

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-177

**ОЦЕНКА ВИРУСИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ НАНОКАПСУЛ, СОДЕРЖАЩИХ МИРНК, НА КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ \*****EVALUATION OF THE VIRUS INHIBITORY ACTIVITY OF SIRNA CONTAINING NANOCAPSULES ON ROTAVIRUS INFECTION CELL MODEL**

А. В. Бродская<sup>1,2</sup>, А. В. Грачева<sup>3</sup>, А. Р. Ахметова<sup>1,4</sup>, Д. М. Хохлова<sup>3</sup>,  
Е. Р. Корчевая<sup>3</sup>, Д. И. Смирнова<sup>3</sup>, А. Рогова<sup>1</sup>, Р. Джазули<sup>1</sup>, Е. Б. Файзулов<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого

<sup>2</sup>НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва

<sup>4</sup>Университет ИТМО, Санкт-Петербург

A. V. Brodskaya<sup>1,2</sup>, A. V. Gracheva<sup>3</sup>, A. R. Akhmetova<sup>1,4</sup>, D. M. Khokhlova<sup>3</sup>,  
E. R. Korchevaya<sup>3</sup>, D. I. Smirnova<sup>3</sup>, A. Rogova<sup>1</sup>, R. Djazouli<sup>1</sup>, E. B. Faizulov<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University

<sup>2</sup>Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg

<sup>3</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow

<sup>4</sup>ITMO University, Saint Petersburg

✉ alexandra.b\_05@mail.ru

**Аннотация**

В нашем исследовании предлагается перспективный подход к терапии ротавирусов с применением миРНК — интерференции. В результате биоинформатического анализа генов ротавируса NSP1 и NSP4 подобраны 10 потенциальных противовирусных миРНК, проведен скрининг их вирусингибирующего потенциала. Отобранная миРНК, таргетная к гену NSP4, в составе полилактидных нанокапсул продемонстрировала значимое снижение вирусной репродукции на клеточной модели инфекции.

**Abstract**

Our study proposes a promising approach for rotavirus therapy using siRNA interference. 10 potential antiviral siRNAs were selected as a result of bioinformatics analysis of rotavirus genes NSP1 and NSP4, and they were screened for virus-inhibitory potential. The selected siRNA targeting the NSP4 gene, in the composition of polylactide nanocapsules, demonstrated a significant decrease in viral reproduction in infection cell model.

Ротавирусы являются одной из самых частых причин возникновения острых гастроэнтеритов у детей, особенно раннего возраста. На данный момент не существует этиотропного лечения, направленного на подавление ротавирусной инфекции, а приобретенный после вакцинации (или перенесенного заболевания) иммунитет не полностью предотвращает новые случаи заболевания. Вследствие большой вариабельности белков ротавируса и высокой скорости изменчивости его генома поиск препаратов для терапии работающих на уровне белковых взаимодействий представляется малоэффективным. В нашем исследовании мы использовали более перспективный подход с применением миРНК — интерференции, позволяющей эффективно и с высокой специфичностью ингибировать вирусные гены, используя миРНК к их наиболее консервативным последовательностям.

На предварительном этапе было проведено эволюционное и биоинформатическое исследование двух генов ротавируса: NSP1 и NSP4 как потенциальных мишеней для РНК-интерференции в качестве противовирусной терапии. В результате были выявлены потенциальные области и проведен дизайн *in silico* 10 потенциальных противовирусных миРНК. Был осуществлен первичный скрининг вирусингибирующего действия данных миРНК на клеточной модели ротавирусной инфекции МА-104 в отношении штамма Wa ротавируса человека группы А, генотип G1P[8] (PBA Wa, ATCC-VR-2018). миРНК доставляли в клетки коммерческим реагентом Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher) по профилактической схеме за 24 ч до заражения и оценивали репродукцию вируса в течение 3 суток с определением титра по накоплению вирусной мРНК методом ОТ-ПЦР-РВ, методом ИФА

\* Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ (№ 22-74-10117).

и оценкой ЦПД при титровании вирусного потомства. Полученные тремя методами данные свидетельствуют, что на определенных временных точках внесение миРНК приводит к подавлению репликации РВА *in vitro*. В частности, было показано однозначное и достоверное снижение вирусной репродукции более чем на 50 % для двух миРНК, таргетных к гену NSP4, через 24, 48 и 72 ч после инфицирования. В свою очередь, миРНК, таргетная к гену NSP1, проявила вирусингибирующую активность в течение первых суток после заражения при совокупности данных. В результате скрининга были отобраны 3 перспективные миРНК для оценки их противовирусной активности в составе органических полилактидных нанокапсул. Нанокапсулы как эффективные носители миРНК для внутриклеточной и пероральной доставки *in vivo* были ранее разработаны и исследованы нашим коллективом СПбПУ (данные еще не опубликованы).

Внесение препаратов миРНК в нанокапсулах проводили по профилактической схеме за 24 ч до заражения и по лечебно-профилактической схеме через 4 ч после заражения. Вирусингибирующая активность определялась также на клеточной модели MA-104 в отношении РВА Wa (3,3 lgТЦД<sub>50</sub>/мл); в экспериментах использовались две дозы заражения MOI = 0,05 и 0,01. Параллельно было оценено влияние вирусного заражения на эффективность трансфекции с использованием флуоресцентно-меченных пустых нанокапсул и меченных нецелевых, негативных миРНК. Показано повышенное более чем в 2 раза накопление флуоресцентного сигнала в клетках с внесением препаратов по лечебно-профилактической схеме. Также было продемонстрировано, что пустые нанокапсулы и негативные миРНК при любом режиме введения способны подавлять вирусную репродукцию в клетках, по видимости, вследствие активации интерферонового ответа.

Сопоставление результатов определения вирусного антигена в клетках, накопления вирусной РНК и инфекционной активности вируса на разные сроки после заражения клеток, обработанных полилактидными нанокапсулами, не выявило выраженной противовирусной активности препаратов миРНК на 1-е сутки после заражения при разных схемах применения (лечебная, профилактическая). Через 24 и 72 ч после заражения наблюдалась тенденция к снижению вирусной репродукции и понижению титра вируса в пределах 1,5 lgТЦД<sub>50</sub>/мл для одной из миРНК, таргетной к гену NSP4. Данная миРНК также продемонстрировала значимое снижение вирусной репродукции по сравнению с негативным контролем через 72 ч после заражения при введении по профилактической схеме и малой заражающей дозе вируса (0,01 MOI). Наблюдалось снижение вирусного титра с 7,40 lgТЦД<sub>50</sub>/мл до значения 0, менее порога чувствительности метода.

Таким образом, была отобрана перспективная миРНК для продолжения исследований по разработке противовирусного препарата в отношении РВА. На данный момент начаты эксперименты по определению противовирусной активности препарата миРНК в составе полилактидных нанокапсул на модели ротавирусной инфекции мышей.