

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-218

**ДНКЗИМ-СОДЕРЖАЩИЕ НАНОКОМПОЗИТЫ,  
АКТИВНЫЕ В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ГРИППА А/H5N1\*****DNAZYME-CONTAINING NANOCOMPOSITES ACTIVE AGAINST INFLUENZA A VIRUS H5N1**

М. Е. Ребус<sup>1</sup>, Е. И. Филиппова<sup>1</sup>, М. А. Проценко<sup>1</sup>, Е. В. Макаревич<sup>1</sup>,  
М. Н. Репкова<sup>2</sup>, В. Ф. Зарытова<sup>2</sup>, А. С. Левина<sup>2</sup>, Л. Н. Шишкина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

<sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

M. E. Rebus<sup>1</sup>, E. I. Filippova<sup>1</sup>, M. A. Protsenko<sup>1</sup>, E. V. Makarevich<sup>1</sup>,  
M. N. Repkova<sup>2</sup>, V. F. Zarytova<sup>2</sup>, A. S. Levina<sup>2</sup>, L. N. Shishkina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

<sup>2</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ rebus\_me@vector.nsc.ru

**Аннотация**

ДНКзимы (Dz) представляют большой интерес в качестве терапевтических нуклеиновых кислот, поскольку могут каталитически расщеплять РНК, являясь, таким образом, геноспецифичными ножницами. На основе наночастиц аminosиланола (Si) и анатаза (Ans) созданы ДНКзим-содержащие наноконпозиты. Полученные наноконпозиты Si~Dz и Ans~Dz проявили высокую активность в клеточной системе в отношении вируса гриппа А/Н5N1: они подавляли репликацию вируса на 3,5 lg.

**Abstract**

DNAzymes (Dz) are of great interest as therapeutic nucleic acids since they can catalytically cleave RNA, thus being gene-specific scissors. DNAzyme-containing nanocomposites based on nanoparticles of aminosilanol (Si) and anatase (Ans) have been created. The obtained Si~Dz and Ans~Dz nanocomposites showed high activity in the cellular system against the influenza A/H5N1 virus: they suppressed virus replication by 3.5 log<sub>10</sub>.

Фрагменты нуклеиновых кислот (НК) привлекают большое внимание как перспективные терапевтические агенты. Наиболее интересные среди них — siRNA и ДНКзимы (Dz), которые могут каталитически расщеплять РНК, являясь, таким образом, геноспецифичными молекулярными ножницами [1]. ДНКзимы обладают рядом преимуществ по сравнению с siRNA: большая устойчивость к нуклеазам и меньшая стоимость [2]. Показано, что наночастицы аминопропилсиланола (Si ~ NH<sub>2</sub>) и диоксида титана в форме анатаза (Ans) эффективно доставляют фрагменты НК в эукариотические клетки [3, 4].

Цель работы — исследование возможности наноконпозитов на основе наночастиц Ans и Si-NH<sub>2</sub>, несущих Dz, подавлять репликацию вируса гриппа штамма A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1).

В работе использован Dz (5'-GAAATAAGA GGCTAGCTACAACGA CCTTCATTA), направленный на (+) РНК сегмента 5-го вируса гриппа А, так как он проявил наибольшую антивирусную активность среди большого набора ДНКзимов [5]. Некомплементарный Dz(н/с) (TCAACTCCA GGCTAGCTACAACGA ATGCCATGT) использован для контроля. Структура Dz состоит из трех частей: каталитически активного 15-мерного центрального фрагмента (в рамке), окруженного двумя короткими фрагментами для нацеливания на определенные участки РНК.

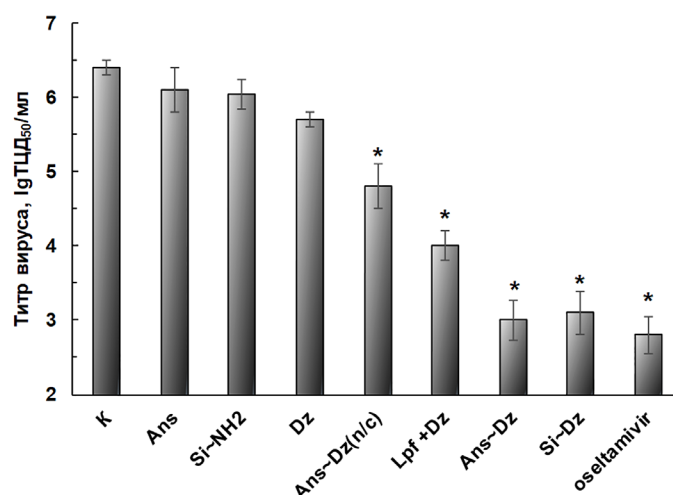
Наноконпозиты Si-NH<sub>2</sub>-Dz (далее Si~Dz) и Ans-PL-Dz (далее Ans~Dz) получали иммобилизацией Dz соответственно на наночастицах Si-NH<sub>2</sub> [4] и Ans, предварительно покрытых полилизинном [6].

Показано, что Dz в этих наноконпозитах сохраняет способность расщеплять РНК-мишень в бесклеточной системе так же, как и несвязанные молекулы Dz. Наноконпозиты Ans~Dz и Si~Dz проникают в эукариотические клетки, причем Dz обнаруживается в цитоплазме и ядрах [3, 4].

Противовирусную активность Ans~Dz и Si~Dz в клетках MDCK, зараженных вирусом гриппа А/Н5N1, изучали при концентрации 5 мкг/мл (0,1 мкМ по Dz), что намного ниже их 50 % токсических концентраций (ТС<sub>50</sub> = 1500 мкг/мл) [7]. Эксперименты проводили как описано в [4, 6]. Результаты приведены на рисунке.

\* Исследование выполнено в рамках государственного задания Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (№ 30/21) и Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (№ 125012300656-5).

© М. Е. Ребус, Е. И. Филиппова, М. А. Проценко, Е. В. Макаревич, М. Н. Репкова, В. Ф. Зарытова, А. С. Левина, Л. Н. Шишкина, 2025



Противовирусная активность исследуемых образцов в отношении A/H5N1. Концентрации образцов: Dz — 0,1 мкМ; Ans — 5 мкг/мл; Si-NH<sub>2</sub> — 0,1 мМ; озельтамивир — 150 мкг/мл. К — титр вируса в клетках без добавления образца. Результаты представлены в виде средних значений и стандартных отклонений. \* — отличие от контроля (без образца) по методу Спирмена — Кербера,  $p \leq 0,05$

Наночастицы и не связанный с ними Dz практически не обладают противовирусной активностью. Наноконпозиты Ans~Dz и Si~Dz подавляли репликацию вируса на 3,4 и 3,3 lg соответственно, что превышает эффективность Dz в присутствии трансфекционного агента липофектамина (Lpf + Dz). Препарат сравнения озельтамивир был несколько активнее предложенных наноконпозитов. Наноконпозит Ans~Dz(n/c), несущий некомплементарный Dz, хотя и проявил заметную активность (подавление на 1,5 lg), но она была намного ниже активности наноконпозитов Ans~Dz и Si~Dz, что указывает на селективность действия целевого Dz.

Таким образом, в работе продемонстрирована высокая противовирусная активность наноконпозитов на основе наночастиц аminosиланолата и анатаза против вируса гриппа A/H5N1 в клеточной системе. Полученные результаты указывают на антисмысловой эффект олигонуклеотидов, нацеленных на вирусную мРНК. В связи с этим антисмысловая технология может быть перспективной для лечения гриппозной инфекции.

### Литература

1. Baum D.A., Silverman S. K. Deoxyribozymes: useful DNA catalysts in vitro and in vivo // Cell. Mol. Life Sci. 2008. Vol. 65. P. 2156–2174.
2. Franzen S. Expanding the catalytic repertoire of ribozymes and deoxyribozymes beyond RNA substrates // Curr. Opin. Mol. Ther. 2010. Vol. 12. P. 223–232.
3. Levina A. S., Repkova M. N., Shikina N. V. et al. TiO<sub>2</sub>-Deoxyribozyme nanocomposites as delivery system and efficient site-specific agents for cleavage of RNA targets // Drug Deliv. Let. 2014. Vol. 4. P. 142–147.
4. Levina A. S., Repkova M. N., Shikina N. V. et al. Non-agglomerated silicon-organic nanoparticles and their nanocomplexes with oligonucleotides: synthesis and properties // Beilstein J. Nanotechnol. 2018. Vol. 9. P. 2516–2525.
5. Evdokimov A. A., Mazurkova N. A., Malygin E. G. et al. Design of deoxyribozymes for inhibition of influenza A virus reproduction // Mol. Biol. (Russian). 2012. Vol. 46. P. 1–11.
6. Левина А. С., Исмагилов З. Р., Репкова М. Н. и др. Создание TiO<sub>2</sub>-DNA-наноконпозитов, способных проникать в клетки // Биоорг. хим. 2013. Т. 39. С. 87–98.
7. Levina A. S., Repkova M. N., Ismagilov Z. R. et al. High-performance method for specific effect on nucleic acids in cells using TiO<sub>2</sub>-DNA nanocomposites // Sci. Rep. 2012. Vol. 2. P. 756.