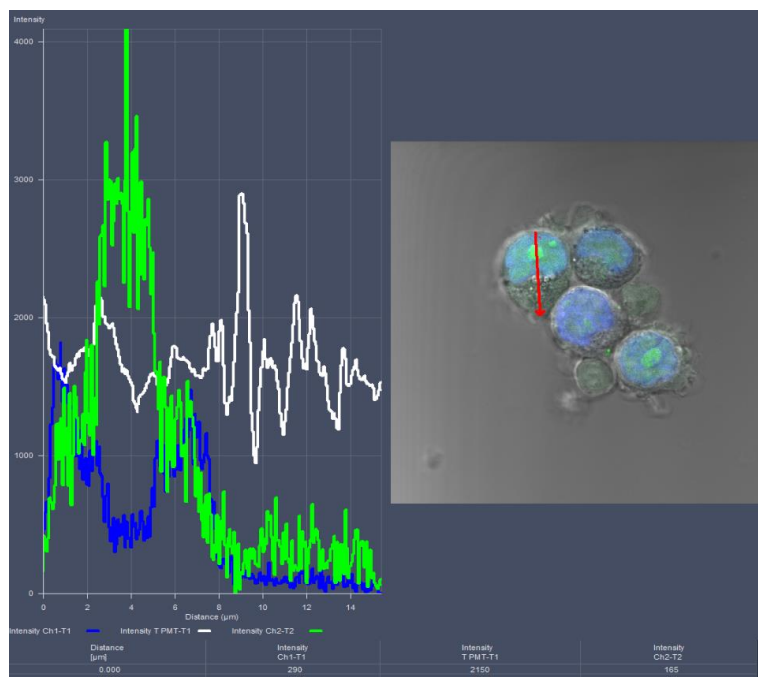


Рисунок 32 – Профили интенсивности сигналов в клетках МТ-4 после инкубации с дуплексом Тд+FAM-ON-PS. Получено с помощью сканирующего микроскопа LSM 780 NLO, с использованием лазеров с длиной волны 405 нм (синий – DAPI) и 488 нм (зелёный – FAM)

Для подтверждения способности FAM-ON-PS проникать не только в иммортализованные клетки, было проведено исследование клеточного проникновения на мононуклеарах периферической крови человека (Рисунок 34, Рисунок 35).

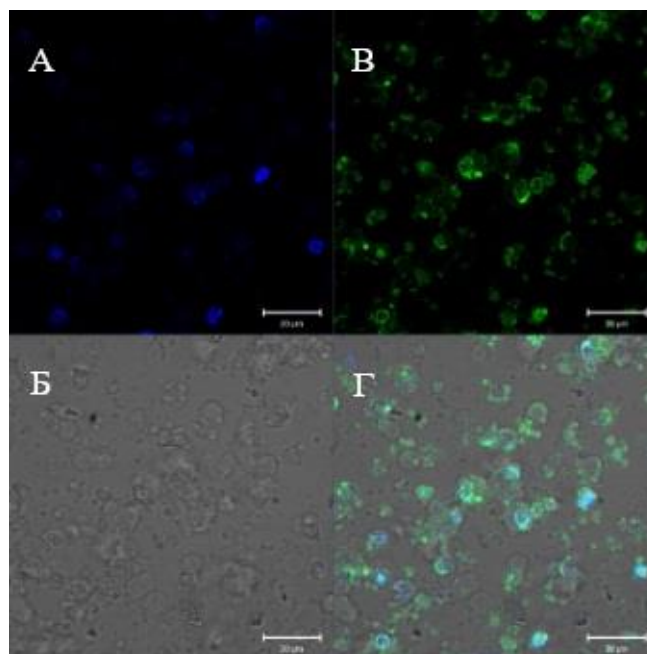


Рисунок 33 – Конфокальная флуоресцентная микроскопия МПК человека после инкубации с FAM-ON-PS. Получены с помощью сканирующего микроскопа LSM 780 NLO, с использованием лазеров с длиной волны 405 нм (синий – DAPI) и 488 нм (зелёный – FAM) А) Клетки с окрашенными ядрами (синий – DAPI) Б) Клетки с FAM-ON-Тд (зеленый – FAM) В) Изображение клеток МТ-4. Г) Совмещенное изображение

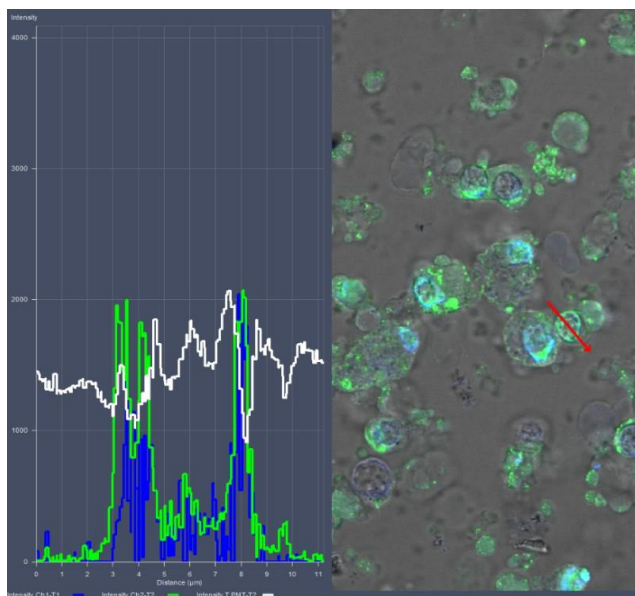


Рисунок 34 – Профили интенсивности сигналов в клетках МПК человека после инкубации с FAM-ON-PS. Получено с помощью сканирующего микроскопа LSM 780 NLO, с использованием лазеров с длиной волны 405 нм (синий – DAPI) и 488 нм (зелёный – FAM)

Анализ полученных изображений показал, что на оптических срезах, проходящих через ядро клетки и цитоплазму распределение олигонуклеотидов, различается при различных химических модификациях. Показано, что FAM-ON-O самостоятельно практически не способен 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 не только эффективно проникает в цитоплазму и ядро клетки, но и регистрируется накопление сигнала FAM в области ядрышка.

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 3). Для исследования была выбрана последовательность олигонуклеотида, направленного на область, кодирующую интегразу ВИЧ-1, поскольку по данным исследования антиретровирусной активности для него 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 12). Отрицательным контролем являлись клетки МТ-4 без добавления олигонуклеотидов, но прошедшие аналогичные этапы подготовки для конфокальной микроскопии и цитометрии с визуализацией (Рисунки 35-39).

Таблица 12. Олигонуклеотиды, исследованные на их способность к клеточной интернализации. ^S – PS-модификация; ^L – LNA-модификация; [FAM] – 6-карбоксифлуоресцеин-содержащего звена

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 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

Исследование проводили на клеточной культуре МТ-4 с помощью конфокальной сканирующей микроскопии как описано в главе «Материалы и методы».

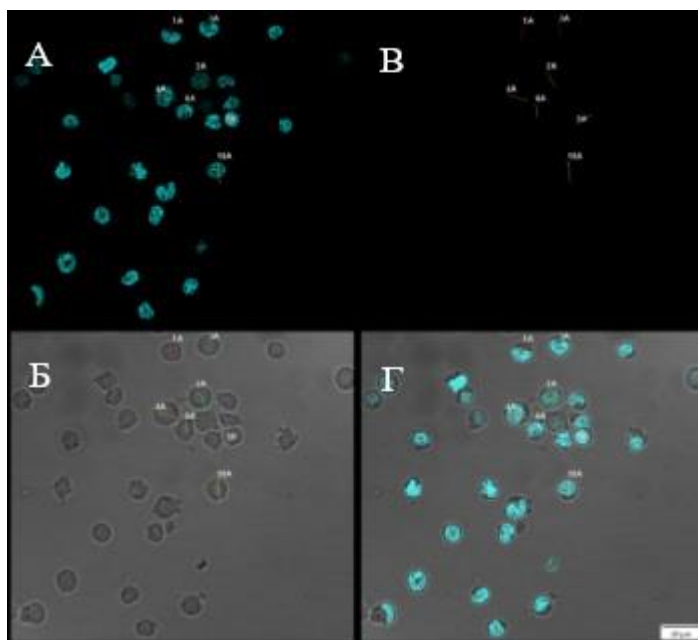


Рисунок 35 – Конфокальная микроскопия клеток МТ-4 без добавления олигонуклеотидов с использованием лазеров с длиной волны 405 нм (синий – DAPI)

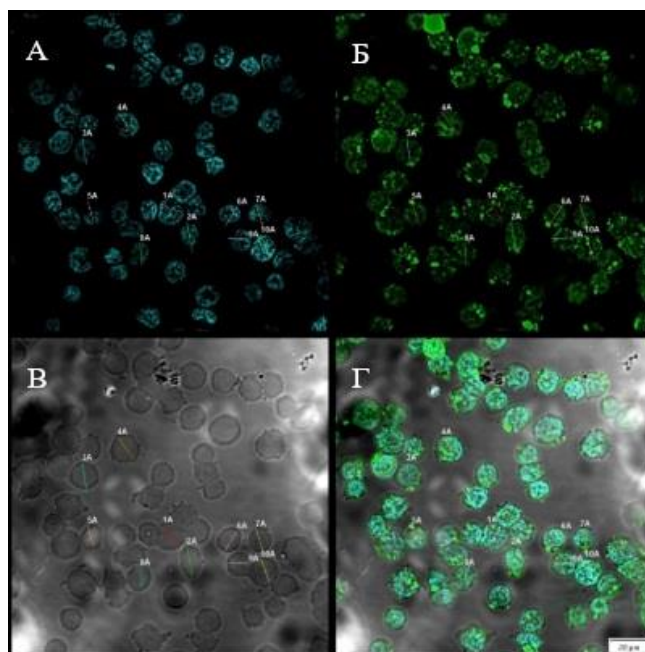


Рисунок 36 – Конфокальная микроскопия клеток MT-4 после инкубации с PS-олигонуклеотидом FAM-Int. Получены с помощью сканирующего микроскопа Olympus FLUOVIEW, с использованием лазеров с длиной волны 405 нм (синий – DAPI) и 488 нм (зелёный – FAM). Клетки с окрашенными ядрами (синий – DAPI) В) Клетки с олигонуклеотидом- FAM (зеленый –FAM) С) Изображение клеток MT-4. D) Совмещенное изображение

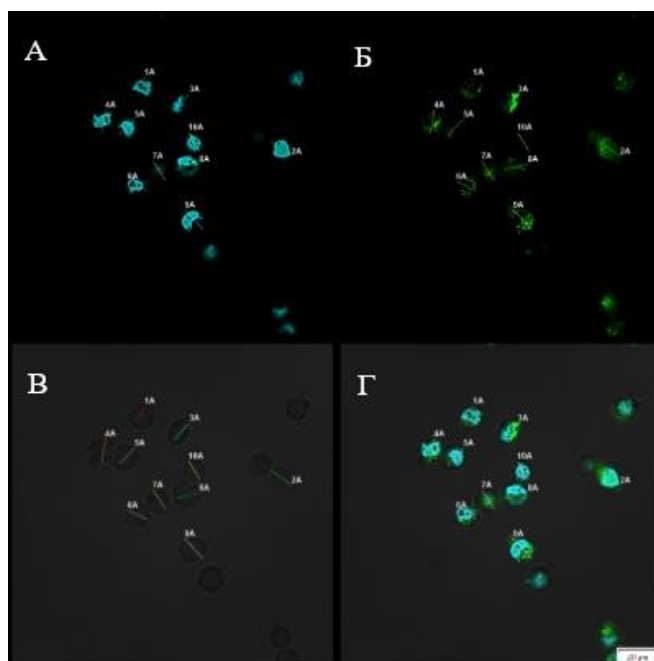


Рисунок 37 – Конфокальная микроскопия клеток MT-4 после инкубации с PS-олигонуклеотидом FAM-Int 3'-LNA. Получены с помощью сканирующего микроскопа Olympus FLUOVIEW, с использованием лазеров с длиной волны 405 нм (синий – DAPI) и 488 нм (зелёный – FAM). Клетки с окрашенными ядрами (синий – DAPI) В) Клетки с олигонуклеотидом- FAM (зеленый –FAM) С) Изображение клеток MT-4. D) Совмещенное изображение

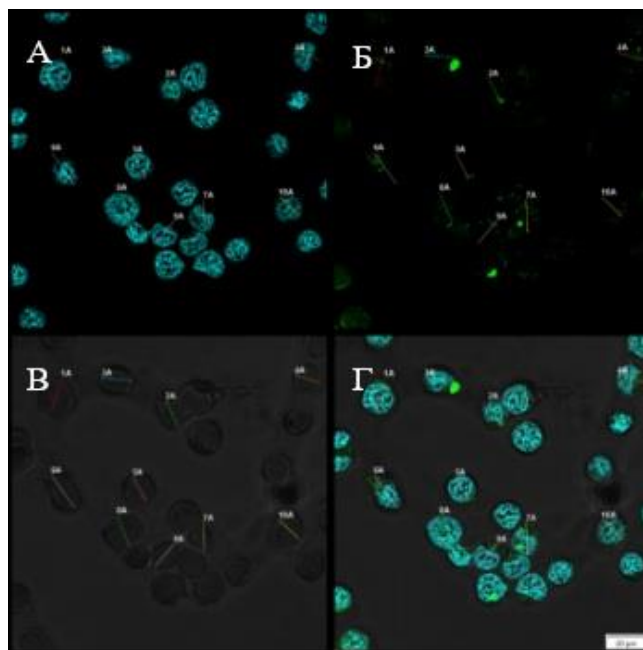


Рисунок 38 – Конфокальная микроскопия клеток МТ-4 после инкубации с PS-олигонуклеотидом FAM-Int_5'-LNA. Получены с помощью сканирующего микроскопа Olympus FLUOVIEW, с использованием лазеров с длиной волны 405 нм (синий – DAPI) и 488 нм (зелёный – FAM). Клетки с окрашенными ядрами (синий – DAPI) В) Клетки с олигонуклеотидом- FAM (зеленый –FAM) С) Изображение клеток МТ-4. Д) Совмещенное изображение

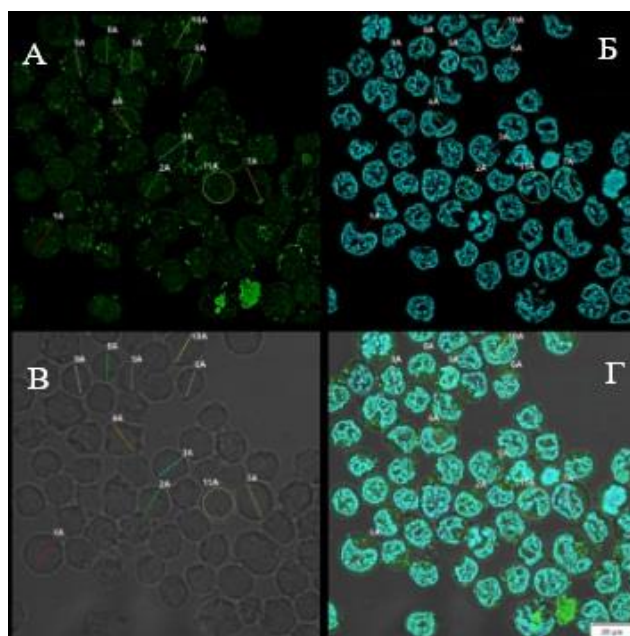


Рисунок 39 – Конфокальная микроскопия клеток МТ-4 после инкубации с PS-олигонуклеотидом FAM-Int_3/5'-LNA. Получены с помощью сканирующего микроскопа Olympus FLUOVIEW, с использованием лазеров с длиной волны 405 нм (синий – DAPI) и 488 нм (зелёный – FAM). Клетки с окрашенными ядрами

(синий – DAPI) В) Клетки с олигонуклеотидом- FAM (зеленый –FAM) С) Изображение клеток MT-4. D) 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.

3.1.4. Исследование модифицированных олигонуклеотидов с помощью проточной цитометрии с визуализацией

Эффективность многих терапевтических агентов, нацеленных на внутриклеточные мишени, зависит от их способности проникать в клетки. Противовирусное действие вирус-специфических олигонуклеотидов напрямую зависит от их способности проникать через клеточную мембрану и достигать внутреннего компартмента-мишени (ядро/ядрышко/цитоплазма клеток). Антисмысловые олигонуклеотиды демонстрируют высокую специфичность связывания с целевыми нуклеиновыми кислотами, но как сказано ранее они могут деградировать в эндосомах под действием ферментов без специальных химических модификаций (фосфотиоатных, locked nucleic acid и др.) [131], которые могут влиять на их биодоступность.

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 3).

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 40.

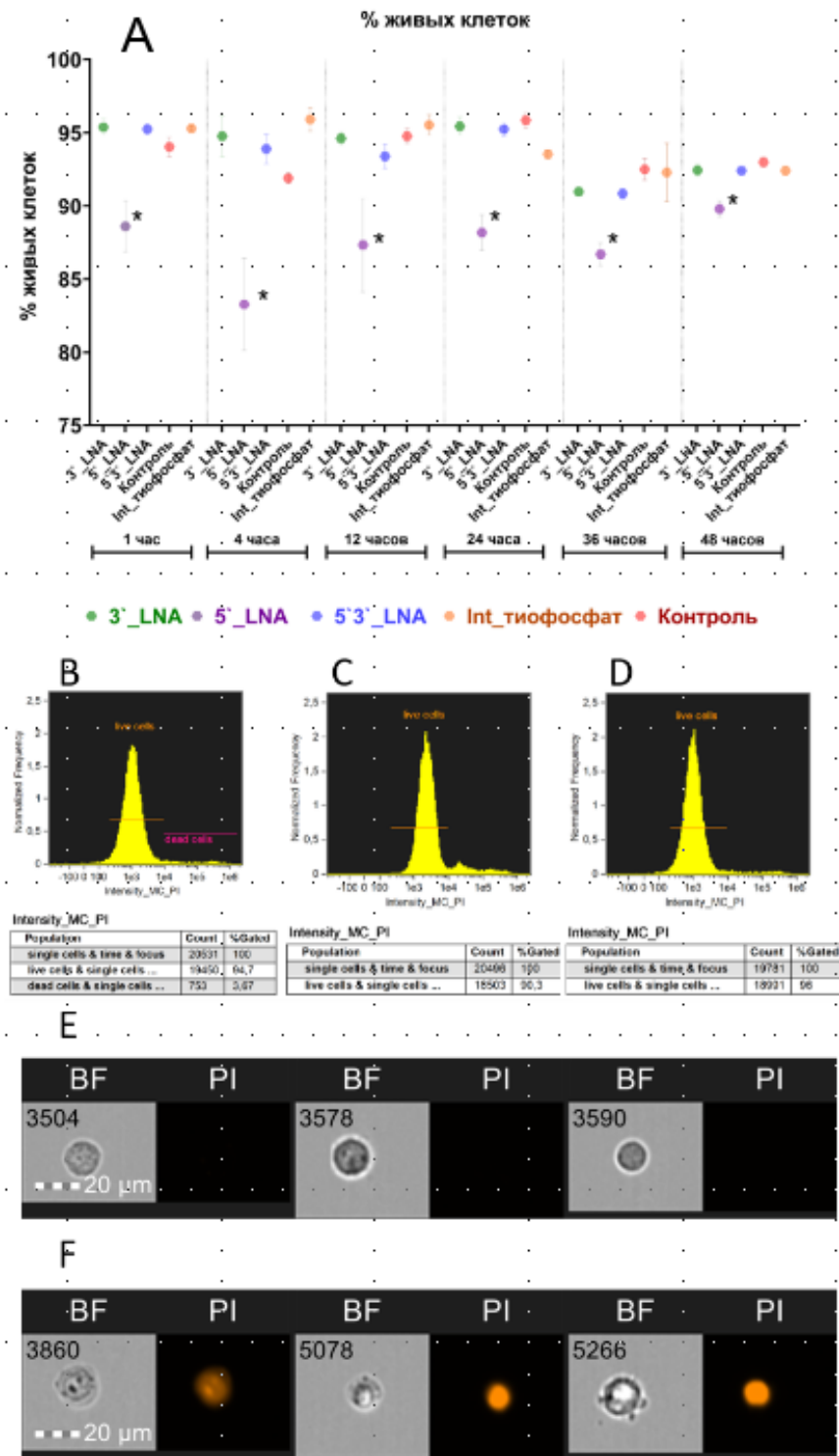


Рисунок 40 - Жизнеспособность клеток культуры МТ-4 при добавлении олигонуклеотидов. А – график жизнеспособности клеток в зависимости от добавленной модификации олигонуклеотида или его отсутствия (контроль) и

времени *значение статистически значимо различалось в сравнении с другими значениями данной хронологической точки отбора проб; В – популяция живых и погибших клеток в контрольном образце через час культивирования; С - популяция живых клеток в образце с добавлением 5'-LNA олигонуклеотида; D - популяция живых клеток в образце с добавлением 3'-LNA олигонуклеотида; E – изображения живых клеток, не имеющих сигнала в канале PI, ; F – изображения погибших клеток с флуоресцентным сигналом от PI.

В большинстве образцов, содержащих модифицированные олигонуклеотиды, значения жизнеспособности клеток не показали статистически значимых отклонений от контрольной группы на протяжении большей части экспериментального периода. Исключение составила 5'-LNA-модификация, вызвавшая выраженное снижение жизнеспособности. Через 1 час инкубации жизнеспособность составила $88,6 \pm 1,74\%$ (Рисунок 42С), через 4 часа — $83,27 \pm 3,16\%$ ($\eta^2 = 0,84$; $*p = 0,128$), а к 48 часам частично восстановилась до $89,8 \pm 0,54\%$ ($p = 0,338$). Наблюдаемые колебания в группе с 5'-LNA-модификацией не достигли порога статистической значимости ($p > 0,05$), что говорит о устойчивом снижении жизнеспособности в сравнении с контрольным образцом ($p < 0,001$) и образцами с другими модификациями ($p < 0,001$ для всех попарных сравнений). Отсутствие полного восстановления жизнеспособности к 48 часам может указывать на потенциальное влияние данной модификации на метаболические процессы клеток.

При исследовании проникновения была измерена доля клеток, которые абсорбировали олигонуклеотиды (на мембране или в цитоплазме клетки, Рисунок 43) и доля событий, у которых сигнал от меченных нуклеотидов обнаруживался в цитоплазме клетки (интернализация пробы, Рисунок 41).

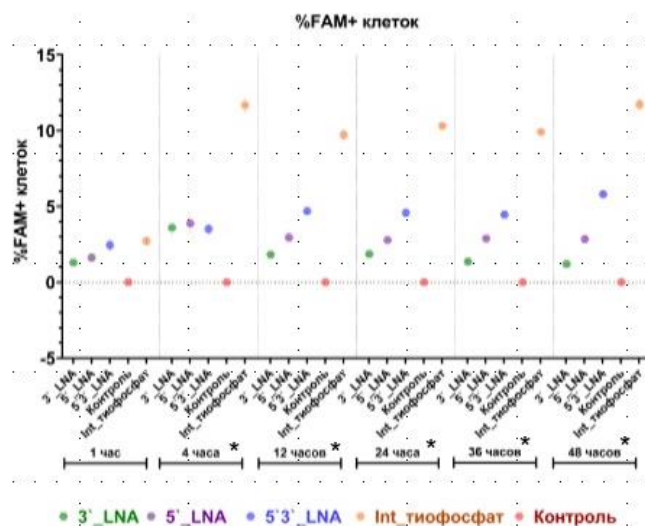


Рисунок 41 – Абсорбция олигонуклеотидов клетками МТ-4: А – график зависимости количества жизнеспособных клеток от используемой модификации и времени культивирования, *все значения имели статистически значимые различия на всем временном промежутке начиная с 4 часов инкубации ($p < 0,05$); В – демонстрация клеток из популяций с FAM+ сигналом и без него.

Полученные экспериментальные данные демонстрируют, что все изученные химические модификации олигонуклеотидов способны взаимодействовать с клеточной поверхностью. Однако их эффективность существенно отличается в зависимости от места внедрения модификации. Статистический анализ с применением F-критерия выявил значимые различия между группами ($p < 0.001$), а величина эффекта ($\omega^2 = 0.95\text{--}0.99$) подтверждает, что химическая структура олигонуклеотидов является ключевым фактором, определяющим их способность к клеточному поглощению.

Наибольшая эффективность абсорбции наблюдалась у образца в PS-модификации (Int). После 1 часа инкубации разница в абсорбции между Int и симметричной 5'3'-LNA-модификацией не достигала статистической значимости ($p = 0.53$), однако при сравнении Int с концевыми LNA-вариантами (5'-LNA и 3'-LNA) различия были статистически значимыми ($p < 0.001$).

В этот временной интервал доля клеток, связавших Int, составила $2,72 \pm 0,243\%$, тогда как для 5'3'-LNA, 3'-LNA и 5'-LNA значения находились в диапазонах $2,44 \pm 0,374\%$, $1,3 \pm 0,051\%$ и $1,62 \pm 0,163\%$ соответственно.

Через 4 часа инкубации преимущество тиофосфатной модификации стало ещё более выраженным ($p < 0.001$ для всех сравнений). Ранжирование эффективности поглощения соответствовало следующей иерархии: Int > 5'3'LNA > 5'LNA > 3'LNA. Это указывает на то, что позиция LNA-модификации играет критическую роль. Вероятно, симметричное расположение (5'3'-LNA) обеспечивает более стабильное взаимодействие с цитоплазматической мембраной и/или лучшую устойчивость во внутриклеточной среде.

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 42.

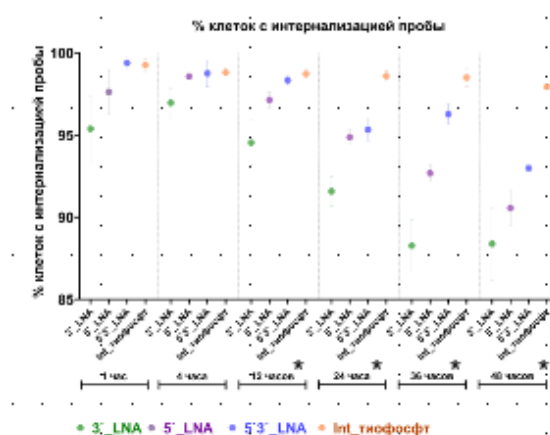


Рисунок 42 – Результаты оценки проникновения олигонуклеотидов различных модификаций в цитоплазму клеток МТ-4 с течением времени. А – доля клеток с внутриклеточной локализацией сигнала FAM, *все значения имели статистически значимые различия на всем временном промежутке начиная с 12 часов инкубации ($p < 0,05$); В – визуализация популяций клеток с сигналом FAM на мембране и в цитоплазме клетки. С – значение коэффициента интернализации в зависимости от используемой модификации и времени, *все значения имели статистически значимые различия на всем временном промежутке начиная с 24 часов инкубации ($p < 0,05$)

Полученные данные демонстрируют, что все исследуемые модификации олигонуклеотидов — тиофосфатная (Int) и LNA-модификация (5'3'-LNA, 5'-LNA, 3'-LNA) — эффективно проникают в цитоплазму клеток, о чём свидетельствует доля FAM+ клеток, превышающая 90% во временных точках отбора проб. Однако статистический анализ выявил значимые межгрупповые различия ($p < 0,05$),

подтверждающие влияние химической структуры на эффективность поглощения и внутриклеточную стабильность.

PS-модификация (Int) продемонстрировала максимальные показатели: доля FAM+ клеток варьировала в диапазоне $92.41 \pm 0.252\%$ – $95.53 \pm 0.719\%$ на всех этапах инкубации (1–24 часа), причём вариабельность между репликами была минимальной. Это указывает на высокую устойчивость PS-модификация Int к деградации и стабильное взаимодействие с клеточными мембранами.

Симметричная LNA-модификация (5'3'-LNA) показала сопоставимую с PS-модификацией Int эффективность проникновения в первые 12 часов культивирования ($p > 0,05$). Однако к 24 часам различие достигло статистической значимости ($p < 0,05$), хотя абсолютная разница составила лишь 2–5%. Аналогичная динамика наблюдалась для LNA-модификации на 5'-конце.

Наименьшая эффективность проникновения зафиксирована для 3'-LNA-модификации: доля FAM+ клеток была существенно ниже, а вариабельность между повторами — выше. Это может быть связано с ускоренной деградацией олигонуклеотидов в эндосомах под действием экзонуклеаз.

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 43). Энтропия отражает степень неупорядоченности распределения

молекул: более высокие значения соответствуют равномерной диффузии, тогда как низкие — агрегации или локализованному накоплению.

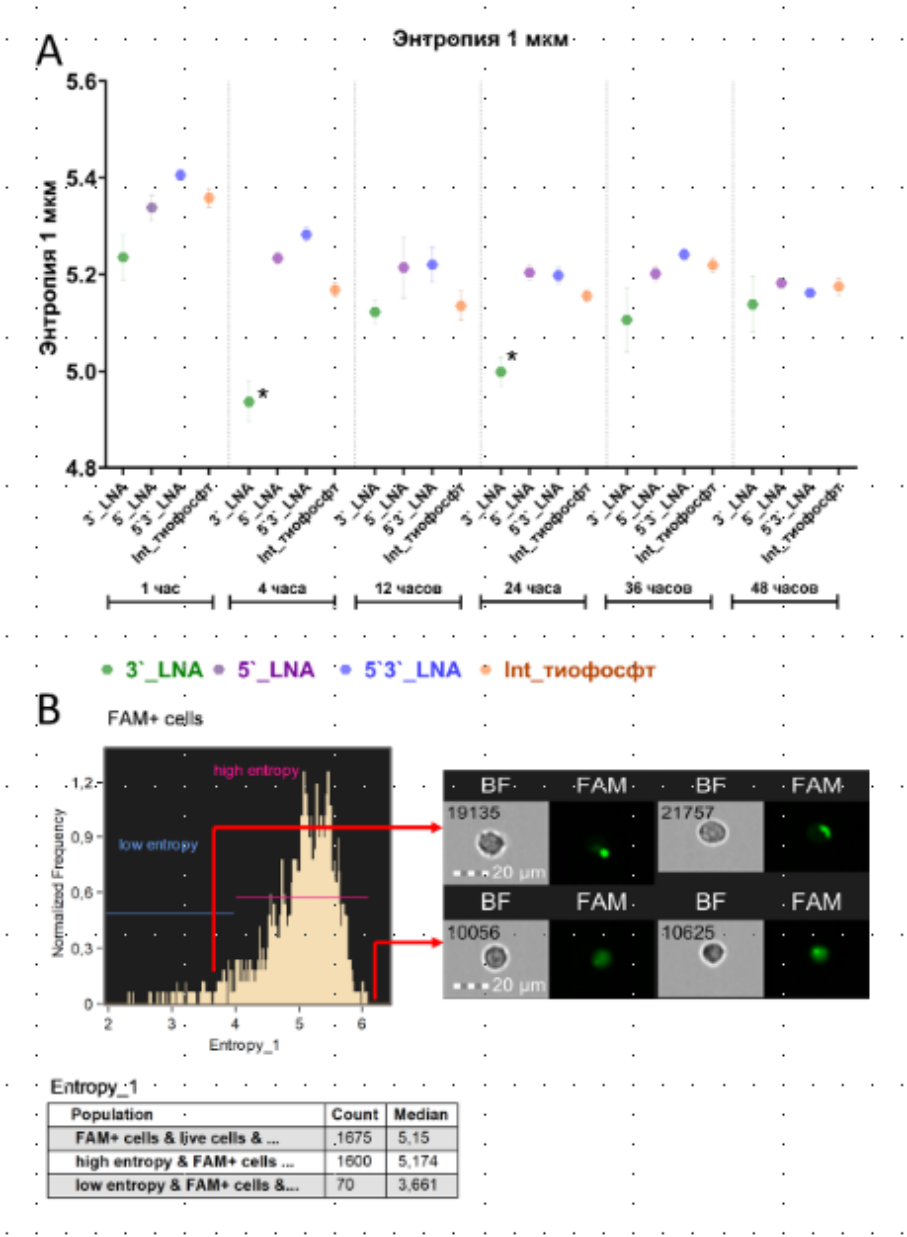


Рисунок 43. Результаты исследования энтропии олигонуклеотидов в цитоплазме клеток: А – среднее значение энтропии с указанием средней ошибки в зависимости от модификации и времени культивирования *значение статистически значимо различалось в сравнении с другими значениями данной хронологической точки отбора проб; В – демонстрация распределения сигнала FAM, конъюгированного с олигонуклеотидами, в цитоплазме клеток с высокой и низкой энтропией.

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 . Тем не менее, в периоде с 1 часа до 36 часов культивирования включительно наибольшее значение энтропии имел образец с 5'3'-LNA модификацией. После 48 часов культивирования значения тиофосфатной и 5'-LNA модификации были больше, чем в образце с 5'3'-LNA модификацией ($5,18 \pm 0,008$ и $5,16 \pm 0,006$ соответственно).

3.2 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 изолантолактона содержащие пиримидиновый фрагмент через триазольный линкер; синтезированы производные

дезоксихолевой кислоты, модифицированное по 3му 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». Антитретовирусную активность соединений исследовали в отношении ВИЧ-1 суб-субтипа А6 МТТ-методом 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 специальной программы SoftMax Pro 4,0.

Скрининг МТТ-методом полученных соединений не выявил препаратов с противовирусной активностью (Приложение 1). Пример результатов исследования представлен на рисунках 44-47.

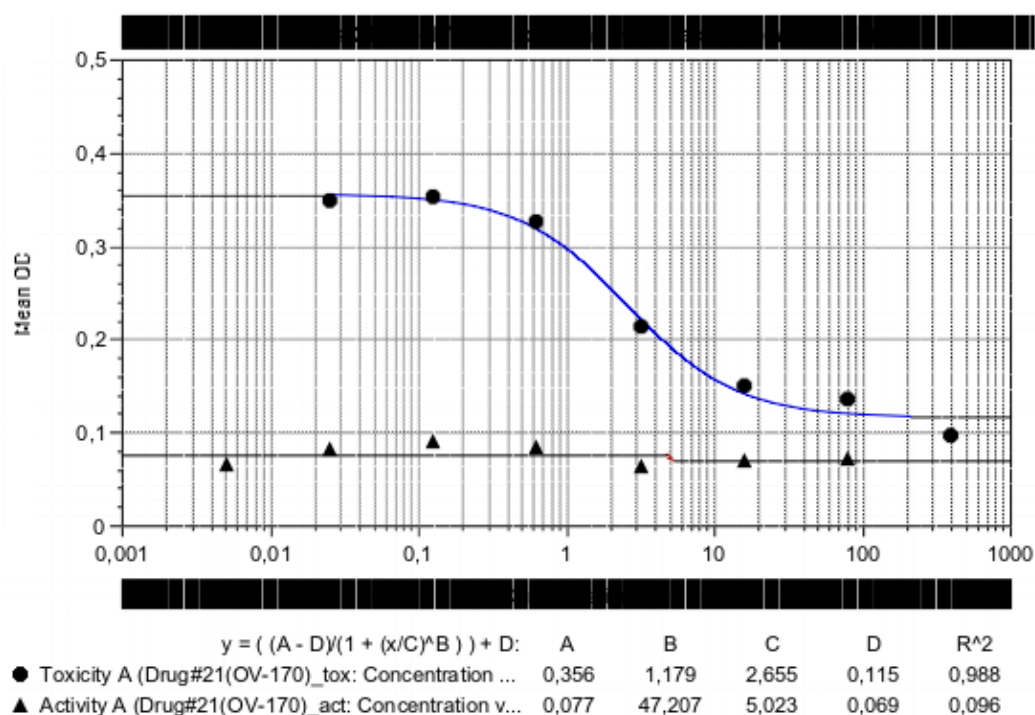


Рисунок 44 – График токсичности и противовирусной активности исследуемого соединения OV-170 с низким показателем токсичности CC_{50}

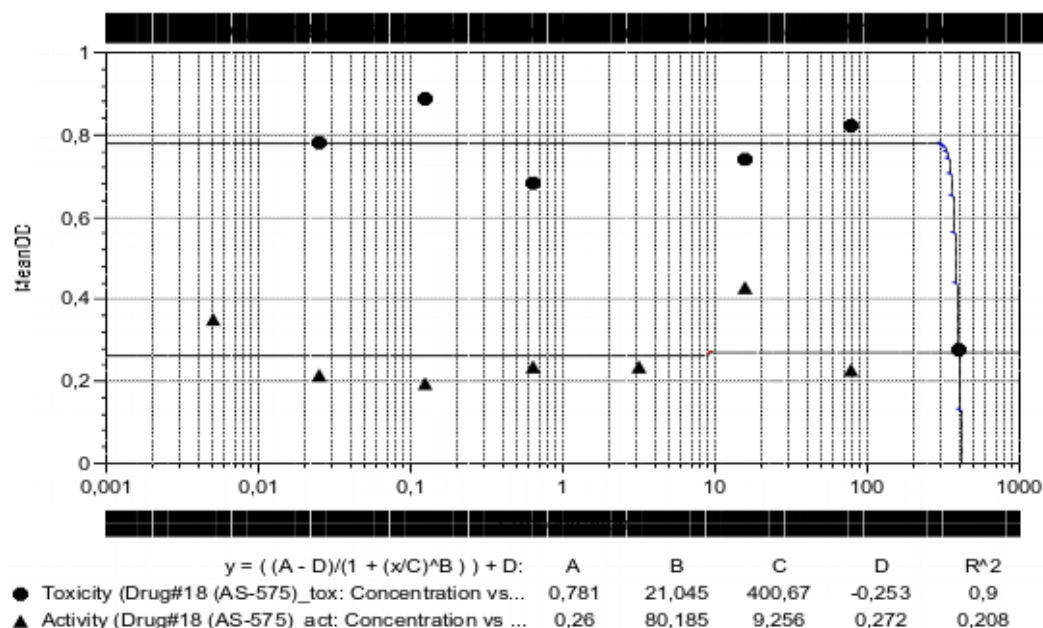


Рисунок 45 – График токсичности и противовирусной активности исследуемого соединения AS-575 с высоким показателем токсичности CC_{50}

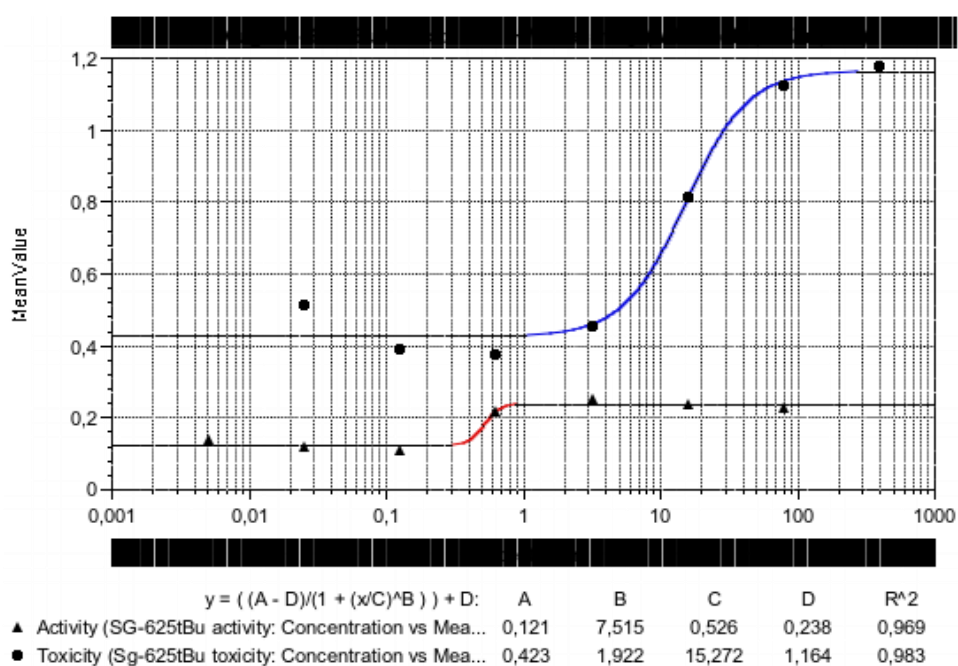


Рисунок 46 – График токсичности и противовирусной активности исследуемого соединения Sg-625tBu с низким показателем токсичности CC_{50}

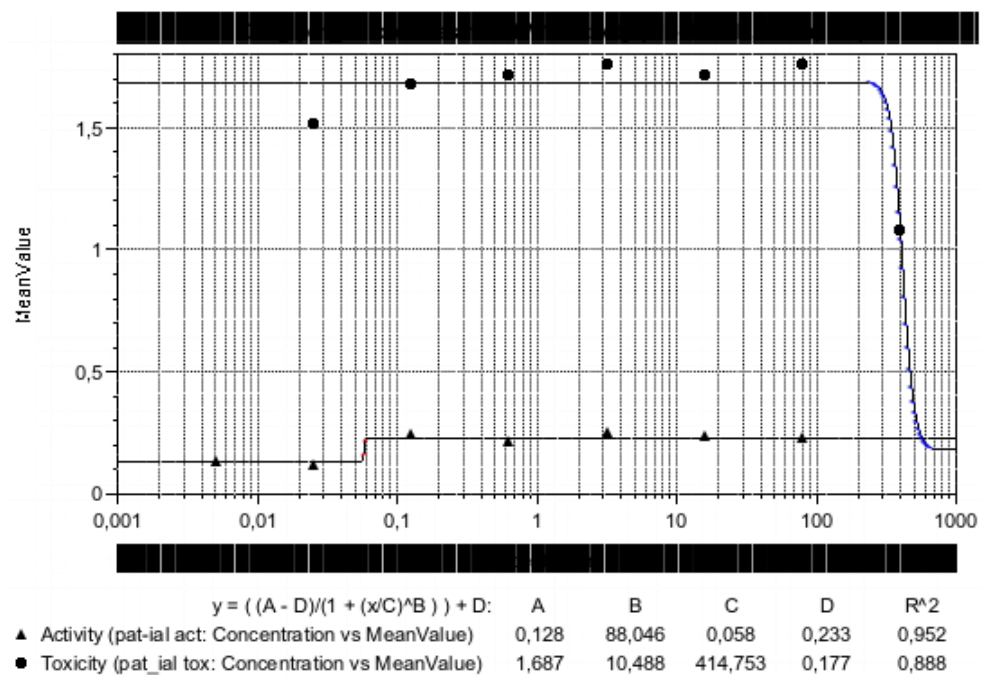


Рисунок 47 – График токсичности и противовирусной активности исследуемого соединения pat-ial с высоким показателем токсичности CC_{50}

3.3. 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 для изучения их способности ингибировать репродукцию ВИЧ-1 и цитотоксичности (Рисунки 48-53).

Препарат **ВВ 0283870** (2SR,3aSR,8aRS)-2-(3-Fluoro-4-(trifluoromethyl)phenyl)-7-((5-(hydroxymethyl)thiazol-2-yl)methyl)-3a-methyloctahydropyrrolo[2,3-c]azepin-4(1H)-one

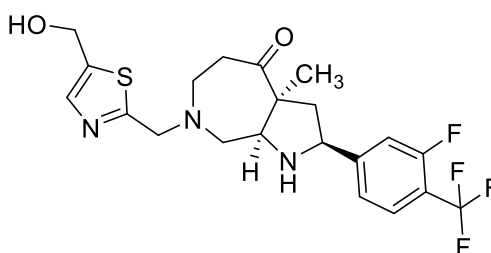


Рисунок 48 – Структура соединения ВВ 0283870 производного цис-аннелированного пирролидина

Это модификация структурного типа ингибиторов проникновения NBD-11021, предположено, что дополнительные конформационные ограничения в линкерной цепи и замена пиррольного цикла на пирролидиновый приведут к улучшению токсичности и увеличению селективности.

Препарат **ВВ 0283885** (2SR,3aSR,8aRS)-2-(3-Fluoro-4-(trifluoromethyl)phenyl)-7-((5-(hydroxymethyl)thiazol-2-yl)methyl)octahydropyrrolo[2,3-c]azepin-4(1H)-one

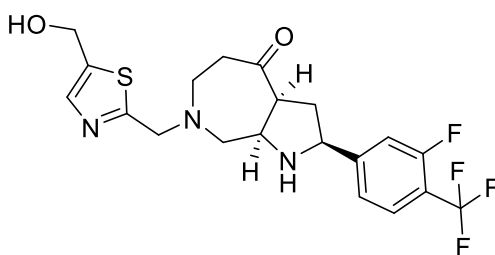


Рисунок 49 – Структура соединения BB 0283885 производного цис-аннелированного пирролидина.

В отличие от препарата **BB 0283870** содержит в сочленении циклов только атомы водорода.

Препарат **BB 0283886** (2SR,3aSR,8aRS)-2-(3-Fluoro-4-(trifluoromethyl)phenyl)-7-(5-(hydroxymethyl)thiazole-2-carbonyl)octahydropyrrolo[2,3-c]azepin-4(1H)-one

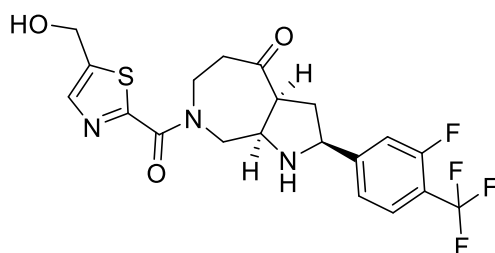


Рисунок 50 – Структура соединения производного цис-аннелированного пирролидина

В отличие от препарата **BB 0283885** содержит амидную группу, соединяющую тиазольный фрагмент с азепиновым циклом в цис-аннелированном бицикле

Препарат **BB 0283888** (2SR,3aSR,8aRS)-2-(3-Fluoro-4-(trifluoromethyl)phenyl)-7-((4-(hydroxymethyl)thiazol-2-yl)methyl)octahydropyrrolo[2,3-c]azepin-4(1H)-one

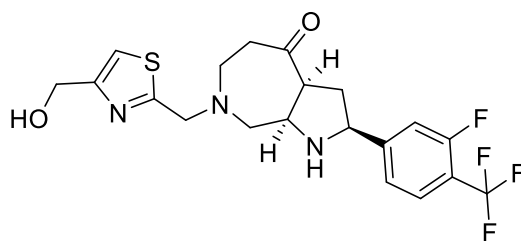


Рисунок 51 – Структура соединения производного цис-аннелированного пирролидина

В отличие от препарата **ВВ 0283885** содержит гидроксиметильный фрагмент в положении 4 тиазольного цикла, в литературе известноⁱ, что размещение гидроксиметильной группы в 4 положении вместо 5 положения может приводить к увеличению противовирусной активности.

Препарат **ВВ 0284050** 4-((2-((4-Сyanophenyl)amino)-5-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)pyrimidin-4-yl)oxy)-3,5-dimethylbenzonitrile

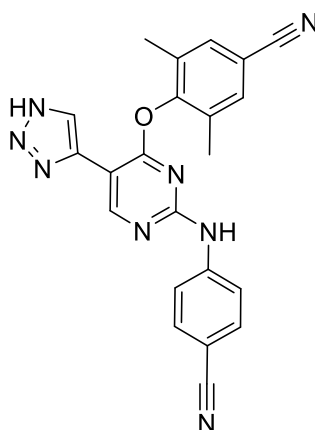


Рисунок 52 – Структура соединения производного 2,4,5-тризамещенного пиримидина (дирилгетпиримидин - ДАНРҮ)

Новый тип диарилпиримидинов – известных ингибиторов обратной транскриптазы, в отличие от известных в литературе ННИОТ-ингибиторов второго поколения, в данном случае осуществлена модификация в 5'-положении пиримидина введением в него триазольного кольца, которое является биоизостером амидной группы.

В качестве контрольного препарата для «слепого» исследования был взят препарат **ВВ 0274001** (S)-N-(2-Amino-1-(4-(hydroxymethyl)thiazol-2-yl)ethyl)-5-(3-

fluoro-4-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-pyrrole-2-carboxamide dihydrochloride) – ингибитор проникновения NBD-14189, противовирусная активность которого была ранее показана на модели псевдовирuсов ВИЧ-1.

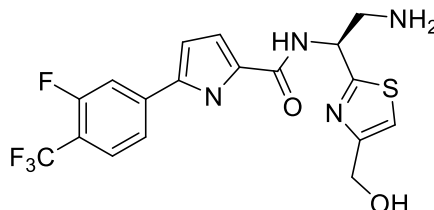


Рисунок 53 – Структура соединения BB 0274001 производного 5-арилпирролкарбоновой кислоты

BB 0274001 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 иммунных клеток [158]. Препарат BB 0274001 действует на самой ранней стадии жизненного цикла ВИЧ (проникновение) и имеет принципиально иную мишень, что делает его перспективным для лечения мультирезистентных форм вируса.

Для исследования противовирусной активности для всех препаратов был приготовлен исходный раствор в 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).

Выполненные исследования не выявили наличия противовирусной активности соединений BB 0283870, BB 0283885, BB 0283886 и BB 0283888.

Культивирование ВИЧ-1 в присутствии ВВ 0284050 зарегистрировало наличие противовирусной активности, 50 % ингибирующая концентрация (IC_{50}) для ВВ 0284050 составила 0,186 мкг/мл (Рисунок 54).

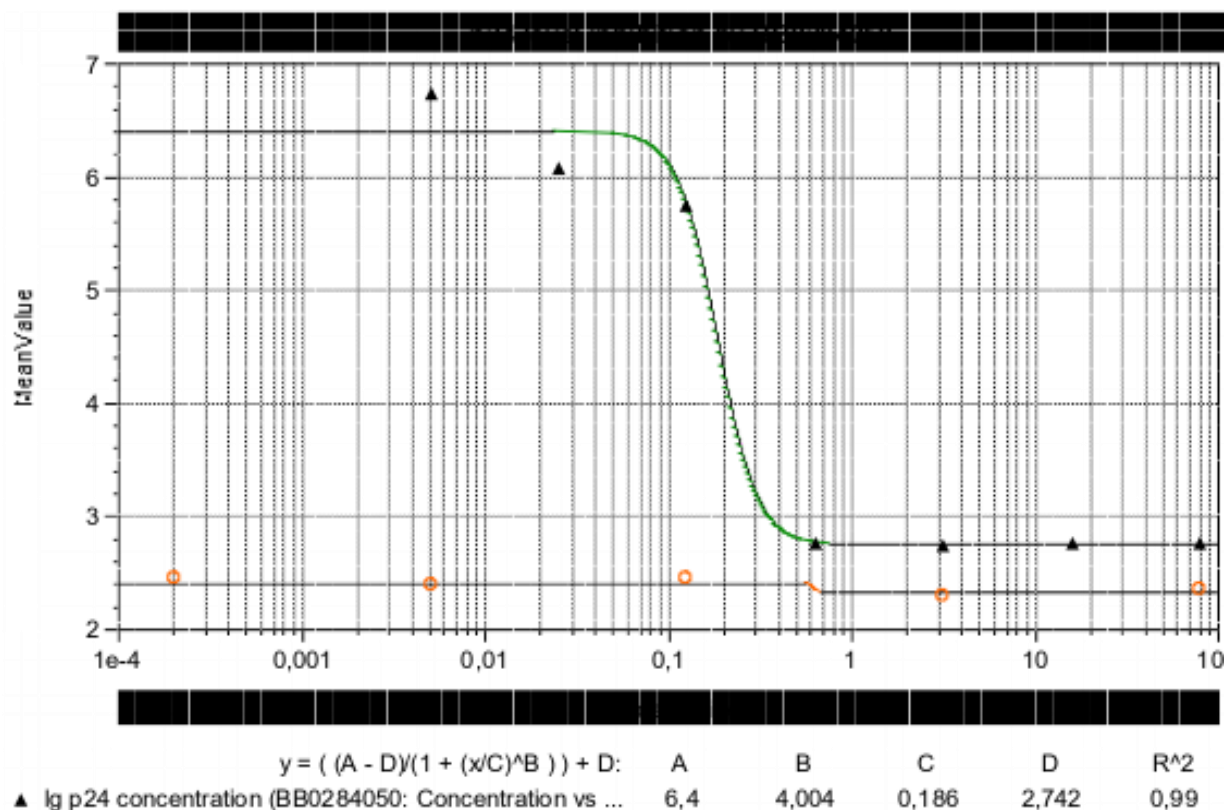


Рисунок 54 – Результаты исследования препарата ВВ 0284050 методом ИФА в отношении ВИЧ-1

При инкубировании ВИЧ-1 с добавлением препарата ВВ 0274001 была подтверждена его эффективность по ингибированию репродукции ВИЧ-1, 50% ингибирующая концентрация (IC_{50}) для ВИЧ-1 составила 0,16 мкг/мл (Рисунок 57).

Данный препарат был получен вместе с набором других веществ. До исследования все препараты имели «слепую» кодировку, то есть не было известно о возможном наличии среди данного набора химических веществ контрольного препарата с подтвержденной антиретровирусной активностью.

После получения данных по результатам анализа противовирусной активности соединений разработчиками было сообщено о том, что данный препарат был включен в исследуемую выборку веществ в качестве внутреннего положительного контроля с подтвержденной ранее способностью ингибировать репродукцию ВИЧ-1.

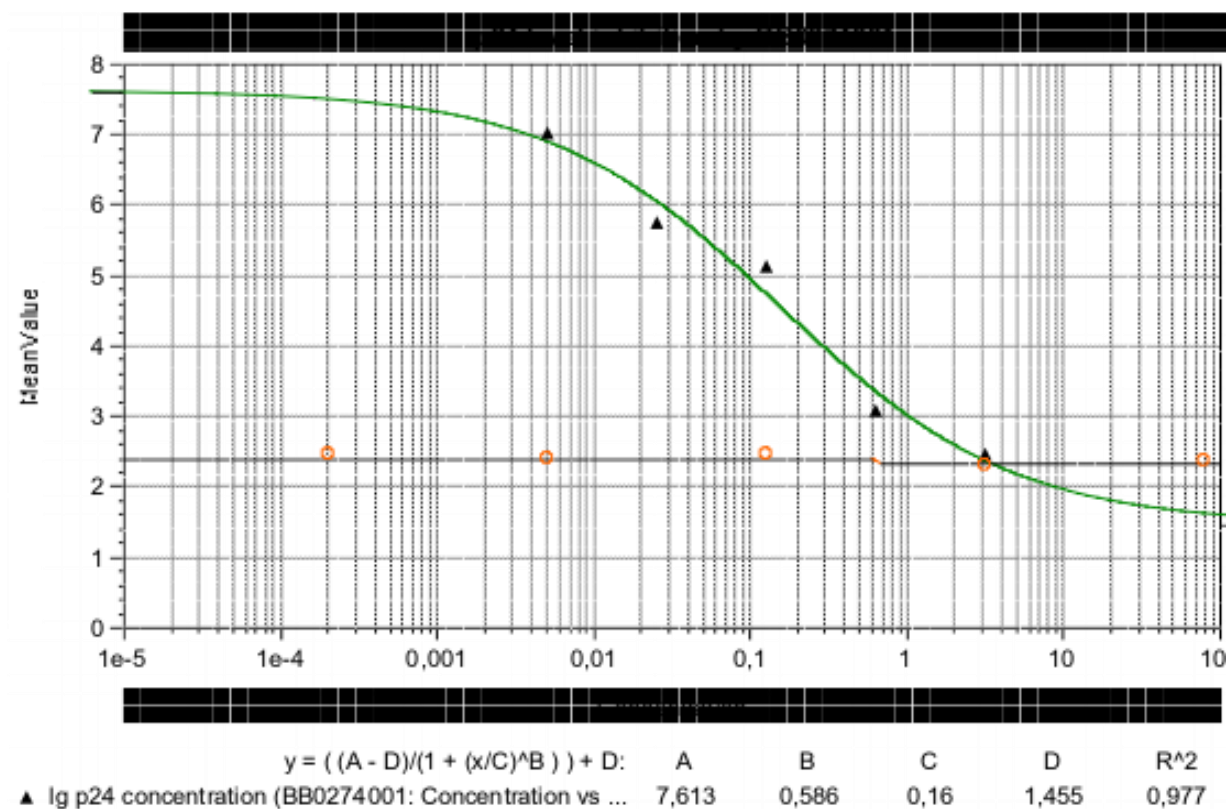


Рисунок 55 – Результаты исследования препарата ВВ 0274001 методом ИФА в отношении ВИЧ-1

Препарат эфавиренз использовался в качестве положительного контроля при исследовании антиретровирусной активности новых синтезированных соединений (Рисунок 56), 50 % ингибирующая концентрация (IC₅₀) данного соединения для ВИЧ-1 составила 0,0007 мкг/мл, что соответствует данным литературы.

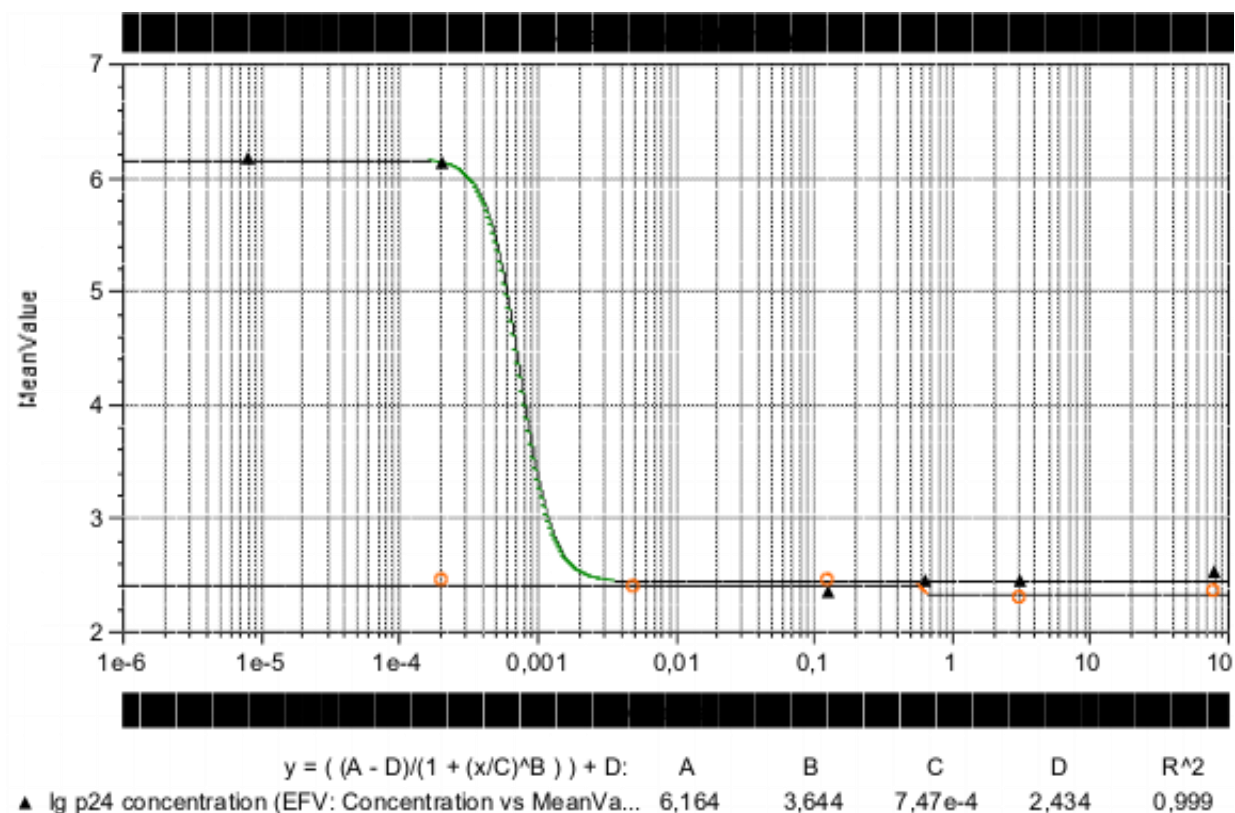


Рисунок 56 – Результаты исследования контрольного препарата эфавиренз методом ИФА в отношении ВИЧ-1

Для соединений ВВ 0284050 и ВВ 0274001 была исследована 50%-ая цитотоксическая доза (CC_{50}) МТТ-методом и определен индекс селективности (SI) (Таблица 13).

Таблица 13. Результат исследования цитотоксического воздействия, противовирусной активности (IC_{50}) исследованных препаратов (CC_{50}) на клетки МТ-4 через 5 суток после их добавления в культуральную среду МТТ-методом и значения рассчитанного индекса селективности (SI).

Обозначение соединения	IC_{50} , мкг/мл	CC_{50} , мкг/мл	Индекс селективности (SI)
ВВ 0274001	$0,166 \pm 0,04$	$18,0 \pm 0,95$	108,4
ВВ 0284050	$0,186 \pm 0,008$	$82,0 \pm 4,1$	440,1
Эфавиренз	$0,0007 \pm 0,00006$	$10,7 \pm 0,8$	15285,7

Таблица 13.1. Данные статистического анализа 50% концентрации (IC_{50}) комбинаций и моно-олигонуклеотидов с применением ANOVA с указанием критерия Фишера (F-критерий).

	ВВ 0274001	ВВ 0284050	Эфавиренз
ВВ 0274001	-	-	$p < 0,001$
ВВ 0284050	-	-	$p < 0,001$

Соединение ВВ 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 иммунных клеток. Данное соединение было выбрано в качестве референсного, поскольку проявило противовирусные свойства при исследованиях на других модельных системах [158].

Проведенное нами исследование подтвердило наличие антиретровирусной активности ВВ 0274001 ($SI=100,0$), выявленное ранее на другой модельной системе для скрининга потенциальных ингибиторов ВИЧ-1.

Проведенное исследование выявило наличие способности ингибировать репродукцию ВИЧ-1 для ВВ 0284050 ($SI=430,1$). Данное соединение теоретически разработано как новый ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы ВИЧ-1 (ННИОТ). Соединение ВВ 0284050 представляет особый интерес, так как является производным 2,4,5-тризамещенного пиримидина и относится к новым типам диарилпиримидинов.

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На основе проведенного анализа субтип-специфического полиморфизма в нуклеотидных последовательностях ВИЧ-1, депонированных в GenBank, было выбрано 8 участков в геноме ВИЧ-1. Данные участки находились в областях гена *pol* – 4 участка (фрагменты областей, кодирующих интегразу и обратную транскриптазу вируса), в области праймер-связывающего сайта (PbS) – 2 участка, и в гене *gag* ВИЧ-1 – 2 участка.

На основе теоретического анализа данных по структурно-функциональным особенностям ВИЧ-1 отобраны локусы, функционально важные для репликации вируса: PPT (polypurine tract) и cPPT (расположен в гене интегразы, центральная область генома), блокирование которых антисмысловыми олигонуклеотидами приводит к полной остановке синтеза ДНК вируса.

На первом этапе были синтезированы и исследованы 21-22-звенные олигодезоксирибонуклеотиды, направленные на участки генома ВИЧ-1, кодирующие фермент интегразу. В качестве средств доставки данных олигонуклеотидов внутрь клеток использовали соответствующие комплементарные им короткие 13-звенные олигонуклеотиды, содержащие три додецильных остатка ([Dcyl]) в своей структуре. Значения IC₅₀ исследованных олигонуклеотидов показало, что наилучшей антиретровирусной активностью обладал олигонуклеотид Int III.

Поэтому на втором этапе исследования был осуществлен синтез олигонуклеотида Int III с внедренными различными химическими модификациями для сравнительного изучения противовирусной активности. Исследование противовирусной активности модифицированных антисмысловых олигонуклеотидов Int III показало, что наилучшей ингибирующей способностью обладает тиофосфатный олигонуклеотид Int III(s). Также показано, что олигонуклеотиды, содержащие фосфотиоатную модификацию, имеют

антиретровирусную активность, сопоставимую с активностью олигонуклеотидов, имеющих в своем составе додецил-содержащие звенья.

Поскольку тиофосфатная модификация показала наилучшую активность, также были синтезированы 35-звенные олигодезоксирибонуклеотиды, направленные на ингибирование обратной транскриптазы ВИЧ-1 R и его тиофосфатный аналог RS. Были синтезированы 20- и 30-звенные тиофосфатные олигонуклеотиды, последовательность которых была направлена на консервативные участки генома ВИЧ-1 в области праймер-связывающего сайта для подавления обратной транскрипции PbS-1, PbS-2 и область гена *gag* Gag-1 и Gag-2. Наилучшие показатели IC_{50} были получены для фосфотиоатных олигонуклеотидов Int III(S) и удлиненного варианта PbS-II $0,09 \pm 0,01$ мкМ и $0,09 \pm 0,01$ мкМ соответственно, хотя стоит отметить что активность всех олигонуклеотидов находилась в микро молярном диапазоне.

В рамках исследования проведена оценка антиретровирусной активности тиофосфатных олигонуклеотидов с внедренной LNA-модификации по 3'- и/или 5'-концам нуклеотидной последовательности. Теоретической основой для выбора данных модификаций послужили их известные свойства, такие как повышенная устойчивость к деградации за счет замещения кислорода серой в фосфодиэфирной связи, улучшенная гибридизация с мишенью благодаря конформационной ригидности LNA [77], а также снижение отрицательного заряда молекулы, облегчающее взаимодействие с клеточной мембраной и эндоцитоз [39; 90]. Анализ данных показал, что различия в полученных значениях IC_{50} регистрировались именно для олигонуклеотидов, имеющих дополнительно введенные LNA-модификации. Размещение LNA-модификации по 3'- или 5'-концу нуклеотидной последовательности не вносило существенных различий в противовирусную активность каждого из исследованных целевых олигонуклеотидов, при этом наибольшая эффективность подавления ВИЧ наблюдалась для PS-олигонуклеотидов без LNA-модификации. В выполненном нами исследовании LNA-модифицированные олигонуклеотиды проявили антиретровирусную активность *in vitro* также в микромолярных концентрациях. В том числе

размещение LNA одновременно по обоим концам последовательности максимально снижало противовирусную активность олигонуклеотидов по сравнению с их PS-модификацией, что может быть связано со сниженной способностью таких олигонуклеотидов к интернализации. Подобные результаты были описаны Juliano et al. (2016), где избыточная химическая модификация ухудшала проникновение молекул через клеточные мембраны из-за увеличения стерической затрудненности и неспособности такого олигонуклеотида работать как лиганд [91]. С другой стороны, некоторые авторы описывают большую эффективность LNA-модифицированных олигонуклеотидов в сравнении с немодифицированными антисмысловыми олигонуклеотидами и ДНКзимами, но без сравнения с той же фосфотиоатной модификацией [39; 77]. Стоит отметить, что в многих работах авторы используют плазмидную конструкцию, содержащую фрагменты генома ВИЧ, а не инфекционно компетентный изолят [82; 121].

Выявленные различия в активности между целевыми олигонуклеотидами в одной модификации, возможно, обусловлены биологической доступностью мишени в геноме вируса для связывания с олигонуклеотидом. Результаты согласуются с данными Jakobsen et al. [89], где аналогичные мишени в консервативных областях ВИЧ-1 также демонстрировали противовирусную активность олигонуклеотидов в микромолярных концентрациях (IC_{50}).

Далее были отобраны олигонуклеотиды, показавшие наилучшие значения IC_{50} и исследованы в виде комбинаций. Использование комбинаций олигонуклеотидов, нацеленных на разные мишени жизненного цикла вируса, привело к усилению их противовирусной эффективности по сравнению с аналогичными моно-олигонуклеотидами. Наилучший показатель IC_{50} ($29 \pm 1,7$ нМ) получен для комбинации PbS-2+RS (область гена *gag* + область праймер-связывающего сайта). При этом аналогичная комбинация, но в связке с не фосфотиоатной модификацией олигонуклеотида, а додецил-содержащим олигонуклеотидом (PbS-2+R), показала значение IC_{50} $46 \pm 3,6$ нМ несколько ниже, чем остальные исследованные комбинации. Возможно это связано со сниженной способностью проникновения в клетки додецильных олигонуклеотидов по

сравнению с тиофосфатными, что снижает возможность встречи олигонуклеотида с мишенью.

Фосфотиоатная модификация была исследована ранее для блокировки слияния белка gp41 ВИЧ-1 и ко-рецептора клетки, но не была исследована степень проникновения соединений в лимфоидные клетки. В аналогичном исследовании авторы использовали фосфотиоатные олигонуклеотиды с имидазолом и аминной группой, где также была показана активность нескольких вариантов последовательностей, но проникновение в цитоплазму клеток не было исследовано. Поскольку клетки лимфоидного типа являются трудно трансфецируемыми, было важно подтвердить проникновение олигонуклеотидов внутрь клетки с помощью современных методов флуоресцентной микроскопии. Показано, что введение тиофосфатной модификации позволяет олигонуклеотидам проникать внутрь лимфоидных клеток человека МТ-4 без использования дополнительных трансфецирующих агентов. При этом использование тиофосфатных модификаций и додецил-содержащих производных в одной транспортной конструкции (FAM-ON/DON) позволяет олигонуклеотидам проникать не только в ядро клетки, но и в ядрышко, что можно считать одним из основных преимуществ для дальнейшей разработки антиретровирусных конструкций. Внедрение с LNA-модификации в остов олигонуклеотида не повышает их трансфецирующую способность.

Метод конфокальной микроскопии позволяет оценить проникновение олигонуклеотидов внутрь клеток, но не дает возможности оценки их проникновения во всей трансфецируемой популяции клеток. Поэтому изучение клеточной интернализации для популяции клеток проводилось посредством проточной цитометрии с визуализацией. Данные проточной цитометрии с визуализацией использовались для исследования абсорбции и проникновения олигонуклеотидов, коэффициента интернализации (отношения внутриклеточного сигнала к мембранному), энтропия, оценивающая равномерность локализации олигонуклеотидов.

Наиболее эффективной, с учетом всех исследуемых характеристик, оказалась фосфотиоатная модификация (PS). Она имела низкую токсичность (>92% жизнеспособных клеток в течение 48 часов культивирования), высокую способность сорбции к цитоплазматической мембране ($\approx 12\%$ FAM+ клеток после 48ч) и проникновению ($\approx 98\%$ FAM+ клеток с сигналом из области цитоплазмы), имела высокие коэффициенты интернализации и энтропии.

При рассмотрении группы LNA-модификации можно выделить преимущества одноконцевой модификации с 5'-конца и по обоим концам молекулы, которые обладали схожими характеристиками с PS-модификацией по интернализации и энтропии до 24 часов культивирования. Однако, они имели меньше клеток, абсорбировавших олигонуклеотиды (3-6%) на точке 48 часов культивирования в сравнении PS ($\approx 12\%$). 3'-LNA модификация показала большую токсичность и наименее удачную способность к абсорбции и проникновению. По-видимому, это связано со сложностями взаимодействия с мембраной клетки и меньшей устойчивостью к действию экзонуклеаз, начинающих свою работу с 5' конца ДНК. Аналогичные работы, исследующие противовирусную активность LNA-модифицированных олигонуклеотидов, как правило, также отмечали высокую трансфецирующую способность [90].

Олигонуклеотиды в фосфотиоатной модификации имели некоторые преимущества по большинству изученных характеристик, что, вероятно, сказалось на эффективности их противовирусного действия в отношении ВИЧ-1, а учитывая, что значимые процессы жизненного цикла ВИЧ проходят и в ядре клетки (процесс интеграции с хозяйской ДНК), полученные результаты свидетельствуют о высоком потенциале использования данного подхода для разработки средств генной терапии и профилактики против ВИЧ-инфекции.

На основе анализа литературных данных было предположено, что перспективными потенциальными противовирусными соединениями могут являться агенты, сочетающие в себе природный терпеновый блок и азотсодержащий гетероцикл, соединенные между собой различными линкерами, а также изоалантолактоны, тиосемикарбазоны и бициклические кетоны. Также

большой интерес вызывают производные пирролидина, которые могут стать источником нового поколения ННИОТ-препаратов.

Исследование антиретровирусной активности природных соединений не выявило препаратов способных ингибировать репродукцию ВИЧ-1.

Данные, полученные при исследовании химических соединений, выявили молекулы, оказывающие подавление вирусной репродукции.

В ходе работы был исследован ряд химических соединений ВВ 0283870, ВВ 0283885, ВВ 0283886 и ВВ 0283888 представляли собой производные цис-аннелированного пирролидина с различными химическими модификациями, которые вносили конформационные изменения в структуры молекул для улучшения их противовирусных свойств. Данные соединения потенциально относились к классу ингибиторов проникновения и ранее не были исследованы на модели живого вируса *in vitro*. Выполненные в рамках данной работы исследования не выявили наличия противовирусной активности соединений ВВ 0283870, ВВ 0283885, ВВ 0283886 и ВВ 0283888. Полученный результат позволяет сделать вывод о том, что описанные введенные изменения химической структуры не дали прогнозируемого эффекта и привели к потере противовирусной активности препарата.

Соединение ВВ 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 иммунных клеток. Данное соединение было выбрано в качестве референсного, поскольку проявило противовирусные свойства при исследованиях на других модельных системах [158]. Проведенное нами исследование подтвердило наличие антиретровирусной активности ВВ 0274001 (SI=108,4), выявленное ранее на другой модельной системе для скрининга потенциальных ингибиторов ВИЧ-1.

Проведенное исследование выявило наличие способности ингибировать репродукцию ВИЧ-1 для ВВ 0284050 (SI=440,1). Данное соединение теоретически

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

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 (IC₅₀) 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 (IC₅₀) 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 IC₅₀ ($29 \pm 1,7$ 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 BV 0284050 (50%-ная ингибирующая ВИЧ-1 концентрация (IC₅₀) 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 новых препаратов, основанных на генотерапевтических подходах.

Изучение клеточной интернализации модифицированных олигонуклеотидов показало, что додецил-содержащие олигонуклеотиды способны проникать не только в ядро клетки, но и ядрышко. Учитывая, что значимые процессы жизненного цикла не только ВИЧ, но и многих заболеваний проходят в ядре клетки, полученные данные по проникновению олигонуклеотидов позволяют рекомендовать данную модификацию в качестве не только доставщика для генно-терапевтических соединений, но и в качестве самостоятельного ингибитора.

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.

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.

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, что свидетельствует о необходимости дальнейшего поиска эффективных в отношении ингибирования репродукции ВИЧ

препаратов и проверки их противовирусных свойств на модели, максимально приближенной к реальному процессу инфекции.

Получены новые данные по способности соединений цис-аннелированного пирролидина, производного 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 исследований в качестве перспективного препарата против ВИЧ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СООКРАЩЕНИЙ

АРП – антиретровирусные препараты

АРТ – антиретровирусная терапия

ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека первого типа

ВИЧ-2 – вирус иммунодефицита человека второго типа

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДОН – дезоксиолигонуклеотид

ИИ – ингибитор интегразы

ИП – ингибитор протеазы

ИФА – иммуноферментный анализ

ЛВЖ – лица, живущие с ВИЧ

МПК – моноклеар периферической крови

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

н.о. – нуклеотидное основание

п.н. – пар нуклеотидов

НИОТ – нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы

ННИОТ – ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы

ОТ – обратная транскриптаза

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

РНКазы Н – рибонуклеаза Н

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ПМ – плазматическая мембрана

СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита

ЭР – эндоплазматический ретикулум

2'-МОЕ – 2'-O-метоксиэтил модификация

2'-ОМе – 2'-O-метил модификация

АРОВЕС3G – каталитический полипептид типа 3G, корректирующий мРНК аполипопротеина В

ASO – антисмысловые олигонуклеотиды

AZT – азидотимидин/зидовудин

CA – капсид (capsid)

CC₅₀ – 50%-ая токсическая концентрация соединения, приводящая к гибели 50% неинфицированных клеток

CCD – каталитический центральный домен

CCR5 – C-C рецептор хемокина 5-го типа

CXCR4 – C-X-C рецептор хемокина 4-го типа

EFV – эфавиренз

env – ген белков оболочки ВИЧ-1 (envelope gene)

FAM – флюорохромная метка

FDA – Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (U.S. Food and Drug Administration)

gag – ген внутренних белков вириона

Gp – гликопротеин (glycoprotein)

IC₅₀ – 50%-ая эффективная концентрация соединения, приводящая к ингибированию вируса на 50%;

IN – фермент ВИЧ-1 интегразы (integrase)

LEDGF – хроматин-ассоциированный белок человека

LNA – заблокированная нуклеиновая кислота (locked nucleic acid)

LTR – длинные концевые повторы (long terminal repeats)

MA – матриксный белок (matrix)

MVC – маравирик

NC – нуклеокапсид (nucleocapsid)

NVP – невирапин

nef – ген негативного фактора экспрессии

ODN – антисмысловых олигодезоксирибонуклеотиды

PBS – праймер-связывающий сайт ВИЧ-1

PI – витальный краситель пропидий йодид

pol – ген полимеразы

PPT – полипуриновым тракт

PS – тиофосфатная модификация

rev – ген белка регулирующего экспрессию генов вирусных белков

RT – фермент обратная транскриптаза

RRE – элементы взаимодействующие с белком Rev ВИЧ-1 (Rev responsive element)

RSV – вирус саркомы Рауса

SQV – саквинавир

tat – ген трансактивирующего фактора

TM – трансмембранный гликопротеин

UNAIDS – Объединённая программа ООН по ВИЧ/СПИД (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS)

vif – ген вирусного инфекционного фактора

vpr – ген вирусного белка R

vpr – ген вирусного белка U

CC50 – 50%-ая токсическая концентрация соединения, приводящая к гибели 50% неинфицированных клеток

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Артюшин ОИ и др. Синтез конъюгатов камфецена и цитизина с использованием методологии клик-химии и изучение их противовирусной активности // Химия и биоразнообразие. – 2019. – Т. 16. – № 11. – С. e1900340.
2. Беседнова Н. Н. и др. Полифенолы из наземных и морских растений как ингибиторы репродукции коронавирусов // Антибиотики и химиотерапия. – 2021. – Т. 66. – №. 3-4. – С. 62-81.
3. Горобец С. Н. Лекарственные препараты на основе азотсодержащих гетероциклических соединений // Развитие современной науки и технологий в условиях трансформационных процессов. – 2022. – С. 78-81
4. Готфрид Л. Г. и др. Противовирусная активность модифицированных олигонуклеотидов в лимфоидных клетках человека, инфицированных ВИЧ-1 // Юг России: экология, развитие. – 2025. – Т. 19. – №. 4. – С. 57-67
5. Качанов Д.А., Атангулов Г.И., Хамаде Х., Лишкевич И.А., Елшаштири М.Н.Д., Иванян Ж.Н. и др. Особенности назначения антиретровирусных препаратов при лечении ВИЧ-инфицированных пациентов. Международный научно-исследовательский журнал. 2021; (2-3): 25–
6. . Клаус Б. Обзор опыта применения растительных препаратов для лечения острого риносинусита с позиции доказательной медицины // Consilium Medicum. – 2021. – Т. 23. – №. 9. – С. 430-440.
7. Лобанова И. Е. *Astragalus glycyphyllos* (fabaceae): биологически активные вещества, фармакотерапевтическая активность и полезные свойства, использование в фармации и медицине (обзор) // растительный мир азиатской россии: вестник центрального сибирского ботанического сада СО РАН Учредители: Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Сибирское отделение РАН. – 2025. – Т. 18. – №. 3. – С. 210-227.
8. Миллер Р. В., Ягнюков Д. Д., Терах Е. И. Новые нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы для лечения ВИЧ-инфекции // Инновационная наука. – 2020. – №. 6. – С. 159-162.

9. Ожмегова Е. Н., Бобкова М. Р. Лекарственная устойчивость ВИЧ: прежние и современные тенденции //Вопросы вирусологии. – 2022. – Т. 67. – №. 3. – С. 193-205
- 10.Пухов С. А., Семаков А. В. Терпеновые мономеры шеллака-нетоксичные строительные блоки для синтеза новых физиологически активных веществ //Химия и технология растительных веществ. – 2022. – С. 158-158, 10
- 11.Яровая О. И. и др. Синтез конъюгатов изоборнеола и азотсодержащих гетероциклов с использованием методов клик-химии //Современные проблемы органической химии. – 2022. – С. 167-167
- 12.Яровая О. И., Лаев С. С., Салахутдинов Н. Ф. Противовирусные свойства дитерпенов и их производных //Успехи химии. – 2023. – Т. 92. – №. 1. – С. 1-27.
- 13.Яровая О.И., Салахутдинов Н.Ф. Моно- и сесквитерпены как исходная платформа для разработки противовирусных препаратов // Российские химические обзоры. – 2021. – Т. 90. – № 4. – С. 488.
- 14.AIDS, crisis and the power to transform - UNAIDS GLOBAL AIDS UPDATE - 2025. URL: <https://www.unaids.org/en/resources/documents/2025/2025-global-aids-update> (дата обращения 27.12.2025)
15. Adachi H. et al. From antisense RNA to RNA modification: therapeutic potential of RNA-based technologies //Biomedicines. – 2021. – Т. 9. – №. 5. – С. 550.
- 16.Ahmed S., Herschhorn A. mRNA-based HIV-1 vaccines //Clinical microbiology reviews. – 2024. – Т. 37. – №. 3. – С. e00041-24.
- 17.Akinc A. et al. The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs //Nature nanotechnology. – 2019. – Т. 14. – №. 12. – С. 1084-1087.
- 18.Alhamadani F. et al. Adverse drug reactions and toxicity of the food and drug administration–approved antisense oligonucleotide drugs //Drug Metabolism and Disposition. – 2022. – Т. 50. – №. 6. – С. 879-887.

- 19.Andersen R. J., Ntie-Kang F., Tietjen I. Natural product-derived compounds in HIV suppression, remission, and eradication strategies //Antiviral Research. – 2018. – T. 158. – C. 63-77.
- 20.Arechavala-Gomez V., Garanto A. Antisense RNA Design, Delivery, and Analysis. – Springer Nature, 2022. – C. 422.
- 21.Atkins A. J. et al. HIV-1 cure strategies: why CRISPR? //Expert opinion on biological therapy. – 2021. – T. 21. – №. 6. – C. 781-793.
- 22.Azimi F. C., Lee J. E. Structural perspectives on HIV-1 Vif and APOBEC3 restriction factor interactions //Protein Science. – 2020. – T. 29. – №. 2. – C. 391-406.
- 23.Beigel J. H. et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of radavirsen (AVI-7100), an antisense oligonucleotide targeting influenza A M1/M2 translation //British journal of clinical pharmacology. – 2018. – T. 84. – №. 1. – C. 25-34.
- 24.Bekerman E. et al. Long-acting lenacapavir acts as an effective preexposure prophylaxis in a rectal SHIV challenge macaque model //The Journal of Clinical Investigation. – 2023. – T. 133. – №. 16.
- 25.Bekker L. G. et al. HIV infection //Nature Reviews Disease Primers. – 2023. – T. 9. – №. 1. – C. 42.
- 26.Bennett C. F. Therapeutic antisense oligonucleotides are coming of age //Annual review of medicine. – 2019. – T. 70. – №. 1. – C. 307-321.
- 27.Bernardini S. et al. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches //Natural product research. – 2018. – T. 32. – №. 16. – C. 1926-1950
- 28.Bester S. M. et al. Structural and mechanistic bases for a potent HIV-1 capsid inhibitor //Science. – 2020. – T. 370. – №. 6514. – C. 360-364.
- 29.Blair H. A. Ibalizumab: a review in multidrug-resistant HIV-1 infection //Drugs. – 2020. – T. 80. – №. 2. – C. 189-196.
- 30.Bochot A., Couvreur P., Fattal E. Instillation and intravitreal injection of antisense oligonucleotides in the eye: comparison between solution and liposomal dosage forms //II Annual Meeting of the SBTF. – C. 279.

31. Brizzi M. et al. Long-acting injectable antiretroviral therapy: will it change the future of HIV treatment? //Therapeutic Advances in Infectious Disease. – 2023. – T. 10. – C. 20499361221149773.
32. Broder S. The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic //Antiviral research. – 2010. – T. 85. – №. 1. – C. 1-18.
33. Burns J. E. et al. Tolerability of four-drug antiretroviral combination therapy in primary HIV-1 infection //HIV medicine. – 2021. – T. 22. – №. 8. – C. 770-774.
34. Buthelezi L. A. et al. Antisense therapy for infectious diseases //Cells. – 2023. – T. 12. – №. 16. – C. 2119.
35. Cambou M. C., Landovitz R. J. Novel antiretroviral agents //Current Hiv/aids Reports. – 2020. – T. 17. – №. 2. – C. 118-124.
36. Cena-Diez R. et al. Novel naturally occurring dipeptides and single-stranded oligonucleotide act as entry inhibitors and exhibit a strong synergistic anti-HIV-1 profile //Infectious Diseases and Therapy. – 2022. – T. 11. – №. 3. – C. 1103-1116
37. Chahine E. B., Durham S. H. Ibalizumab: the first monoclonal antibody for the treatment of HIV-1 infection //Annals of Pharmacotherapy. – 2021. – T. 55. – №. 2. – C. 230-239.
38. Chan L., Yokota T. Development and clinical applications of antisense oligonucleotide gapmers //Gapmers: Methods and Protocols. – 2020. – C. 21-47.
39. Chery J. et al. Development of locked nucleic acid antisense oligonucleotides targeting ebola viral proteins and host factor Niemann-Pick C1 //nucleic acid therapeutics. – 2018. – T. 28. – №. 5. – C. 273-284.
40. Chiu T. K., Davies D. R. Structure and function of HIV-1 integrase //Current topics in medicinal chemistry. – 2004. – T. 4. – №. 9. – C. 965-977.
41. Choi E. et al. Recent advances in the discovery of small-molecule inhibitors of HIV-1 integrase //Future science OA. – 2018. – T. 4. – №. 9. – C. FSO338.
42. Choudhary M. C., Mellors J. W. The transformation of HIV therapy: One pill once a day //Antiviral Therapy. – 2022. – T. 27. – №. 2. – C. 13596535211062396.

- 43.Ciftci H. et al. Structural insight into host plasma membrane association and assembly of HIV-1 matrix protein //Scientific reports. – 2021. – T. 11. – №. 1. – C. 15819.
- 44.Cilento M. E., Kirby K. A., Sarafianos S. G. Avoiding drug resistance in HIV reverse transcriptase //Chemical reviews. – 2021. – T. 121. – №. 6. – C. 3271-3296.
- 45.Crooke S. T. et al. Antisense technology: an overview and prospectus //Nature reviews Drug discovery. – 2021. – T. 20. – №. 6. – C. 427-453.
- 46.Crooke S. T. et al. Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides //Nature biotechnology. – 2017. – T. 35. – №. 3. – C. 230-237.
- 47.Crooke S. T. et al. The interaction of phosphorothioate-containing RNA targeted drugs with proteins is a critical determinant of the therapeutic effects of these agents //Journal of the American Chemical Society. – 2020. – T. 142. – №. 35. – C. 14754-14771.
- 48.Crooke S. T., Geary R. S. Clinical pharmacological properties of mipomersen (Kynamro), a second generation antisense inhibitor of apolipoprotein B //British journal of clinical pharmacology. – 2013. – T. 76. – №. 2. – C. 269-276.
- 49.Crooke S. T., Vickers T. A., Liang X. Phosphorothioate modified oligonucleotide–protein interactions //Nucleic acids research. – 2020. – T. 48. – №. 10. – C. 5235-5253.
- 50.Damase T. R. et al. The limitless future of RNA therapeutics //Frontiers in bioengineering and biotechnology. – 2021. – T. 9. – C. 628137.
- 51.Del Corpo O. et al. A U1i RNA that enhances HIV-1 RNA splicing with an elongated recognition domain is an optimal candidate for combination HIV-1 gene therapy //Molecular Therapy-Nucleic Acids. – 2019. – T. 18. – C. 815-830
- 52.Deng C. et al. Current scenario on non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (2018-present) //Arabian Journal of Chemistry. – 2022. – T. 15. – №. 12. – C. 104378.
- 53.Deng C. et al. The anti-HIV potential of imidazole, oxazole and thiazole hybrids: A mini-review //Arabian Journal of Chemistry. – 2022. – T. 15. – №. 11. – C. 104242.

- 54.Dhuri K. et al. Antisense oligonucleotides: an emerging area in drug discovery and development //Journal of clinical medicine. – 2020. – T. 9. – №. 6. – C. 2004.
- 55.Dick A., Cocklin S. Recent advances in HIV-1 Gag inhibitor design and development //Molecules. – 2020. – T. 25. – №. 7. – C. 1687.
- 56.Dicker I. et al. GSK3640254 is a novel HIV-1 maturation inhibitor with an optimized virology profile //Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2022. – T. 66. – №. 1. – C. e01876-21.
- 57.Ding X. R. et al. Delivery System Targeting Hemagglutinin of Influenza Virus A to Facilitate Antisense-Based Anti-H1N1 Therapy //Bioconjugate Chemistry. – 2017. – T. 28. – №. 7. – C. 1842-1849.
- 58.Dowerah D. et al. Design of LNA analogues using a combined density functional theory and molecular dynamics approach for RNA therapeutics //ACS omega. – 2023. – T. 8. – №. 25. – C. 22382-22405.
- 59.Duffy K., Arangundy-Franklin S., Holliger P. Modified nucleic acids: replication, evolution, and next-generation therapeutics //Bmc Biology. – 2020. – T. 18. – №. 1. – C. 112.
- 60.Dzinamarira T. et al. Highlights on the development, related patents, and prospects of lenacapavir: The first-in-class HIV-1 capsid inhibitor for the treatment of multi-drug-resistant HIV-1 infection //Medicina. – 2023. – T. 59. – №. 6. – C. 1041.
- 61.Engelman A. N. Multifaceted HIV integrase functionalities and therapeutic strategies for their inhibition //Journal of Biological Chemistry. – 2019. – T. 294. – №. 41. – C. 15137-15157.
- 62.Falkenhagen A., Joshi S. HIV entry and its inhibition by bifunctional antiviral proteins //Molecular Therapy Nucleic Acids. – 2018. – T. 13. – C. 347-364.
- 63.Fernandez C., van Halsema C. L. Evaluating cabotegravir/rilpivirine long-acting, injectable in the treatment of HIV infection: emerging data and therapeutic potential //HIV/AIDS-Research and Palliative Care. – 2019. – C. 179-192.
- 64.Fletcher C. V. et al. Concentration-controlled zidovudine therapy //Clinical Pharmacology & Therapeutics. – 1998. – T. 64. – №. 3. – C. 331-338

- 65.Foka F. E. T., Mufhandu H. T. Current ARTs, virologic failure, and implications for AIDS management: a systematic review //Viruses. – 2023. – T. 15. – №. 8. – C. 1732.
- 66.Fotooh Abadi L. et al. Novel nanotechnology-based approaches for targeting HIV reservoirs //Polymers. – 2022. – T. 14. – №. 15. – C. 3090.
- 67.Gagliardi M., Ashizawa A. T. The challenges and strategies of antisense oligonucleotide drug delivery //Biomedicines. – 2021. – T. 9. – №. 4. – C. 433.
- 68.Gallo R. C., Montagnier L. The discovery of HIV as the cause of AIDS //New England Journal of Medicine. – 2003. – T. 349. – №. 24. – C. 2283-2285.
- 69.Garcia J. P. et al. Fibrin-hyaluronic acid hydrogel-based delivery of antisense oligonucleotides for ADAMTS5 inhibition in co-delivered and resident joint cells in osteoarthritis //Journal of Controlled Release. – 2019. – T. 294. – C. 247-258.
- 70.Geary R. S. et al. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides //Advanced drug delivery reviews. – 2015. – T. 87. – C. 46-51.
- 71.Gheibi-Hayat S. M., Jamialahmadi K. Antisense oligonucleotide (AS-ODN) technology: Principle, mechanism and challenges //Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2021. – T. 68. – №. 5. – C. 1086-1094
- 72.Ghosh A. K., Brindisi M. Urea derivatives in modern drug discovery and medicinal chemistry //Journal of medicinal chemistry. – 2019. – T. 63. – №. 6. – C. 2751-2788.
- 73.Gopi C., Dhanaraju M. D., Dhanaraju K. Antisense oligonucleotides: recent progress in the treatment of various diseases //Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences. – 2022. – T. 11. – №. 1. – C. 19.
- 74.Graham M. J. et al. In vivo distribution and metabolism of a phosphorothioate oligonucleotide within rat liver after intravenous administration //The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. – 1998. – T. 286. – №. 1. – C. 447-458.
- 75.Gupta M., Pak A. J., Voth G. A. Critical mechanistic features of HIV-1 viral capsid assembly //Science advances. – 2023. – T. 9. – №. 1. – C. eadd7434.

- 76.Hagedorn P. H. et al. Locked nucleic acid: modality, diversity, and drug discovery //Drug discovery today. – 2018. – T. 23. – №. 1. – C. 101-114.
- 77.Hagey R. J. et al. Programmable antivirals targeting critical conserved viral RNA secondary structures from influenza A virus and SARS-CoV-2 //Nature medicine. – 2022. – T. 28. – №. 9. – C. 1944-1955.
- 78.Hammond S. M. et al. Delivery of oligonucleotide-based therapeutics: challenges and opportunities //EMBO molecular medicine. – 2021. – T. 13. – №. 4. – C. e13243.
- 79.Hawner M., Ducho C. Cellular targeting of oligonucleotides by conjugation with small molecules //Molecules. – 2020. – T. 25. – №. 24. – C. 5963.
- 80.Henrich T. J., Kuritzkes D. R. HIV-1 entry inhibitors: recent development and clinical use //Current opinion in virology. – 2013. – T. 3. – №. 1. – C. 51-57.
- 81.Heo Y. A. Golodirsen: first approval //Drugs. – 2020. – T. 80. – №. 3. – C. 329-333.
- 82.Hillebrand F. et al. Gymnotic delivery of LNA mixmers targeting viral SREs induces HIV-1 mRNA degradation //International journal of molecular sciences. – 2019. – T. 20. – №. 5. – C. 1088.
- 83.Hitchcock A. M. et al. Lenacapavir: A novel injectable HIV-1 capsid inhibitor //International Journal of Antimicrobial Agents. – 2024. – T. 63. – №. 1. – C. 107009
- 84.Hodge D. et al. Pharmacokinetics and drug–drug interactions of long-acting intramuscular cabotegravir and rilpivirine //Clinical Pharmacokinetics. – 2021. – T. 60. – №. 7. – C. 835-853.
- 85.Hu Z. et al. Effect of the L74I polymorphism on fitness of cabotegravir-resistant variants of human immunodeficiency virus 1 subtype A6 //The Journal of Infectious Diseases. – 2023. – T. 228. – №. 10. – C. 1352-1356.
- 86.Huang J. Review of" Efficient Inhibition of SARS-CoV-2 Using Chimeric Antisense Oligonucleotides through RNase L Activation". – 2022.
- 87.Iacob S. A., Iacob D. G. Ibalizumab targeting CD4 receptors, an emerging molecule in HIV therapy //Frontiers in microbiology. – 2017. – T. 8. – C. 2323.

- 88.Ibba M. L. et al. Advances in mRNA non-viral delivery approaches //Advanced drug delivery reviews. – 2021. – T. 177. – C. 113930.
- 89.Jakobsen M. R. et al. Efficient inhibition of HIV-1 expression by LNA modified antisense oligonucleotides and DNAzymes targeted to functionally selected binding sites //Retrovirology. – 2007. – T. 4. – C. 1-13.
- 90.Javanbakht H. et al. Liver-targeted anti-HBV single-stranded oligonucleotides with locked nucleic acid potently reduce HBV gene expression in vivo //Molecular therapy Nucleic acids. – 2018. – T. 11. – C. 441-454.
- 91.Juliano, R.L. The Delivery of Therapeutic Oligonucleotides. Nucleic Acids Res 2016, 44, 6518–6548, doi:10.1093/nar/gkw236
- 92.Karn J., Stoltzfus C. M. Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression //Cold Spring Harbor perspectives in medicine. – 2012. – T. 2. – №. 2. – C. a006916.
- 93.Khamooshi F. et al. Anti-HIV drugs study: study of NNRTIs function and overview synthesis of specific and rare aryloxy tetrazoles derivatives as NNRTIs and anti-HIV drug //Medicon Pharmaceutical Sciences. – 2022. – T. 2. – №. 3. – C. 04-10
- 94.Khorana H. G. et al. A new approach to the synthesis of polynucleotides //Chem. and Ind. London. – 1956. – T. 1523.
- 95.Kim J. et al. Patient-customized oligonucleotide therapy for a rare genetic disease //New England Journal of Medicine. – 2019. – T. 381. – №. 17. – C. 1644-1652.
- 96.Kim Y. Drug discovery perspectives of antisense oligonucleotides //Biomolecules & therapeutics. – 2023. – T. 31. – №. 3. – C. 241.
- 97.Kleinpeter A. B., Freed E. O. HIV-1 maturation: Lessons learned from inhibitors //Viruses. – 2020. – T. 12. – №. 9. – C. 940.
- 98.Kozal M. et al. Fostemsavir in adults with multidrug-resistant HIV-1 infection //New England Journal of Medicine. – 2020. – T. 382. – №. 13. – C. 1232-1243.
- 99.Kupryushkin M. S., Pyshnyi D. V., Stetsenko D. A. Phosphoryl guanidines: a new type of nucleic acid analogues //Acta Naturae (англоязычная версия). – 2014. – T. 6. – №. 4 (23). – C. 116-118.
100. Lamb Y. N. Inclisiran: first approval //Drugs. – 2021. – T. 81. – C. 389-395.

101. Le Grice S. F. J. Targeting the HIV RNA genome: high-hanging fruit only needs a longer ladder //The Future of HIV-1 Therapeutics: Resistance Is Futile?. – 2015. – C. 147-169.
102. Lehman A. et al. Advanced HIV disease: A review of diagnostic and prophylactic strategies //HIV medicine. – 2023. – T. 24. – №. 8. – C. 859-876.
103. Li G., De Clercq E. HIV genome-wide protein associations: a review of 30 years of research //Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2016. – T. 80. – №. 3. – C. 679-731.
104. Link J. O. et al. Clinical targeting of HIV capsid protein with a long-acting small molecule //Nature. – 2020. – T. 584. – №. 7822. – C. 614-618.
105. Liu Y. et al. Broadly neutralizing antibodies for HIV-1: efficacies, challenges and opportunities //Emerging microbes & infections. – 2020. – T. 9. – №. 1. – C. 194-206.
106. Liu C. et al. Cyclophilin A stabilizes the HIV-1 capsid through a novel non-canonical binding site //Nature communications. – 2016. – T. 7. – №. 1. – C. 10714.
107. Loaiza J. D. et al. Integrase inhibitors: current protagonists in antiretroviral therapy //Immunotherapy. – 2023. – T. 15. – №. 17. – C. 1477-1495.
108. Lomzov A. A. et al. Diastereomers of a mono-substituted phosphoryl guanidine trideoxyribonucleotide: isolation and properties //Biochemical and biophysical research communications. – 2019. – T. 513. – №. 4. – C. 807-811.
109. Lu C. H. et al. Pharmacokinetic drug interactions of integrase strand transfer inhibitors //Current Research in Pharmacology and Drug Discovery. – 2021. – T. 2. – C. 100044.
110. Lv Z., Chu Y., Wang Y. HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity //HIV/AIDS-Research and palliative care. – 2015. – C. 95-104.
111. Maia R. C., Tesch R., Fraga C. A. M. Acylhydrazone derivatives: a patent review //Expert opinion on therapeutic patents. – 2014. – T. 24. – №. 11. – C. 1161-1170.

112. Majerová T., Konvalinka J. Viral proteases as therapeutic targets //Molecular aspects of medicine. – 2022. – T. 88. – C. 101159.
113. Markov O. V. et al. Transport Oligonucleotides—A Novel System for Intracellular Delivery of Antisense Therapeutics //Molecules. – 2020. – T. 25. – №. 16. – C. 3663.
114. Matteucci M. D., Caruthers M. H. Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support //Journal of the American Chemical Society. – 1981. – T. 103. – №. 11. – C. 3185-3191.
115. McFadden W. M. et al. Rotten to the core: antivirals targeting the HIV-1 capsid core //Retrovirology. – 2021. – T. 18. – №. 1. – C. 41.
116. McLeod G. X., Hammer S. M. Zidovudine: five years later //Annals of Internal Medicine. – 1992. – T. 117. – №. 6. – C. 487-501
117. Menéndez-Arias L., Delgado R. Update and latest advances in antiretroviral therapy //Trends in pharmacological sciences. – 2022. – T. 43. – №. 1. – C. 16-29.
118. Michelson A. M., Todd A. R. Nucleotides part XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3': 5'-internucleotidic linkage //Journal of the Chemical Society (Resumed). – 1955. – C. 2632-2638.
119. Migliorati J. M., Jin J., Zhong X. siRNA drug Leqvio (inclisiran) to lower cholesterol //Trends in pharmacological sciences. – 2022. – T. 43. – №. 5. – C. 455-456.
120. Muccini C. et al. Efficacy and safety profile of fostemsavir for the treatment of people with human immunodeficiency virus-1 (HIV-1): current evidence and place in therapy //Drug Design, Development and Therapy. – 2022. – C. 297-304.
121. Müller T. G. et al. HIV-1 uncoating by release of viral cDNA from capsid-like structures in the nucleus of infected cells //Elife. – 2021. – T. 10. – C. e64776.
122. Murphy R. E., Saad J. S. The interplay between HIV-1 Gag binding to the plasma membrane and Env incorporation //Viruses. – 2020. – T. 12. – №. 5. – C. 548.

123. Mustafakulov M. A. et al. Aptamers and their use in biology and medicine aptamers and their applications in nanotechnologies, virology and biology //Academic research in educational sciences. – 2022. – T. 3. – №. 4. – C. 509-515
124. Nair M. et al. Global and regional genetic diversity of HIV-1 in 2010–21: systematic review and analysis of prevalence //The Lancet Microbe. – 2024.
125. Namasivayam V. et al. The journey of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) from lab to clinic //Journal of medicinal chemistry. – 2018. – T. 62. – №. 10. – C. 4851-4883.
126. Negi G. et al. Membrane attachment and fusion of HIV-1, influenza A, and SARS-CoV-2: resolving the mechanisms with biophysical methods //Biophysical reviews. – 2022. – T. 14. – №. 5. – C. 1109-1140.
127. Ni S. et al. Recent progress in aptamer discoveries and modifications for therapeutic applications //ACS Applied Materials & Interfaces. – 2020. – T. 13. – №. 8. – C. 9500-9519.
128. Niu Z. X. et al. Application and synthesis of thiazole ring in clinically approved drugs //European Journal of Medicinal Chemistry. – 2023. – T. 250. – C. 115172.
129. Ogilvie K. K. et al. Total chemical synthesis of a 77-nucleotide-long RNA sequence having methionine-acceptance activity //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1988. – T. 85. – №. 16. – C. 5764-5768.
130. Orkin C et al. Expanded multivariable models to assist patient selection for long-acting cabotegravir+rilpivirine treatment: clinical utility of a combination of patient, drug concentration, and viral factors associated with virological failure over 152 weeks. International Congress on Drug Therapy in HIV Infection (HIV Glasgow), abstract O44, 2022
131. Østergaard M. E. et al. Understanding the effect of controlling phosphorothioate chirality in the DNA gap on the potency and safety of gapmer antisense oligonucleotides //Nucleic acids research. – 2020. – T. 48. – №. 4. – C. 1691-1700.

132. Parham J. S., Goldberg A. C. Mipomersen and its use in familial hypercholesterolemia //Expert opinion on pharmacotherapy. – 2019. – T. 20. – №. 2. – C. 127-131.
133. Perilla J. R. et al. Integrative structural biology of HIV-1 capsid protein assemblies: combining experiment and computation //Current opinion in virology. – 2021. – T. 48. – C. 57-64.
134. Perrone R. et al. The G-quadruplex-forming aptamer AS1411 potently inhibits HIV-1 attachment to the host cell //International journal of antimicrobial agents. – 2016. – T. 47. – №. 4. – C. 311-316
135. Pham H. T. et al. Pharmaceutical, clinical, and resistance information on doravirine, a novel non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor for the treatment of HIV-1 infection //Drugs in context. – 2020. – T. 9. – C. 2019-11-4.
136. Reed L. J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. – 1938.
137. Riera-Tur I. et al. Characterization of the TLR9-Activating Potential of LNA-Modified Antisense Oligonucleotides //nucleic acid therapeutics. – 2024. – T. 34. – №. 5. – C. 257-271.
138. Roberts T. C., Langer R., Wood M. J. A. Advances in oligonucleotide drug delivery //Nature reviews Drug discovery. – 2020. – T. 19. – №. 10. – C. 673-694.
139. Saeb S. et al. Targeting and eradicating latent CNS reservoirs of HIV-1: Original strategies and new models //Biochemical Pharmacology. – 2023. – T. 214. – C. 115679.
140. Saez-Cirion A. et al. Sustained HIV remission after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with wild-type CCR5 donor cells //Nature medicine. – 2024. – T. 30. – №. 12. – C. 3544-3554.
141. Salakhutdinov N. F., Volcho K. P., Yarovaya O. I. Monoterpenes as a renewable source of biologically active compounds //Pure and Applied Chemistry. – 2017. – T. 89. – №. 8. – C. 1105-1117

142. Sarafianos S. G. et al. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition //Journal of molecular biology. – 2009. – T. 385. – №. 3. – C. 693-713.
143. Schaller H. et al. Studies on polynucleotides. XXIV. 1 The stepwise synthesis of specific deoxyribopolynucleotides (4). 2 Protected derivatives of deoxyribonucleosides and new syntheses of deoxyribonucleoside-3 "phosphates 3 //Journal of the American Chemical Society. – 1963. – T. 85. – №. 23. – C. 3821-3827.
144. Schneider A. et al. Problems and prospects of gene therapy against HIV //Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2014. – T. 47. – №. 12. – C. 627-635.
145. Scott L. J. Givosiran: first approval //Drugs. – 2020. – T. 80. – №. 3. – C. 335-339.
146. Segal-Maurer S. et al. Capsid inhibition with lenacapavir in multidrug-resistant HIV-1 infection //New England Journal of Medicine. – 2022. – T. 386. – №. 19. – C. 1793-1803
147. Seval N., Frank C., Kozal M. Fostemsavir for the treatment of HIV //Expert Review of Anti-infective Therapy. – 2021. – T. 19. – №. 8. – C. 961-966.
148. Shen W. et al. Chemical modification of PS-ASO therapeutics reduces cellular protein-binding and improves the therapeutic index //Nature biotechnology. – 2019. – T. 37. – №. 6. – C. 640-650
149. Shim I., Rogowski L., Venketaraman V. Progress and Recent Developments in HIV Vaccine Research //Vaccines. – 2025. – T. 13. – №. 7. – C. 690.
150. Shin Y. H. et al. Identification of novel compounds against Tat-mediated human immunodeficiency virus-1 transcription by high-throughput functional screening assay //Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2020. – T. 523. – №. 2. – C. 368-374.
151. Shin Y. H., Park C. M., Yoon C. H. An overview of human immunodeficiency virus-1 antiretroviral drugs: general principles and current status //Infection & chemotherapy. – 2021. – T. 53. – №. 1. – C. 29.

152. Sibiya T., Ghazi T., Chuturgoon A. The potential of *Spirulina platensis* to ameliorate the adverse effects of highly active antiretroviral therapy (HAART) //Nutrients. – 2022. – T. 14. – №. 15. – C. 3076
153. Siliciano J. D., Siliciano R. F. In vivo dynamics of the latent reservoir for HIV-1: new insights and implications for cure //Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. – 2022. – T. 17. – №. 1. – C. 271-294.
154. Stec W. J., Zon G., Egan W. Automated solid-phase synthesis, separation, and stereochemistry of phosphorothioate analogs of oligodeoxyribonucleotides //Journal of the American Chemical Society. – 1984. – T. 106. – №. 20. – C. 6077-6079.
155. Stephens M. The emerging potential of Aptamers as therapeutic agents in infection and inflammation //Pharmacology & Therapeutics. – 2022. – T. 238. – C. 108173
156. Stephenson M. L., Zamecnik P. C. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1978. – T. 75. – №. 1. – C. 285-288.
157. Stincarelli M. A. et al. Antiviral activity of oligonucleotides targeting the SARS-CoV-2 genomic RNA stem-loop sequences within the 3'-End of the ORF1b //Pathogens. – 2022. – T. 11. – №. 11. – C. 1286.
158. Stoddart C. A. et al. Comparative Pharmacokinetics of a Dual Inhibitor of HIV-1, NBD-14189, in Rats and Dogs with a Proof-of-Concept Evaluation of Antiviral Potency in SCID-hu Mouse Model //Viruses. – 2022. – T. 14. – №. 10. – C. 2268
159. Subramanian R. et al. Lenacapavir: a novel, potent, and selective first-in-class inhibitor of HIV-1 capsid function exhibits optimal pharmacokinetic properties for a long-acting injectable antiretroviral agent //Molecular Pharmaceutics. – 2023. – T. 20. – №. 12. – C. 6213-6225.
160. Swindells S. et al. Long-acting cabotegravir and rilpivirine for maintenance of HIV-1 suppression //New England Journal of Medicine. – 2020. – T. 382. – №. 12. – C. 1112-1123.

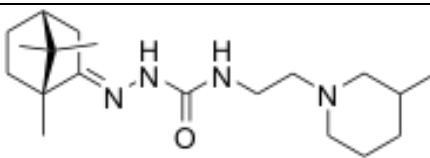
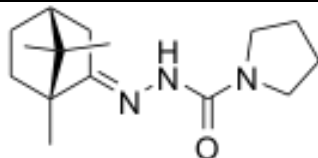
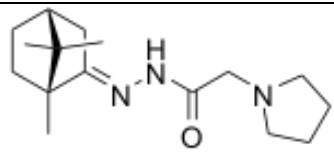
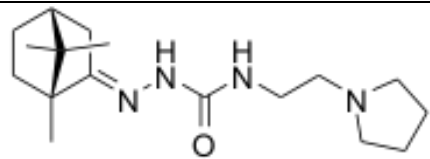
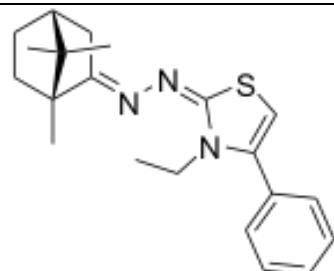
161. Ta T. M. et al. Insights into persistent HIV-1 infection and functional cure: novel capabilities and strategies //Frontiers in microbiology. – 2022. – Т. 13. – С. 862270.
162. Tabler C. O. et al. The HIV-1 viral protease is activated during assembly and budding prior to particle release //Journal of Virology. – 2022. – Т. 96. – №. 9. – С. e02198-21.
163. Tailor M. W. et al. Lenacapavir: a novel long-acting capsid inhibitor for HIV //Annals of Pharmacotherapy. – 2024. – Т. 58. – №. 2. – С. 185-195.
164. Taramasso L. et al. Pillars of long-term antiretroviral therapy success //Pharmacological Research. – 2023. – Т. 196. – С. 106898
165. Tarn W. Y. et al. Antisense oligonucleotide-based therapy of viral infections //Pharmaceutics. – 2021. – Т. 13. – №. 12. – С. 2015.
166. Tombácz I. et al. Highly efficient CD4+ T cell targeting and genetic recombination using engineered CD4+ cell-homing mRNA-LNPs //Molecular Therapy. – 2021. – Т. 29. – №. 11. – С. 3293-3304.
167. Tompa D. R. et al. Trends and strategies to combat viral infections: A review on FDA approved antiviral drugs //International journal of biological macromolecules. – 2021. – Т. 172. – С. 524-541.
168. UNAIDS (Глобальная статистика ЮНЭЙДС по ВИЧ и СПИДу — информационный бюллетень. 2025. Доступно онлайн: <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet> (дата обращения: 8 ноября 2025 г.)
169. Vaillant A. Oligonucleotide-based therapies for chronic HBV infection: a primer on biochemistry, mechanisms and antiviral effects //Viruses. – 2022. – Т. 14. – №. 9. – С. 2052.
170. Van Der Ryst E. Maraviroc—a CCR5 antagonist for the treatment of HIV-1 infection //Frontiers in immunology. – 2015. – Т. 6. – С. 277.
171. Vanangamudi M., Kurup S., Namasivayam V. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs): A brief overview of clinically approved drugs

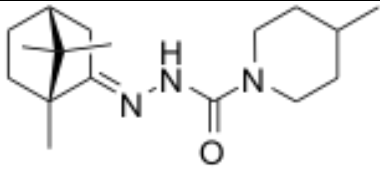
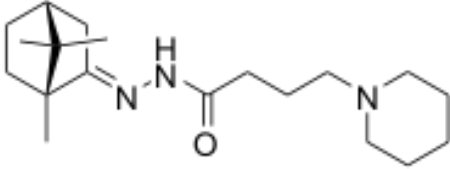
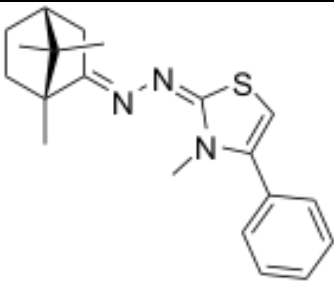
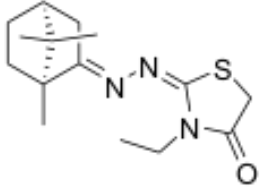
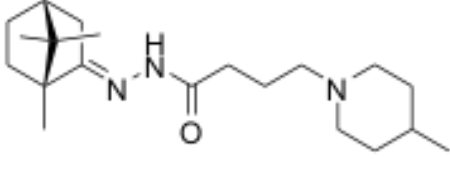
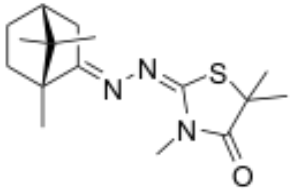
- and combination regimens //Current opinion in pharmacology. – 2020. – T. 54. – C. 179-187.
172. Vella S. et al. The history of antiretroviral therapy and of its implementation in resource-limited areas of the world //Aids. – 2012. – T. 26. – №. 10. – C. 1231-1241.
 173. Virgilio A. et al. Novel monomolecular derivatives of the anti-HIV-1 G-quadruplex-forming Hotoda's aptamer containing inversion of polarity sites //European Journal of Medicinal Chemistry. – 2020. – T. 208. – C. 112786
 174. Visual Taxonomy Browser (ICTV). URL: <https://ictv.global/taxonomy/visual-browser> (дата обращения 12.07.2025)
 175. Wang Y., De Clercq E., Li G. Current and emerging non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) for HIV-1 treatment //Expert opinion on drug metabolism & toxicology. – 2019. – T. 15. – №. 10. – C. 813-829.
 176. Wang Z. et al. Contemporary medicinal chemistry strategies for the discovery and development of novel HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors //Journal of Medicinal Chemistry. – 2022. – T. 65. – №. 5. – C. 3729-3757.
 177. Wassner C., Bradley N., Lee Y. A review and clinical understanding of tenofovir: tenofovir disoproxil fumarate versus tenofovir alafenamide //Journal of the International Association of Providers of AIDS Care (JIAPAC). – 2020. – T. 19. – C. 2325958220919231.
 178. Weber I. T., Wang Y. F., Harrison R. W. HIV protease: Historical perspective and current research //Viruses. – 2021. – T. 13. – №. 5. – C. 839.
 179. Willis J. R. et al. Vaccination with mRNA-encoded nanoparticles drives early maturation of HIV bnAb precursors in humans //Science. – 2025. – T. 389. – №. 6759. – C. eadr8382.
 180. Woollard S. M., Kanmogne G. D. Maraviroc: a review of its use in HIV infection and beyond //Drug design, development and therapy. – 2015. – C. 5447-5468.

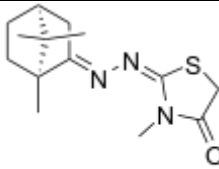
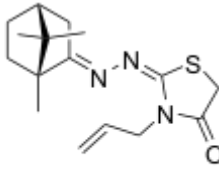
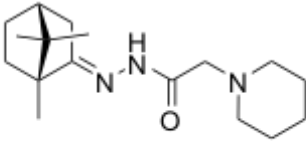
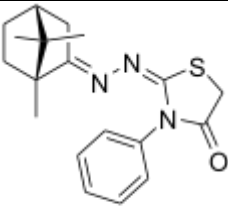
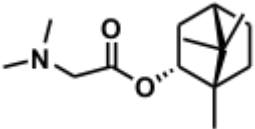
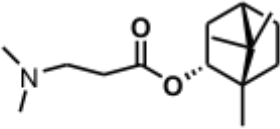
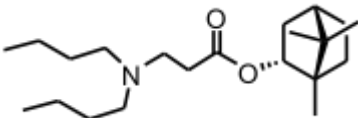
181. Xiao T., Cai Y., Chen B. HIV-1 entry and membrane fusion inhibitors //Viruses. – 2021. – T. 13. – №. 5. – C. 735.
182. Xun J. et al. Editing out HIV: application of gene editing technology to achieve functional cure //Retrovirology. – 2021. – T. 18. – №. 1. – C. 39
183. Yamamoto T. et al. Highly potent GalNAc-conjugated tiny LNA anti-miRNA-122 antisense oligonucleotides //Pharmaceutics. – 2021. – T. 13. – №. 6. – C. 817.
184. Yang H., Nkeze J., Zhao R. Y. Effects of HIV-1 protease on cellular functions and their potential applications in antiretroviral therapy //Cell & bioscience. – 2012. – T. 2. – №. 1. – C. 32.
185. Yoshida Y. et al. Structure, Synthesis and Inhibition Mechanism of Nucleoside Analogues as HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs) //ChemMedChem. – 2021. – T. 16. – №. 5. – C. 743-766.
186. Yu F., Jiang S. Small-Molecule HIV Entry Inhibitors Targeting gp120 and gp41 //Virus Entry Inhibitors: Stopping the Enemy at the Gate. – 2022. – C. 27-43
187. Zhang Z., Hou W., Chen S. Updates on CRISPR-based gene editing in HIV-1/AIDS therapy //Virologica Sinica. – 2022. – T. 37. – №. 1. – C. 1-10.

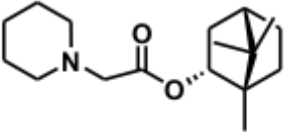
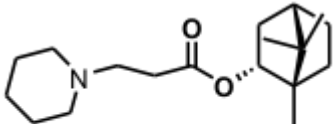
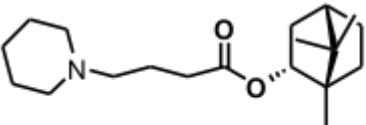
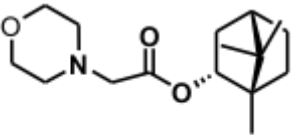
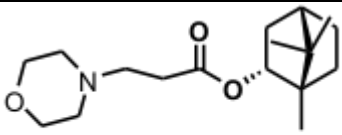
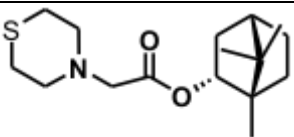
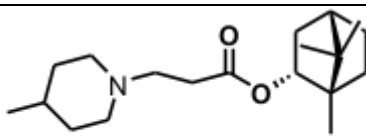
Приложение 1

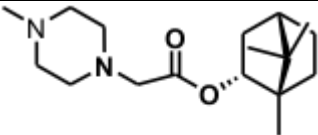
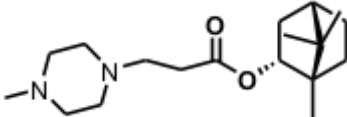
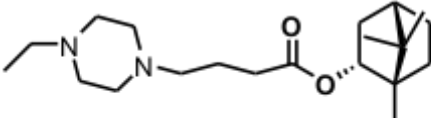
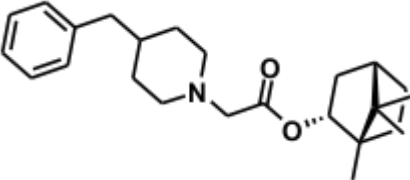
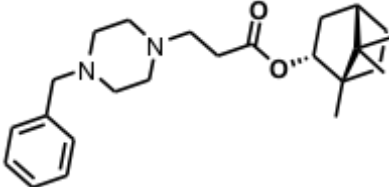
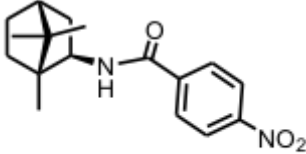
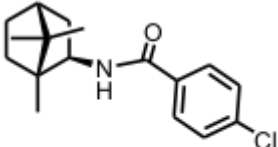
Список соединений, для которых провели скрининговое исследование на токсичность и антиретровирусную активность в отношении штамма ВИЧ-1 суб-субтипа А6

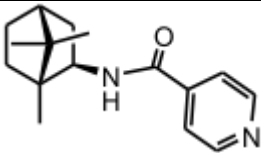
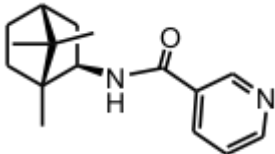
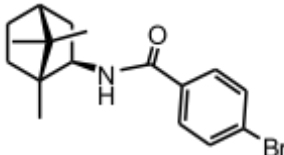
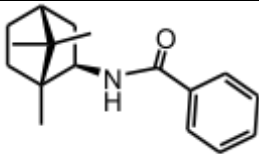
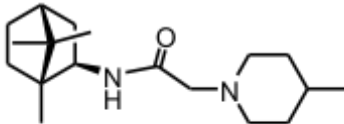
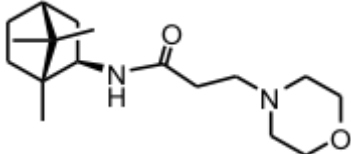
№ п/ п	Шифр	Структура	TC ₅₀ , мкг/мл	IC ₅₀ , мкг/мл
1.	OV-97	 Chemical Formula: C₁₉H₃₄N₄O Molecular Weight: 334,50	397,3	Не выявле на
2.	OV-107	 Chemical Formula: C₁₅H₂₅N₃O Molecular Weight: 263,38	227	Не выявле на
3.	OV-74	 Chemical Formula: C₁₆H₂₇N₃O Molecular Weight: 277,41	107,5	Не выявле на
4.	OV-93	 Chemical Formula: C₁₇H₃₀N₄O Molecular Weight: 306,45	329,1	Не выявле на
5.	OV-39	 Chemical Formula: C₂₁H₂₇N₃S Molecular Weight: 353,52	81,3	Не выявле на

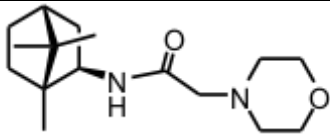
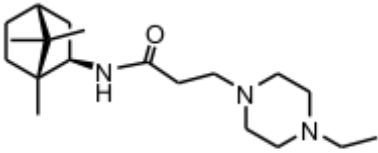
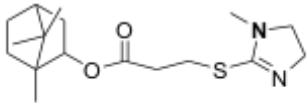
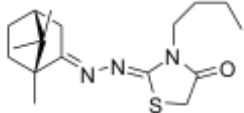
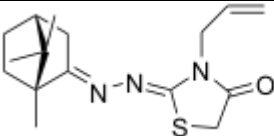
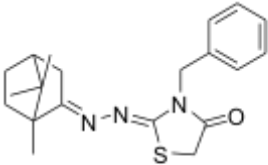
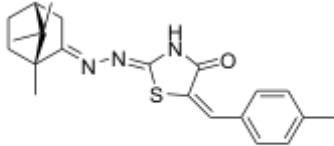
6.	OV-111	 Chemical Formula: $C_{17}H_{29}N_3O$ Molecular Weight: 291,43	67,2	Не выявле на
7.	OV-166	 Chemical Formula: $C_{19}H_{33}N_3O$ Molecular Weight: 319,48	14,8	Не выявле на
8.	OV-32	 Chemical Formula: $C_{20}H_{25}N_3S$ Molecular Weight: 339,50	34,6	Не выявле на
9.	OV-27	 Chemical Formula: $C_{15}H_{23}N_3OS$ Molecular Weight: 293,43	11,2	Не выявле на
10.	OV-170	 Chemical Formula: $C_{20}H_{35}N_3O$ Molecular Weight: 333,51	2,6	Не выявле на
11.	OV-52	 Chemical Formula: $C_{16}H_{25}N_3OS$ Molecular Weight: 307,45	17,4	Не выявле на

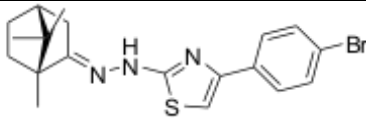
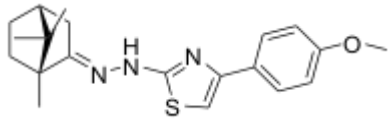
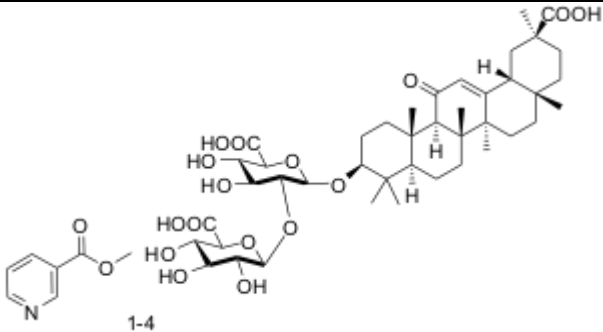
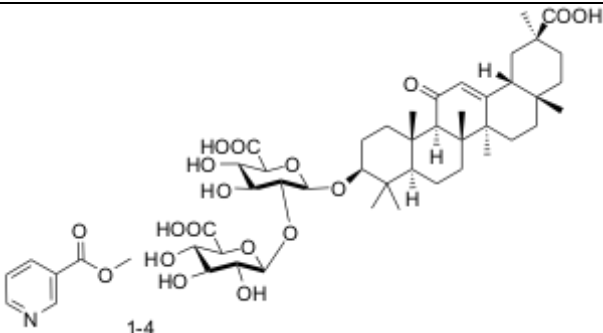
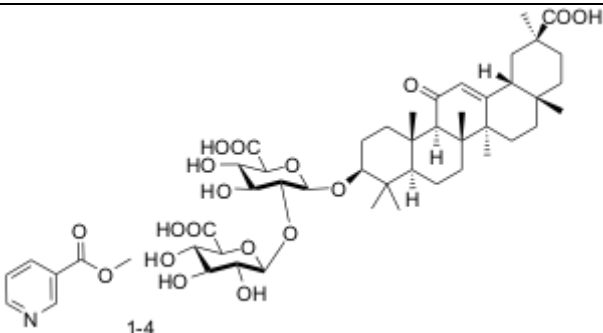
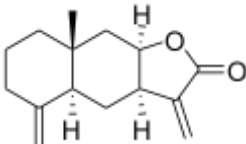
12.	OV-29	 Chemical Formula: $C_{14}H_{21}N_3OS$ Molecular Weight: 279,40	6,9	Не выявле на
13.	OV-18	 Chemical Formula: $C_{16}H_{23}N_3OS$ Molecular Weight: 305,44	1,1	Не выявле на
14.	OV-80	 Chemical Formula: $C_{17}H_{29}N_3O$ Molecular Weight: 291,43	74,5	Не выявле на
15.	OV-17	 Chemical Formula: $C_{19}H_{23}N_3OS$ Molecular Weight: 341,47	187,3	Не выявле на
16.	AS-646	 Chemical Formula: $C_{14}H_{25}NO_2$ Molecular Weight: 239,35	98,6	Не выявле на
17.	AS-445	 Chemical Formula: $C_{15}H_{27}NO_2$ Molecular Weight: 253,38	125,8	Не выявле на
18.	AS-592	 Chemical Formula: $C_{21}H_{39}NO_2$ Molecular Weight: 337,54	23,8	Не выявле на

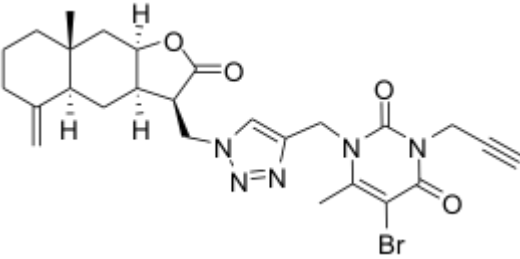
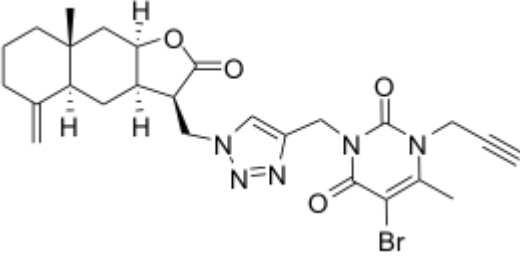
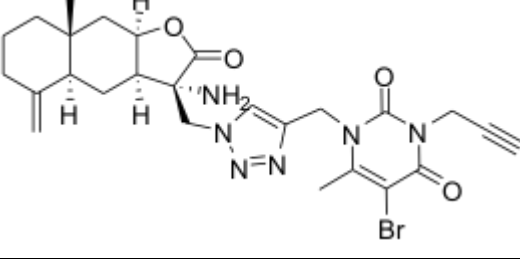
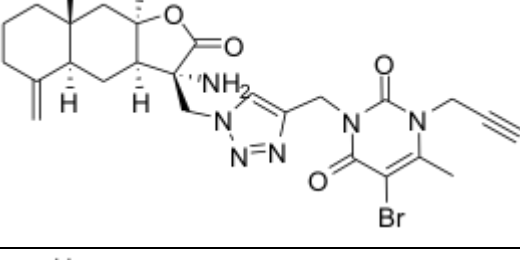
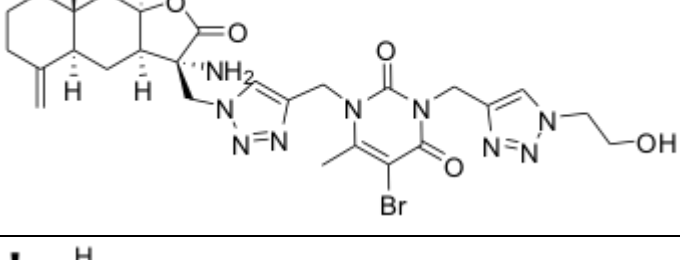
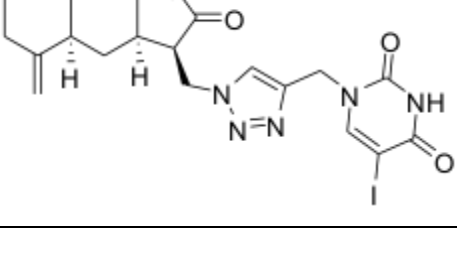
19.	AS-598-4-5	 Chemical Formula: $C_{17}H_{29}NO_2$ Molecular Weight: 279,42	84,4	Не выявле на
20.	AS-358	 Chemical Formula: $C_{18}H_{31}NO_2$ Molecular Weight: 293,44	96,6	Не выявле на
21.	AS-365-3-4	 Chemical Formula: $C_{19}H_{33}NO_2$ Molecular Weight: 307,47	21,1	Не выявле на
22.	SM-16	 Chemical Formula: $C_{16}H_{27}NO_3$ Molecular Weight: 281,39	114,9	Не выявле на
23.	AS-588	 Chemical Formula: $C_{17}H_{29}NO_3$ Molecular Weight: 295,42	82,9	Не выявле на
24.	AS-582	 Chemical Formula: $C_{16}H_{27}NO_2S$ Molecular Weight: 297,46	83,6	Не выявле на
25.	AS-359	 Chemical Formula: $C_{19}H_{33}NO_2$ Molecular Weight: 307,47	118,5	Не выявле на

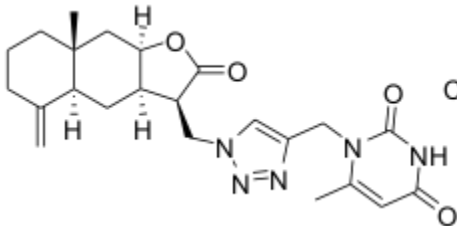
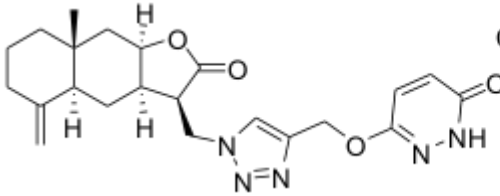
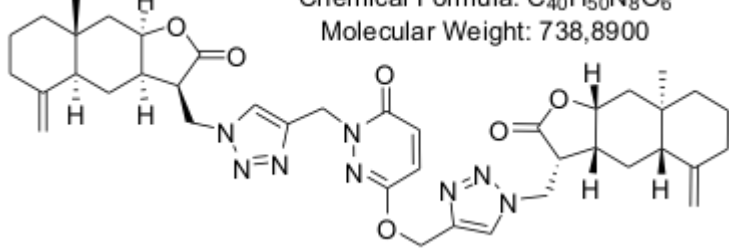
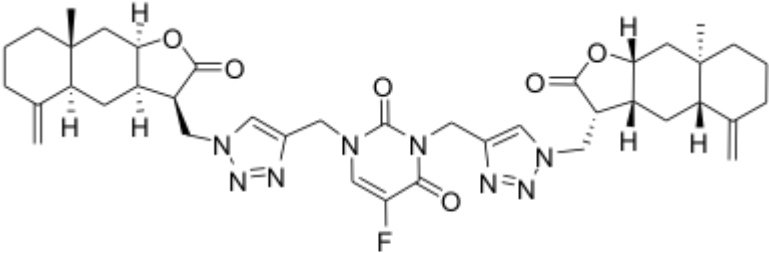
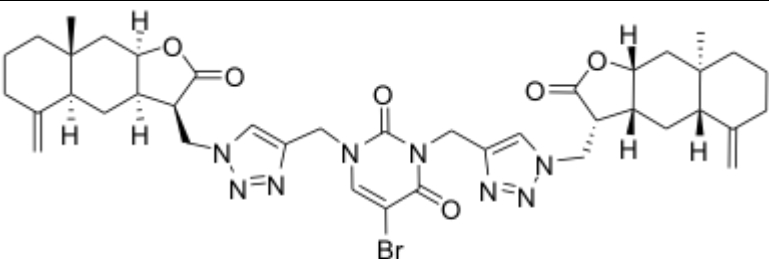
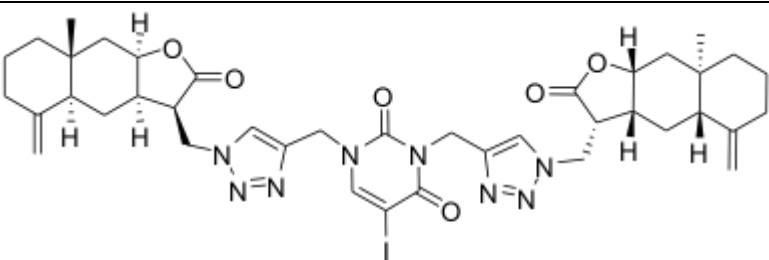
26.	AS-575	 Chemical Formula: $C_{17}H_{30}N_2O_2$ Molecular Weight: 294,43	>400	Не выявле на
27.	AS-234	 Chemical Formula: $C_{18}H_{32}N_2O_2$ Molecular Weight: 308,46	34,4	Не выявле на
28.	AS-371-2-4	 Chemical Formula: $C_{20}H_{36}N_2O_2$ Molecular Weight: 336,51	79,7	Не выявле на
29.	AS-576	 Chemical Formula: $C_{24}H_{35}NO_2$ Molecular Weight: 369,54	17,9	Не выявле на
30.	AS-411	 Chemical Formula: $C_{24}H_{36}N_2O_2$ Molecular Weight: 384,55	76,7	Не выявле на
31.	AS-569	 Chemical Formula: $C_{17}H_{22}N_2O_3$ Molecular Weight: 302,37	113,4	Не выявле на
32.	Ya-669	 Chemical Formula: $C_{17}H_{22}ClNO$ Molecular Weight: 291,82	112,7	Не выявле на

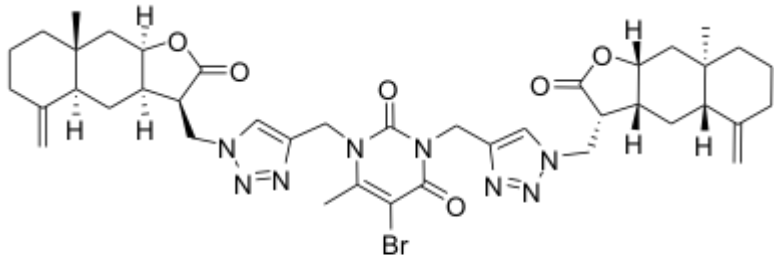
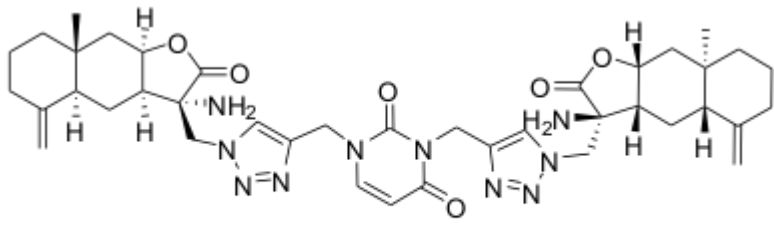
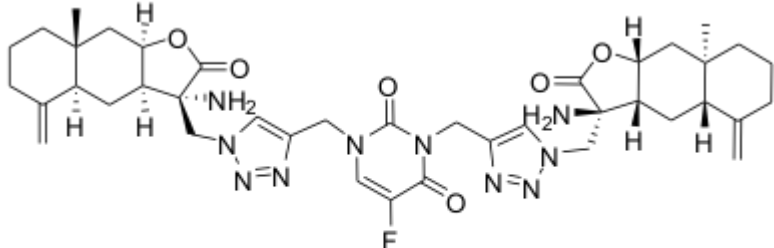
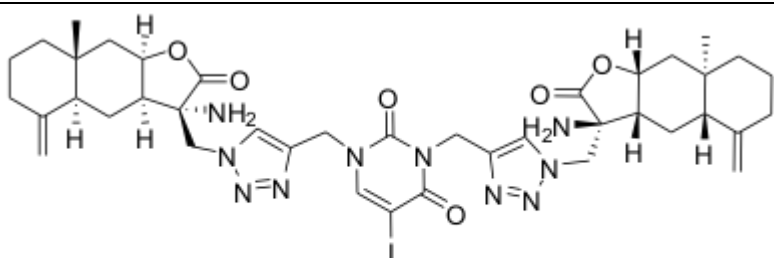
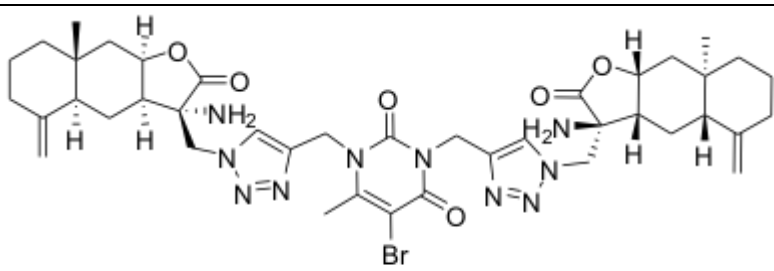
33.	AS-524	 Chemical Formula: $C_{16}H_{22}N_2O$ Molecular Weight: 258,36	82,7	Не выявле на
34.	AS-526	 Chemical Formula: $C_{16}H_{22}N_2O$ Molecular Weight: 258,36	97,4	Не выявле на
35.	AS-521	 Chemical Formula: $C_{17}H_{22}BrNO$ Molecular Weight: 336,27	106,7	Не выявле на
36.	YA-681	 Chemical Formula: $C_{17}H_{23}NO$ Molecular Weight: 257,37	164,7	Не выявле на
37.	Ya-563- 20-22	 Chemical Formula: $C_{18}H_{32}N_2O$ Molecular Weight: 292,46	74,7	Не выявле на
38.	AS-368- 15-17	 Chemical Formula: $C_{17}H_{30}N_2O_2$ Molecular Weight: 294,43	381,6	Не выявле на

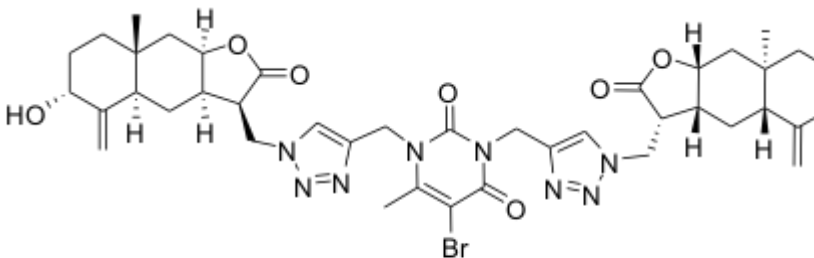
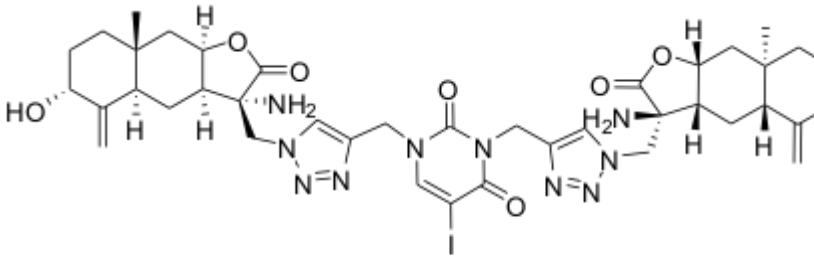
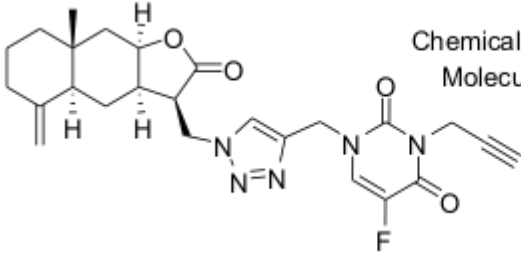
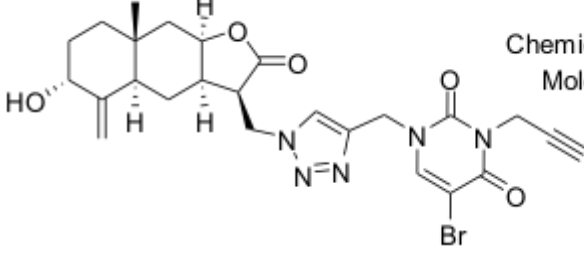
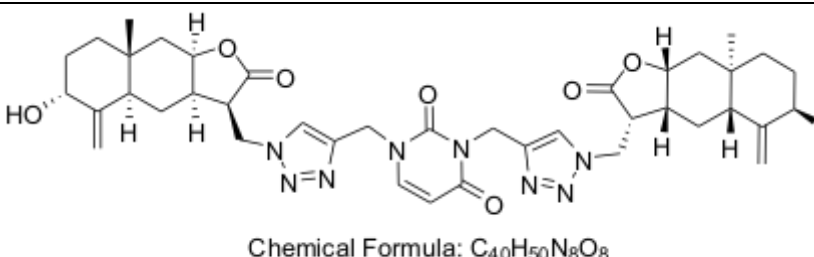
39.	Ya-561- 31-34	 Chemical Formula: $C_{16}H_{28}N_2O_2$ Molecular Weight: 280,41	73,8	Не выявле на
40.	AS-374-4- 6	 Chemical Formula: $C_{19}H_{35}N_3O$ Molecular Weight: 321,50	344,9	Не выявле на
41.	AS-287	 Chemical Formula: $C_{17}H_{28}N_2O_2S$ Molecular Weight: 324,48	29,2	Не выявле на
42.	AS-349	 Chemical Formula: $C_{17}H_{27}N_3OS$ Molecular Weight: 321,48	93,8	Не выявле на
43.	Sm-42	 Chemical Formula: $C_{16}H_{23}N_3OS$ Molecular Weight: 305,44	33,8	Не выявле на
44.	AS-342	 Chemical Formula: $C_{20}H_{25}N_3OS$ Molecular Weight: 355,50	611	Не выявле на
45.	AS-351	 Chemical Formula: $C_{21}H_{25}N_3OS$ Molecular Weight: 367,51	28,9	Не выявле на

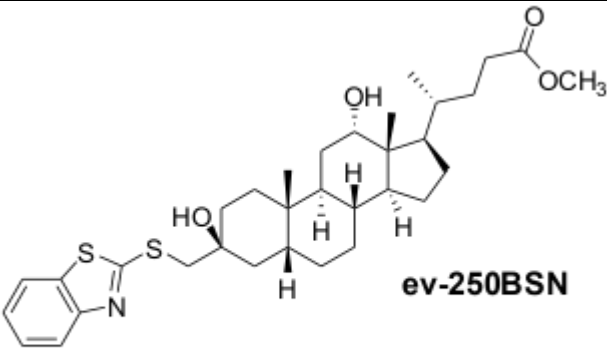
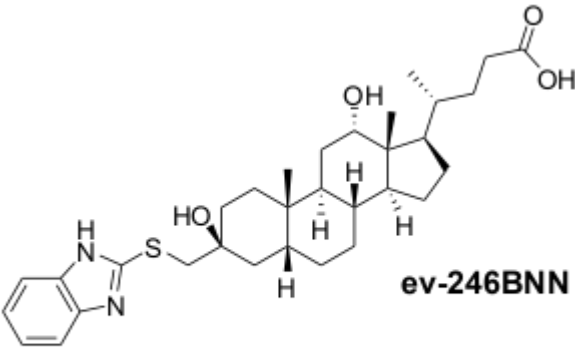
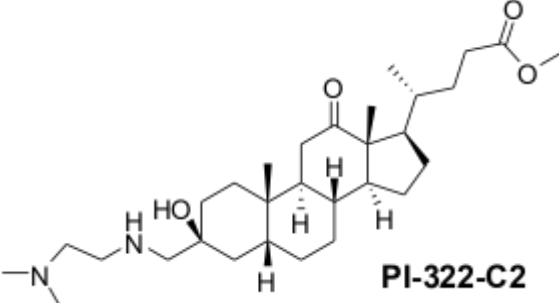
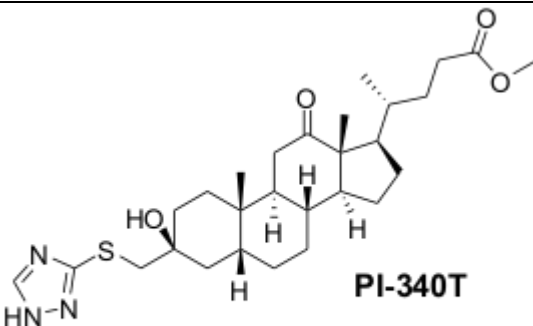
46.	AS-334	 Chemical Formula: $C_{19}H_{22}BrN_3S$ Molecular Weight: 404,37	40,2	Не выявле на
47.	AS-341	 Chemical Formula: $C_{20}H_{25}N_3OS$ Molecular Weight: 355,50	16,3	Не выявле на
48.	Ks-518-3		>400	Не выявле на
49.	Ks-519-3		73,5	Не выявле на
50.	Ks-526-3		110,1	Не выявле на
51.	pat_ial		414,7 5	Не выявле на

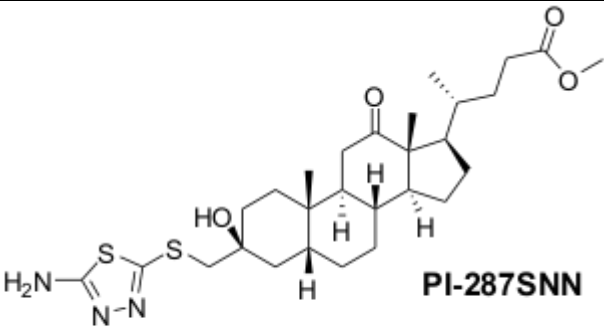
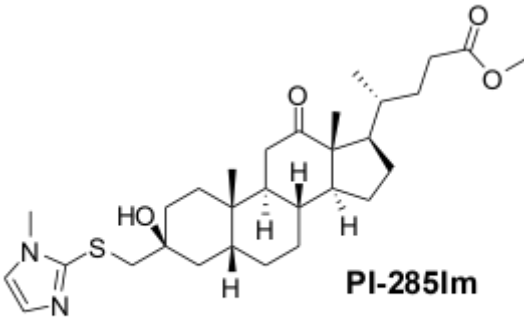
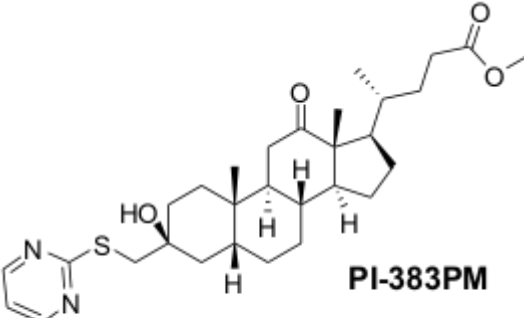
52.	pat_681_1 0p		356,0 2	Не выявле на
53.	pat_681_1 5p		313,4 5	Не выявле на
54.	pat_687_1 9p		298,7	Не выявле на
55.	pat_687_2 0p		401,0 8	Не выявле на
56.	pat_690_3 3p		327,1 3	Не выявле на
57.	dv_210p	 Chemical Formula: C ₂₂ H ₂₆ IN Molecular Weight: 551,38	112,7 6	Не выявле на

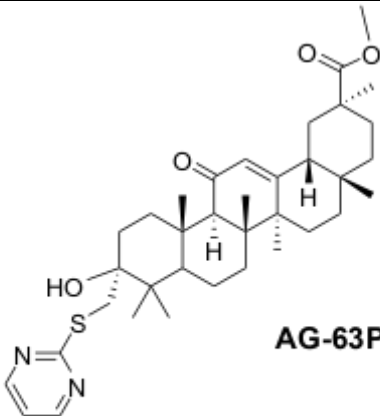
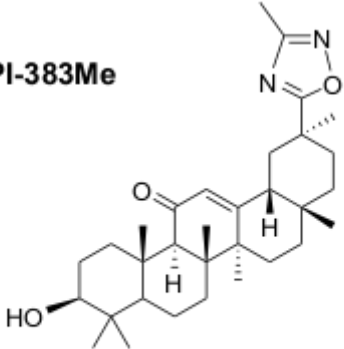
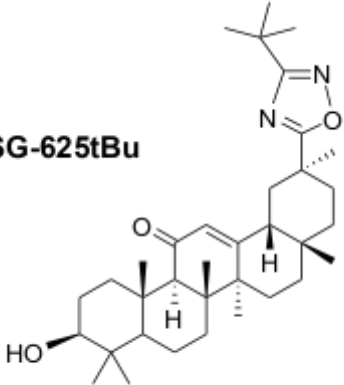
58.	dv_239p	 Chemical Formula: $C_{23}H_{29}N_5O_4$ Molecular Weight: 439,5160	198,6 5	Не выявле на
59.	pat_623p	 Chemical Formula: $C_{22}H_{27}N_5O_4$ Molecular Weight: 425,48	177,8	Не выявле на
60.	pat_622p	 Chemical Formula: $C_{40}H_{50}N_8O_6$ Molecular Weight: 738,8900	149,0 9	Не выявле на
61.	dv_187p	 Chemical Formula: $C_{40}H_{49}FN_8O_6$ Molecular Weight: 756,8804	218,2	Не выявле на
62.	dv_213p	 Chemical Formula: $C_{40}H_{49}BrN_8O_6$ Molecular Weight: 817,7860	264,0 3	Не выявле на
63.	dv_246p	 Chemical Formula: $C_{40}H_{49}IN_8O_6$ Molecular Weight: 864,7865	179,0 5	Не выявле на

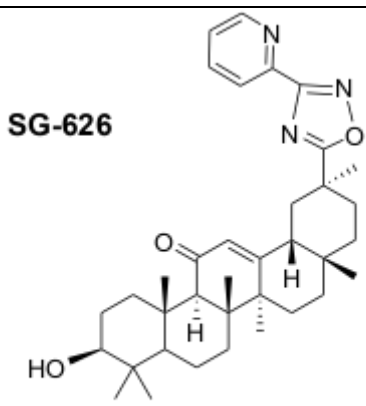
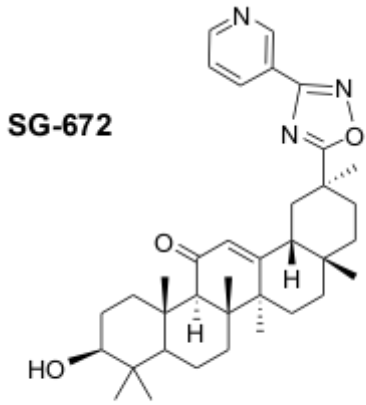
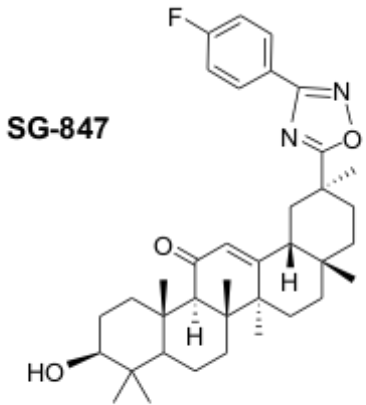
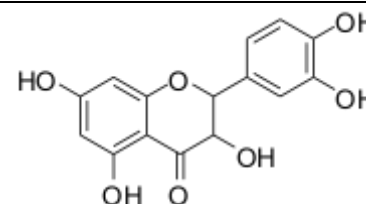
64.	dv_220p	 Chemical Formula: $C_{41}H_{51}BrN_8O_6$ Molecular Weight: 831,8130	228,1	Не выявле на
65.	dv_258p	 Chemical Formula: $C_{40}H_{52}N_{10}O_6$ Molecular Weight: 768,9200	207,1	Не выявле на
66.	dv_255p	 Chemical Formula: $C_{40}H_{51}FN_{10}O_6$ Molecular Weight: 786,9104	186,4	Не выявле на
67.	dv_254p	 Chemical Formula: $C_{40}H_{51}IN_{10}O_6$ Molecular Weight: 894,8165	219,8	Не выявле на
68.	dv_257p	 Chemical Formula: $C_{41}H_{53}BrN_{10}O_6$ Molecular Weight: 861,8430	255,2	Не выявле на

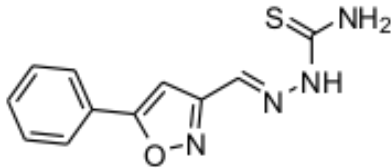
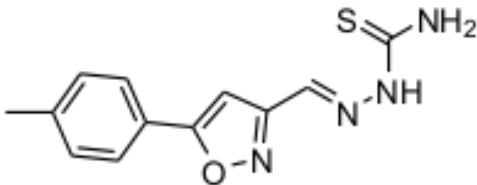
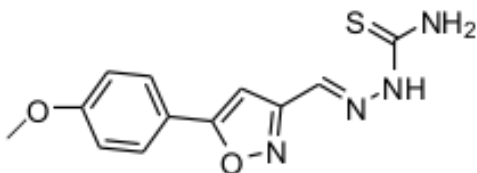
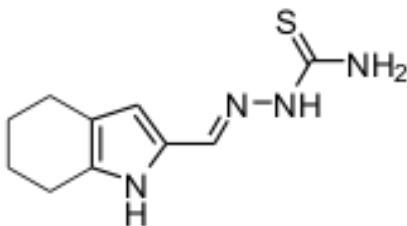
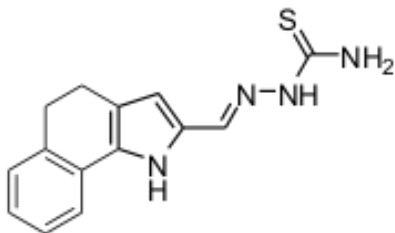
69.	dv_221p	 Chemical Formula: $C_{41}H_{51}BrN_8O_8$ Molecular Weight: 863,8110	303,6	Не выявле на
70.	dv_260p	 Chemical Formula: $C_{40}H_{51}IN_{10}O_8$ Molecular Weight: 926,8145	263,1	Не выявле на
71.	dv_243p	 Chemical Formula: $C_{25}H_{28}FN_5O_4$ Molecular Weight: 481,5284	220,7	Не выявле на
72.	dv_216p	 Chemical Formula: $C_{25}H_{28}BrN_5O_4$ Molecular Weight: 558,0000	284,1	Не выявле на
73.	dv_190p	 Chemical Formula: $C_{40}H_{50}N_8O_8$ Molecular Weight: 770,8880	194,4	Не выявле на

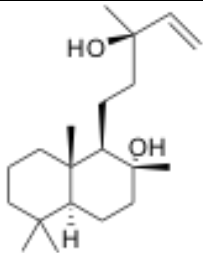
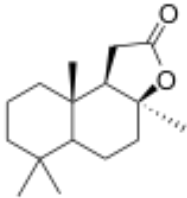
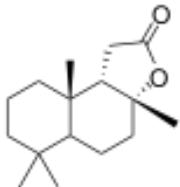
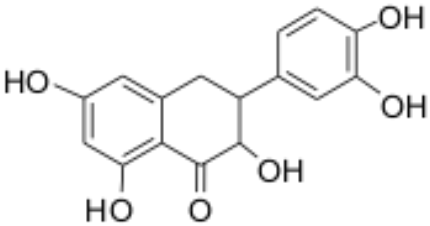
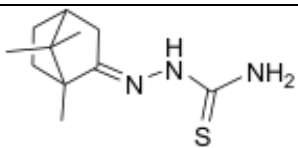
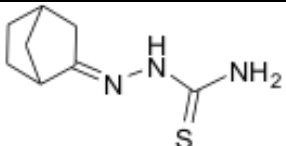
74.	ev-250BSN	 ev-250BSN Chemical Formula: $C_{33}H_{47}NO_4S_2$ Molecular Weight: 585,86	116,4	Не выявлено
75.	ev-246BNN	 ev-246BNN Chemical Formula: $C_{32}H_{46}N_2O_4S$ Molecular Weight: 554,78	172,05	Не выявлено
76.	PI-322-C2	 PI-322-C2 Chemical Formula: $C_{30}H_{52}N_2O_4$ Molecular Weight: 504,74	328,9	Не выявлено
77.	PI-340T	 PI-340T Chemical Formula: $C_{28}H_{43}N_3O_4S$ Molecular Weight: 517,72	312,4	Не выявлено

78.	PI-287SNN	 PI-287SNN Chemical Formula: C₂₈H₄₃N₃O₄S₂ Molecular Weight: 549,79	291,0 2	Не выявле на
79.	PI-285Im	 PI-285Im Chemical Formula: C₃₀H₄₆N₂O₄S Molecular Weight: 530,76	274,4	Не выявле на
80.	PI-383PM	 PI-383PM Chemical Formula: C₃₀H₄₄N₂O₄S Molecular Weight: 528,75		Не выявле на

81.	AG-63PM	 AG-63PM Chemical Formula: $C_{36}H_{52}N_2O_4S$ Molecular Weight: 608,87		Не выявле на
82.	PI-383Me	 PI-383Me Chemical Formula: $C_{32}H_{48}N_2O_3$ Molecular Weight: 508,74		Не выявле на
83.	SG-625tBu	 SG-625tBu Chemical Formula: $C_{35}H_{54}N_2O_3$ Molecular Weight: 550,81	15,27	Не выявле на

84.	SG-626	SG-626  Chemical Formula: $C_{36}H_{49}N_3O_3$ Molecular Weight: 571,79	192,2 7	Не выявле на
85.	SG-672	SG-672  Chemical Formula: $C_{36}H_{49}N_3O_3$ Molecular Weight: 571,79	241,0 1	Не выявле на
86.	SG-847	SG-847  Chemical Formula: $C_{37}H_{49}FN_2O_3$ Molecular Weight: 588,79	147,8	Не выявле на
87.	DGK	 Chemical Formula: $C_{15}H_{12}O_7$ Molecular Weight: 304,25	299,0 1	Не выявле на

88.	ZHU-185	 Molecular Weight: 246,29	169,0 1	Не выявле на
89.	ZHU-186	 Molecular Weight: 260,32	146,8 7	Не выявле на
90.	ZHU-188	 Molecular Weight: 276,31	133,3	Не выявле на
91.	ZHU-189	 Molecular Weight: 222,31	159,4 4	Не выявле на
92.	ZHU-190	 Molecular Weight: 270,35	162,3 4	Не выявле на

93.	Ya-Skl	 Chemical Formula: $C_{20}H_{36}O_2$ Molecular Weight: 308,50	149,1	Не выявле на
94.	Ya-519	 Chemical Formula: $C_{16}H_{26}O_2$ Molecular Weight: 250,38	155,0 9	Не выявле на
95.	Ya-520	 Chemical Formula: $C_{16}H_{26}O_2$ Molecular Weight: 250,38	110,2	Не выявле на
96.	Ya-DHK	 Chemical Formula: $C_{16}H_{14}O_6$ Molecular Weight: 302,28	142,0 7	Не выявле на
97.	Ya-309	 Chemical Formula: $C_{11}H_{19}N_3S$ Molecular Weight: 225,35	98,5	Не выявле на
98.	Ya-674	 Chemical Formula: $C_8H_{13}N_3S$ Molecular Weight: 183,27	112,0 3	Не выявле на