

На правах рукописи

Бродская Александра Валерьевна

**РАЗРАБОТКА ПРОТИВОВИРУСНОЙ КОМПОЗИЦИИ МАЛЫХ
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ РЕПРОДУКЦИИ
ВИРУСА ГРИППА А**

03.02.02 – Вирусология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель
(консультант)**

кандидат биологических наук
Васин Андрей Владимирович

Официальные оппоненты:

Ведущая организация:

Защита диссертации состоится _____ в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.043.01 при ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17), тел. (812) 499 15 04; e-mail: sovet@influenza.spb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17); на сайте <http://www.influenza.spb.ru>.

Автореферат разослан _____
(дата)

Ученый секретарь
Диссертационного совета
Кандидат биологических наук

Амосова И.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Грипп — это острая респираторная инфекция, вызываемая одноименными вирусами семейства *Orthomyxoviridae*. Грипп представляет серьезную проблему для общественного здравоохранения, вызывая ежегодные сезонные эпидемии и периодические пандемии с высокой летальностью. Грипп приводит к развитию множества осложнений, основным из которых является вторичная бактериальная пневмония, способная вызывать смертельные исходы в группах риска. По данным ВОЗ ежегодно фиксируются десятки миллионов случаев заболевания гриппом, в том числе до полумиллиона смертельных исходов.

Вследствие сегментированности генома вирус гриппа имеет потенциал к реассортации генов, приводящей к кардинальному изменению биологических свойств вируса (вирулентность и инфекционность). Вирусы гриппа также обладают способностью к очень высокой мутационной изменчивости, и, как следствие, к быстрому приобретению устойчивости к лекарственным препаратам [ВОЗ/Грипп, 2016]. В настоящее время противовирусные средства для лечения гриппа представляют собой крайне ограниченную группу препаратов, при этом для части из них известна лекарственная резистентность [Деева Э.Г. и др., 2013; Киселев О.И., Цыбалова Л.М., 2012; Clercq De, 2006]. За последние десятилетия в связи с угрозой возникновения новых штаммов вируса гриппа типа А (ВГА), нехарактерных для человеческой популяции, как в случае «птичьего» в 2006 и «свиного» гриппа в 2009 [Киселев О.И., 2016; Andradóttir et al., 2011], возросла потребность в разработке принципиально новых этиотропных препаратов, способных обойти проблему резистентности вируса, или же противовирусных препаратов широкого спектра действия, обладающих повышенной эффективностью и доступностью в применении. Одним перспективных направлений создания противовирусных препаратов является использование ингибиторов вирусной репродукции на основе малых интерферирующих РНК (миРНК) [J.van Mierlo et al., 2010].

Впервые синтетические миРНК были применены в качестве терапевтических агентов против респираторно-синтициального вируса в 2001 году [Bitko, Barik, 2001]. С тех пор были исследованы различные подходы по использованию РНК-интерференции для терапии респираторных вирусных инфекций [Горшков А.Н. и др., 2017; Thomsen et al., 2013; F.L. Tan, J.Q. Yin, 2004]. Основным препятствием практического применения миРНК по сей день является проблема эффективной и нетоксичной доставки этих молекул в клетки и длительной защиты ее функционально активного состояния. В случае вируса гриппа человека наиболее целесообразной видится система доставки миРНК, подходящая для интраназального введения. Этот путь доставки минимизирует системную потерю миРНК, так как они доставляются непосредственно к месту репликации вируса гриппа – эпителиальным клеткам дыхательных путей. Для этой цели часто используются поликатионные полимеры, способные за счет положительного заряда связывать миРНК и обеспечивать защиту от нуклеаз и хорошую растворимость. В настоящее время существует ряд препаратов на основе молекул миРНК, находящихся на стадии доклинических исследований [Ozcan et al., 2015]. Тем не менее, несмотря на полученные положительные результаты, проблема оптимальной доставки миРНК

для терапии гриппа все еще не решена, и разрешенный к применению фармацевтический препарат на основе миРНК в настоящее время отсутствует.

Таким образом, разработка новых современных подходов к терапии гриппа на основе использования механизма РНК-интерференции и сопутствующее ей решение задачи высокоэффективной и безопасной доставки препарата миРНК в инфицированные клетки, являются чрезвычайно актуальными задачами современной молекулярной и клинической вирусологии.

Степень разработанности темы исследования

Разработка новых противовирусных препаратов, в частности, направленных на лечение и профилактику гриппа, является общемировой актуальной задачей. На сегодняшний день уровень развития биотехнологий позволяет синтезировать множество соединений, обладающих биологической/фармакологической активностью с высокой специфичностью к вирусным мишеням. Разработка таких препаратов проводится с применением методов высокоточного молекулярного докинга с дальнейшим скринингом – оптимизацией для селективного взаимодействия с определенной мишенью. Однако, практический выход такого подхода, к сожалению, невелик. Более того, высокая адресность действия лекарственных средств может приводить к быстрому появлению резистентных вирусных штаммов.

В связи с этим требуются новые подходы к созданию противовирусных препаратов, позволяющие как проводить их быстрый дизайн, так и избавиться от моноспецифичности в отношении мишени. Перспективным направлением ингибирования вирусной репродукции на уровне экспрессии генов считается использование миРНК. После успешного применения терапевтических миРНК для подавления гриппозной инфекции в исследованиях на клеточных культурах и лабораторных мышах в 2009 году [Ge et al., 2003; Ge et al., 2004] многие научные коллективы тестировали различные миРНК, направленные на подавление экспрессии всех консервативных генов ВГА: *NP*, *PA*, *PB1*, *PB2*, *M*, *NS* [McCown et al., 2003; Hui et al., 2004; Sui et al., 2009; Jiao et al., 2013; Svancharova et al., 2015]. Убедительно продемонстрировано, что единственная миРНК может обеспечить защиту от ВГА разных подтипов [Thakur et al., 2012]. Относительно недавно компанией SiRNAomics был разработан новый препарат STP702 многоцелевого действия, объединяющий в себе коктейль миРНК, направленных на различные консервативные области генома ВГА. Было показано, что STP702 эффективен в отношении штаммов ВГА подтипов H5N1 и H1N1 [SiRNAomics, 2015]. Вместе с тем, вопрос о стабильном защитном действии миРНК остается не решенным. Открытым также является вопрос максимально эффективной и биологически безопасной доставки миРНК в инфицированные клетки. Существует ряд обзоров, посвящённых методам невирусной доставки миРНК [Thomas et al., 2005; Kaszmarek et al., 2017], однако четкого понимания, какая система может быть признана оптимальной для использования на уровне организма, до сих пор нет.

Перспективные результаты по доставке миРНК были получены при их инкапсулировании в гибридные микро- и наноконтейнеры, представляющие собой полиэлектролитные капсулы с поверхностью, модифицированной неорганическими соединениями [Ganas et al., 2014; Timin et al., 2017]. Технология капсулирования показала себя как эффективная мультифункциональная платформа для доставки

различных биомолекул, позволяющая включать в себя несколько биомакромолекул с высоким их содержанием и контролируемым соотношением, а также высокой степенью защиты от биодegradации [Timin et al., 2017]. Благодаря возможности модификации микрокапсул за счет химического состава наружного слоя, скорость их деградации и распределение содержимого может легко варьироваться. Это позволяет осуществлять направленный транспорт к клеткам-мишеням с оптимальной терапевтической концентрацией. Применение этой технологии для доставки терапевтических миРНК для подавления репродукции ВГА было впервые осуществлено в рамках выполнения данного исследования в 2017 г на базе ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России научным коллективом при участии автора [Timin et al., 2017]

Цель исследования

Разработать комбинацию малых интерферирующих РНК (миРНК) в комплексе с эффективной системой доставки для ингибирования экспрессии генов вируса гриппа А человека *in vitro*.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

Задачи исследования

1. Провести подбор миРНК, направленных на консервативные области геномных сегментов PA и NP ВГА человека.
2. Выбрать наиболее перспективные миРНК по результатам *in vitro* скрининга их противовирусной активности при внутриклеточной доставке с использованием липофектамина.
3. Выбрать наиболее эффективный носитель для миРНК по результатам сравнения эффективности внутриклеточной доставки и противовирусной активности миРНК в комплексе с полиэтиленимином, производными хитозана, липофектамином и гибридными полиэлектролитными микрокапсулами.
4. Оценить противовирусный потенциал композиции выбранных миРНК и носителя в отношении ВГА *in vitro*.
5. Провести исследование противовирусного действия разработанной композиции *in vitro* в отношении ВГА разных подтипов.

Научная новизна работы

В процессе выполнения исследования впервые подобраны миРНК, направленные на «выключение» экспрессии генов ВГА, кодирующих белки NP, PA, PA-N155, PA-N182 и PA-X, и обладающие противовирусной активностью *in vitro*.

Впервые проведено сравнительное исследование эффективности внутриклеточной доставки и противовирусного в отношении ВГА действия препаратов миРНК с различными невирусными носителями: полиплексами, липосомами и микрокапсулами.

Впервые продемонстрировано эффективное применение упакованных в гибридные микрокапсулы миРНК для эффективного подавления репродукции ВГА *in vitro*.

Разработана не имеющая прямых аналогов противовирусная композиция для подавления экспрессии генов PA, NP и NS ВГА, представляющая собой комбинацию из трех направленных на эти гены миРНК, инкапсулированных в гибридные полиэлектролитные микрокапсулы с поверхностью, модифицированной частицами SiO₂.

Теоретическая и практическая значимость работы

Выполненная работа представляет собой фундаментальное научное исследование, посвященное проблеме внутриклеточной доставки противовирусных миРНК в клетки, обладающее, помимо теоретической значимости, выраженным прикладным потенциалом.

Продемонстрирована возможность успешного применения инкапсулированных терапевтических миРНК, направленных на подавление экспрессии нескольких генов ВГА, в опытах *in vitro* в отношении штаммов ВГА различных подтипов.

Полученные результаты исследования противовирусного потенциала миРНК будут в дальнейшем использоваться для разработки фармакологической формы препарата на основе миРНК, предназначенного для профилактики и лечения вирусной инфекции, вызванной ВГА человека.

Предложенные подходы по эффективной внутриклеточной доставке миРНК с помощью гибридных микрокапсул, поверхность которых может быть при необходимости модифицирована с целью достижения большей биосовместимости, биodeградируемости, эффективности и таргетности доставки, будут также использованы при разработке новых фармацевтических препаратов различного действия.

Методология и методы исследования.

В работе применялись стандартные вирусологические, биохимические, молекулярно-биологические и иммунологические методы. Кроме того, были применены оригинальные подходы при компьютерном анализе последовательностей и подборе миРНК. Более подробно способы проведения экспериментов отражены в разделе «Материалы и методы».

Основные положения, выносимые на защиту

1. Синтетические миРНК PA-1630, NP-717, NP-1004 и NP-1341, направленные на консервативные области мРНК PA и NP, обладают противовирусным действием в отношении ВГА *in vitro*.

2. Гибридные SiO₂-микрокапсулы обладают низкой цитотоксичностью и высокой инкапсулирующей способностью в отношении миРНК, обеспечивают длительную защиту миРНК от РНКаз, а также эффективную и быструю трансфекцию миРНК внутрь клетки и их полное высвобождение в цитозоль через 24 часа после введения.

3. Препарат инкапсулированных в гибридные SiO₂-микрокапсулы миРНК, направленных на подавление экспрессии генов NP, PA и NS ВГА, обладает высокоспецифичным противовирусным действием в отношении ВГА подтипов H1N1, H1N1_{pdm09}, H5N2, H7N9. Эффективность ингибирования вирусной репродукции в случае профилактического введения препарата из комбинации трех миРНК выше, чем эффективность каждого препарата по отдельности.

Личный вклад автора состоит в самостоятельном планировании и выполнении всех основных лабораторных исследований, анализе и статистической обработке полученных результатов. Автором лично проведен подбор миРНК, направленных на подавление экспрессии генов PA и NP ВГА, и первичный скрининг их противовирусного действия *in vitro* в комплексе с липофектами. Также автором проведены все работы по подбору параметров и характеристике комплексов

миРНК с поликатионными носителями, сравнительное исследование эффективности доставки, опыты *in vitro* по определению противовирусной активности препаратов миРНК.

Вклад соавторов. При выполнении данного исследования методическая помощь была оказана сотрудниками ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России: Даниленко Д.М., Штро А.А. – при культивировании используемых в работе штаммов вируса гриппа, Сахенберг Е.И. – при культивировании используемых в работе клеточных культур А549 и МДСК, Горшковым А.Н. – при проведении экспериментов с использованием электронной микроскопии, Шурыгиной А.-П. С. – при проведении экспериментов по проточной цитофлуориметрии. Химический синтезе микрокапсул, их характеристика и помощь в проведении конфокальной микроскопии для оценки внутриклеточной доставки миРНК, были осуществлены сотрудниками рабочей группы RASA-центра СПбПУ Петра Великого Тиминим А.С. и Муслимовым А.Р. под руководством проф. Сухорукова Г.Б.

Степень достоверности и апробация материалов диссертации

Достоверность результатов исследований, проведённых автором, подтверждена статистическим анализом данных, полученных в ходе независимых экспериментов. Материалы диссертационной работы доложены на 42-м Международном конгрессе FEBS (Иерусалим, Израиль 2017); на Международной научной конференции «Trends in Influenza Research 2017» (Санкт-Петербург, 2017); на XVIII Зимней молодежной школе-конференции по биофизике и молекулярной биологии ПИЯФ (Ленинградская область, п. Рощино, 2017), на X Всероссийском Конгрессе с международным участием молодых ученых-биологов "Симбиоз 2017" (Казань, 2017), на Конференции с международным участием XLVI «Неделя науки СПбПУ», (Санкт-Петербург, 2017), а также в виде доклада на научно-практическом курсе Европейской Организации Молекулярной Биологии EMBO «Small non-coding RNA in infection» (Вюрцбург, Германия, 2014).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, в том числе 7 статей, из них 4 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, и 10 тезисов докладов.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 118-ти страницах машинописного текста, включая 7 таблиц и 35 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, шести глав собственных исследований и обсуждения полученных результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 131 источник на русском и английском языках. Диссертация изложена в соответствии с общими требованиями к оформлению кандидатских и докторских диссертаций, утверждёнными в ГОСТ Р 7.0.11–2011.

Работа поддержана грантом РФФИ 15-15-13734 «Клеточные микроРНК – новые молекулярные мишени для терапии тяжелых вирусных инфекций», грантом для студентов, аспирантов, молодых учёных, молодых кандидатов наук ВУЗов и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга в 2015 году. Также работа проводилась в рамках темы Государственного задания, выполняемого в ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Вирусы. В работе использовали штаммы вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1), A/Aichi/2/68 (H3N2), A/California/7/09 (H1N1)_{pdm09}, A/mallard/Pensilvania/10218/84 (H5N2), A/Anhui/1/13 (H7N9), B/Malaysia/2506/2004, полученные из коллекции вирусов ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

Клеточные линии. Культуры клеток Мадин-Дарби почки собаки (MDCK) и эпителия легких человека (A549) получены из коллекции клеток ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

Системы доставки миРНК. В работе использовали полиэтиленимин (ПЭИ), метилгликоль хитозан (МГХ), олиголактат хитозана (ОЛХ), гидрохлорид хитозана (ГХХ) (все – Sigma Aldrich, кат. № 408727, M3150, 523682, Y0000104); липофектамин Lipofectamine®2000 (ЛФ) и LipofectamineRNAiMax® (ЛФ-RNAi) (все – Invitrogen, кат. № 11668-019, 13778150); кватернизованный хитозан (КХ), полученный в ИНС им. А.В. Топчиева РАН [Faizuloev et al., 2012]. Гибридные микрокапсулы (SiO₂-МК) были синтезированы и охарактеризованы по методике [Timin et al., 2017] в лаборатории микрокапсулирования и управляемой доставки биологически активных соединений RASA-центра (СПбПУ).

миРНК. РНК олигонуклеотиды были синтезированы “ДНК-синтез” (Москва, Россия). Последовательности приведены в таблице 3.1 текста диссертации.

Приготовление и охарактеризация комплексов поликатионов с миРНК. Комплексы поликатионов с миРНК получали по методике подробно описанной в [Петрова-Бродская и др., 2017] и анализировали связывающую способность полимера в зависимости от соотношения азотных групп полимера (N) к фосфатным группам РНК (P) (соотношение N/P) в расчёте на один нуклеотид и одно мономерное звено, методом разделения в полиакриламидном геле.

Характеристика морфологии SiO₂-МК. Морфологию SiO₂-МК оценивали на сканирующем электронном микроскопе SUPRA 55VP (SEM ZEISS, Германия) при ускоряющем напряжении 15 кВ. Морфологию и толщину оболочки SiO₂-МК изучали методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЭМ) с использованием микроскопа JEM 1011 (JEOL, Япония). Электронные микрофотографии были получены с помощью цифровой камеры Morada (Digital Imaging Solutions Inc.).

Трансфекция миРНК. В работе использовался суточный монослой клеток в культуральных 96/24- и 12 луночных планшетах с плотностью 10⁵ клеток/см². Комплексы миРНК с носителем, а также контрольную свободную миРНК, вносили на клетки в составе среды без сыворотки после двукратной отмывки клеток PBS.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Интернализацию и внутриклеточное распределение миРНК в комплексе с носителями отслеживали по с использованием флуоресцентно меченых молекул миРНК (ROX-миРНК) и лазерного конфокального сканирующего микроскопа (Leica TCS SP8, Германия). Препараты для микроскопии подготавливали по методике, описанной в [Muslimov et al., 2017]. Для получения изображений на конфокальном микроскопе флуоресцентные сигналы DAPI, AF488 PL и ROX-миРНК получали при возбуждении на лазерных линиях 405 нм, 488 нм и 569 нм, соответственно.

Проточная цитофлуориметрия. Для определения динамики накопления миРНК в комплексах с хитозаном и ЛФ клетки после трансфекции FAM-миРНК анализировали на проточном цитометре Navios™ (Beckman Coulter, США) по методике, представленной в [Петрова А.В. и др., 2015]. Эффективность накопления миРНК-ROX, доставляемой SiO₂-МК, количественно определяли интенсивность флуоресценции клеток на проточном цитометре FACS Aria (BD, США) по методике, описанной в [Timin et al., 2017].

Исследование токсичности препаратов. Жизнеспособность клеток оценивали при помощи микротетразолиевого (МТТ) теста согласно методике, приведенной в [Петрова-Бродская и др., 2017].

Определение эффективности внутриклеточной доставки миРНК. Для оценки эффективности проникновения миРНК в клетки была использована FAM-меченая миРНК. Изображения, качественно подтверждающие наличие FAM-меченой миРНК в цитоплазме клеток, а также полуколичественный расчет эффективности доставки были получены с помощью системы формирования изображений Cytell Cell Imaging System (GE Healthcare, США) по методике, опубликованной в [Петрова-Бродская и др., 2017].

ОТ-ПЦР миРНК. Фракцию низкомолекулярных молекул РНК длиной менее 100 нуклеотидов выделяли из клеток с помощью набора miRNeasy Mini Kit (QIAGEN, Германия) согласно протоколу производителя. Далее использовали по 500 нг РНК для проведения полиаденилирования РНК, синтеза первой цепи кДНК и ПЦР-амплификации использованием набора mirVana™ qRT-PCR miRNA Detection Kit (Invitrogen, США) согласно протоколу производителя. В качестве эндогенного контроля использовали микроРНК miR-200a. Полученные ампликоны анализировали методом электрофоретического разделения в 2,5 % агарозном геле на 1xTBE буфере с добавлением EtBr (0,5 мкг/мл). Изображения получали и обрабатывали с помощью системы ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad, США).

Определение противовирусной активности миРНК. Противовирусную активность препаратов миРНК оценивали на клеточных культурах A549 и MDCK. В общем случае препараты миРНК (в конечной концентрации миРНК 0.1-10 мкМ) вносили к клеткам за 24 (4 часа в случае скрининга с ЛФ) до заражения. После инкубации с препаратами (37°C, 5% CO₂) клетки отмывали PBS и заражали вирусом при значении множественности инфекции (MOI) 0,001-1, выбранной в соответствии с данными, представленными в работе [Ge et al., 2003]. При заражении использовали поддерживающую среду DMEM с глутамином, 0,1 мг/мл стрептомицина и 1 мкг/мл трипсина для обеспечения многоциклового репродукции вируса. В качестве положительного контроля противовирусного действия использовали озельтамивир (15 мкг/мл). Через 24 и 72 часа после заражения оценивали вирусную репродукцию в клетках и вирус-содержащей культуральной жидкости (ВКЖ). Репродукцию вируса в ВКЖ оценивали методом реакции гемагглютинации (РГА) с 0,5% куриными эритроцитами для двукратно разведенных ВКЖ общепринятым методом в микропланшетах для иммунологических реакций. Репродукцию вируса в клетках оценивали по уровню накопления вирусного белка NP в инфицированных клетках и ВКЖ методом прямого иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP) мышинных моноклональных антител 6D11, полученных в отделе биотехнологии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

Также вирус-ингибирующее действие миРНК определяли по снижению уровня относительной экспрессии гена *MI* ВГА в клеточных лизатах методом ОТ-*q*ПЦР (описание ниже). Определение противовирусной активности композиции миРНК проводили на клеточной культуре MDCK с оценкой инфекционного титра вируса в соответствии с методическими рекомендациями ВОЗ [WHO/ influenza manual, 2011]; расчет титра вируса был выполнен по методу Рида и Менча [Reed L.J., Muench H., 1938] с использованием 50% тканевой цитопатической дозы (ТЦД₅₀).

Определение уровня вирусного белка NP методом ИФА. Для определения уровня накопления NP клетки фиксировали 80% холодным ацетоном в течение 30 минут при 4°C, затем трижды отмывали раствором PBS с добавлением 0,05% Tween 20 (PBST). Для определения уровня NP в ВКЖ последнюю переносили в сорбционные 96-луночные планшеты Microlon High Binding по 50 мкл в лунку, и сорбировали белки в течение 12 и более часов при 4°C. Детекцию NP методом ИФА проводили по методике, описанной в [Петрова-Бродская и др., 2017] с использованием моноклональных антител 6D11 к NP.

Вестерн-блотинг. Через 72 часа после инфицирования клетки ресуспендировали в PBS, содержащем 0,5% NP-40, и инкубировали в течение 1 часа при 37°C для мягкого лизиса. Концентрацию белка измеряли, как описано в [Hutchinson et al., 2014] с использованием RC DC™ Protein Assay (Bio-Rad, США), выполненного в трех повторностях. Далее проводили анализ с использованием первичных мышинных моноклональных антител к альфа-тубулину (T6074, Sigma) и NP (IA-108, Bialexa) по методике описанной в [McMillen et al., 2016]; изображения анализировали на ChemiDoc XRS + System (Bio-Rad, США).

Выделение РНК, обратная транскрипция и количественная ПЦР в режиме реального времени (ОТ-*q*ПЦР). Тотальную РНК выделяли с помощью наборов RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Германия) согласно протоколу производителя. Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher, США). Для проведения обратной транскрипции с проб тотальной РНК брали 700 нг РНК и использовали стандартный протокол для обратной транскрипции с помощью набора M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, США). ОТ-*q*ПЦР анализ экспрессии гена *MI* ВГА проводили с использованием набора Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies, USA) и системы праймеров Taqman® CDC по протоколу, опубликованному на сайте ВОЗ [ВОЗ/ CDC, 2009]. Для нормализации экспрессии использовали праймеры Taqman® для детекции гена *RP*, кодирующего РНКазу Р. Для количественного определения уровня экспрессии использовали метод $2^{-\Delta\Delta CT}$, принимая за единицу нормализованный уровень экспрессии *MI* в образцах инфекционного контроля, и рассчитывая относительные изменения для других образцов. Для постановки анализа ПЦР использовали три биологические реплики, по два технических повтора.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных проводили с помощью параметрического теста Стьюдента или непараметрического критерия Манна-Уитни (для двух малых независимых выборок) с использованием программного обеспечения MS Office Excel 2010 и Statistica 6.0. Различия считали статистически значимыми для значений $p < 0,05$. Для представления полученных данных использовали такие показатели описательной статистики, как среднеарифметическое значение и стандартное отклонение.

Результаты и обсуждение

1. Дизайн миРНК, направленных на выключение экспрессии генов *PA* и *NP* вируса гриппа А, и скрининг их противовирусной активности *in vitro*

На первом этапе работы провели подбор миРНК, направленных на консервативные области генов *PA* и *NP* ВГА. *NP* является функционально важным элементом вирусного рибонуклеопротеинового (РНП) комплекса, он связывается с РНК-зависимой РНК-полимеразой, а также несколькими клеточными белками, включая актин и компоненты системы ядерного импорта и экспорта [Fields et al., 2007]. *PA* является частью гетеротримерного комплекса РНК-полимеразы, в составе которого участвует в инициации транскрипции и проявляет эндонуклеазную активность. Помимо *PA* ген *PA* кодирует еще три минорных белка: *PA-N155*, *PA-N182* и *PA-X*, которые вносят вклад в патогенез ВГА-инфекции. Депонированные в базу данных *Genbank* [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database>] нуклеотидные последовательности генов *PA* и *NP* ВГА человека были подвержены множественному выравниванию в программе MAFFT. После дополнительной обработки выравниваний в программе ClustalX 8500 получили консенсусные нуклеотидные последовательности двух выбранных генов ВГА с вероятностью встречаемости нуклеотидов более 75%. На основе этих последовательностей в соответствии с эмпирическими правилами дизайна миРНК [Elbashir S.M. et al., 2002; Elhefnawi et al., 2011] были подобраны 11 ранее не описанных в литературе миРНК, направленных на гены *PA* (анти-*PA*) и *NP* (анти-*NP*). Последовательности миРНК были проверены на отсутствие гомологии с генами человека и ВГА с целью исключения возможности их влияния на экспрессию нецелевых генов. Кроме того было выбрано несколько миРНК, противовирусная активность которых в отношении ВГА была ранее описана в литературе [Ge et al., 2003]. Эти миРНК использовали в качестве положительного контроля РНК-интерференции. Также подобрали миРНК (далее негативная миРНК), не имеющую мишеней среди генов человека и ВГА, которую использовали в качестве отрицательного контроля. Схема расположения участков узнавания анти-*PA* и анти-*NP* миРНК в мРНК, кодируемых генами *PA* и *NP* ВГА, представлена на рисунке 1.

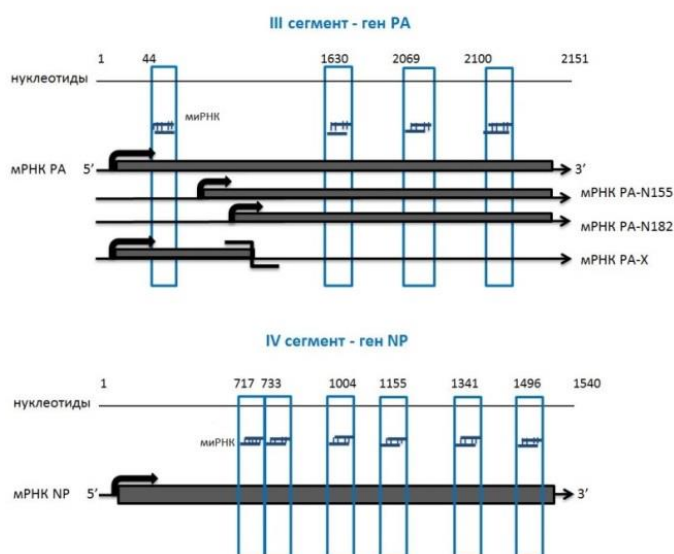


Рисунок 1 – Схематическое изображение местоположения сайтов-мишеней в генах *PA* и *NP* для анти-*PA* и анти-*NP* миРНК.

Стрелками (5'→3') на рисунке изображены мРНК, серыми прямоугольниками – транслируемые белки, жирными стрелками показано начало трансляции.

Для первичного скрининга противовирусной активности выбранных миРНК использовали традиционно применяемый для доставки молекул нуклеиновых кислот в клетки реагент – липофектамин ЛФ-RNAi. Было определено предельно допустимое разведение ЛФ-RNAi, составившее 0,6 мкл на 50 000 клеток. Также было продемонстрировано, что внесение негативной миРНК в диапазоне конечных концентраций 0,1-10 мкМ в комплексе с ЛФ-RNAi вызывает не более 20% гибели клеточного монослоя.

Далее клетки A549 заражали вирусом A/PR/8/34 (H1N1) при 0,01 MOI. Каждый из исследуемых препаратов миРНК в конечной концентрации 0,25 мкМ в комплексе с ЛФ-RNAi вводили в клетки за 4 часа до заражения. В качестве контролей в этих экспериментах использовали негативную миРНК и чистый препарат ЛФ-RNAi. Через 24 часа после инфицирования оценили уровень накопления вирусного белка NP в клетках методом ИФА с моноклональными антителами 6D11 к NP (рисунки 2 и 3). В случае анти-PA миРНК дополнительно определили относительные уровни экспрессии мРНК M1 методом ОТ-qПЦР (рисунок 2).

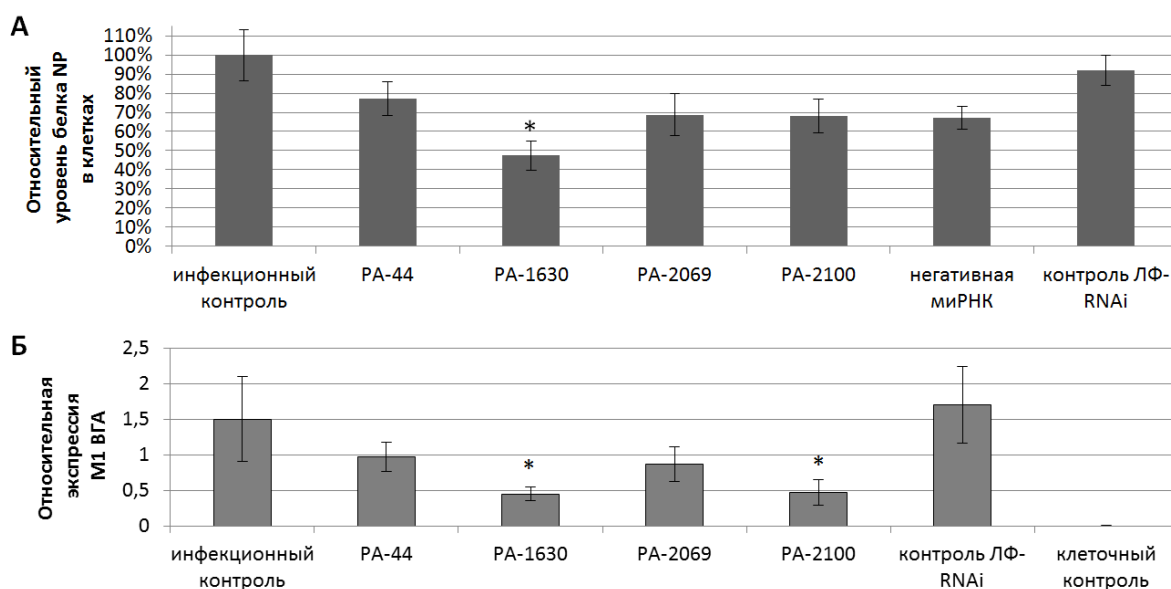


Рисунок 2 – Противовирусная активность анти-PA миРНК в комплексе с ЛФ-RNAi, введенных за 4 часа до заражения клеток A549 вирусом A/PR/8/34 (0,01 MOI).

А – Относительный уровень белка NP ВГА, определенный методом ИФА в фиксированных инфицированных клетках. На диаграмме за 100% принят уровень NP в контрольных инфицированных клетках, показаны стандартные отклонения по 8 повторам (* $p < 0,01$). Б – Относительная экспрессия мРНК M1 в лизатах инфицированных клеток. На диаграмме показаны стандартные отклонения по 3 повторам (* $p < 0,01$)

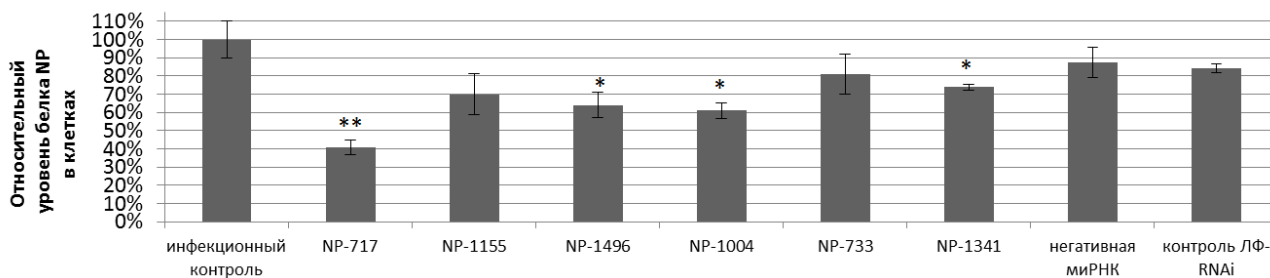


Рисунок 3 – Противовирусная активность анти-NP миРНК в комплексе с ЛФ-RNAi, введенных за 4 часа до заражения клеток A549 вирусом A/PR/8/34 (0,01 MOI).

Относительный уровень белка NP ВГА, определенный методом ИФА в фиксированных инфицированных клетках. На диаграмме за 100% принят уровень NP в контрольных инфицированных клетках, показаны стандартные отклонения по 8 повторам (* $p < 0,05$; ** $p < 0,0001$).

В результате проведенного скрининга были выбраны миРНК PA-1630 и NP-717, обладающие наибольшей противовирусной активностью, которая была сопоставима или превышала таковую для миРНК, ранее описанных в литературе [Timin et al., 2017].

2. Выбор носителей для противовирусных миРНК на основе полиэтиленimina, хитозана и гибридных микрокапсул и оценка эффективности трансфекции миРНК

Далее провели исследование возможности применения следующих биологических агентов для доставки миРНК в клетки: поликатионных молекул: ПЭИ, МГХ, ОЛХ, ГХХ, КХ, а также гибридных микрокапсул (SiO_2 -МК). Липоплексные реагенты ЛФ и ЛФ-RNAi использовали в качестве препаратов сравнения.

В предварительных экспериментах была определена комплексообразующая способность полимерных агентов, а также были охарактеризованы и отобраны для дальнейших исследований комплексы миРНК с ПЭИ, КХ и МГХ (в соотношениях N/P больше 2) [Петрова А.В. и др., 2015; Петрова-Бродская и др., 2017]. Определили максимально допустимые дозы препаратов, образованных поликатионами и миРНК в соотношениях $N/P > 1$, которые вызывают гибель 50% клеток *in vitro*. Они составили 6,5 мкг/мл для ПЭИ, 60 мкг/мл для МГХ и 24,5 мкг/мл для КХ.

Анализ морфологии SiO_2 -МК, синтезированных методом послойного синтеза и состоящих из четырех чередующихся слоёв полиаргинина и декстрана с последним слоем полиаргинина с поверхностной неорганической наноструктурой (SiO_2 – оболочкой), показал, что они являются полыми, имеют округлую форму и диаметр около 2 мкм. Инкапсулированные в SiO_2 -МК миРНК с флуоресцентной меткой ROX (ROX-миРНК) локализуются и эффективно удерживаются внутри капсул. Максимальная ёмкость загрузки миРНК в SiO_2 -МК, определенная с использованием спектрофотометра Nanodrop 2000, составляет 6.4 пмоль/мкл. Такая высокая концентрация миРНК в растворе препарата микрокапсул позволяет доставлять в клетку большее количество миРНК, чем в комплексе с ПЭИ и хитозаном, что особенно важно по причине усиления токсического действия поликатионов при

увеличении количества миРНК. Стоит заметить, что для системы SiO₂-МК невозможно определить токсическое действие на клеточный монослой в зависимости от концентрации вещества носителя (как в случае поликатионной доставки), однако можно охарактеризовать их токсическое действие в зависимости от соотношения количества капсул на одну клетку. Было показано, что внесение пустых и содержащих миРНК SiO₂-МК в соотношении до 50 капсул на 1 клетку (конечная концентрация капсул 3×10^6 капсул/мл) приводит к гибели не более 15% клеточного монослоя. При этом показано, что оптимальное соотношение по захвату клеткой SiO₂-МК и наиболее эффективной трансфекцией лежит в диапазоне от 5 до 20 капсул на клетку. Таким образом, для оптимальной доставки в клетки миРНК в предельно допустимой конечной концентрации 5 мкМ достаточно внесения SiO₂-МК в соотношении 15 капсул на клетку, которое, в свою очередь, не вызывает значительного токсического эффекта. Обработка миРНК в составе SiO₂-МК РНКазой с последующим электрофоретическим разделением в агарозном геле позволили установить, что SiO₂-МК эффективно защищают миРНК от деградации под действием РНКазы. Изучение эффективности захвата SiO₂-МК клетками A549 с использованием конфокальной и электронной микроскопии, а также проточной цитометрии позволило установить, что капсулы локализуются в цитоплазме абсолютного большинства (до 92%) клеток в исследованный интервал времени (4-24 ч). При этом через 24 ч после введения наблюдается частичное освобождение ROX-миРНК из капсул и их диффузное перераспределение по цитоплазме. SiO₂-МК не обладают цитотоксическим действием при концентрации до 10 капсул на клетку.

Далее было проведено сравнительное исследование эффективности внутриклеточной доставки и противовирусной активности *in vitro* миРНК в комплексах с МГХ, КХ, ПЭИ и SiO₂-МК, а также ЛФ. Показано что доставка миРНК, находящихся в комплексах с поликатионами при N/P больше или равным 2, внутрь клетки начинается уже через 5 минут инкубации. При использовании SiO₂-МК показано, что их захват эндосомами происходит в течение первых 15 минут после введения, начало высвобождения миРНК в клетке в процессе разрушения капсул начинается через 4 часа и полностью завершается через 24 часа [Timin et al., 2017]. После 24 ч инкубации клеток A549 с миРНК методом конфокальной микроскопии установили, что эффективность внутриклеточной доставки ROX-миРНК в клетки A549 с помощью SiO₂-МК значительно превосходит эффективность доставки с помощью ПЭИ (на 70%), ЛФ (на 45%), ЛФ-RNAi (на 30%). Средняя интенсивность флуоресценции поглощения ROX-миРНК наблюдалась в следующем порядке: SiO₂-МК > ЛФ-RNAi > ЛФ > ПЭИ > ROX-миРНК без носителя (рисунок 4).

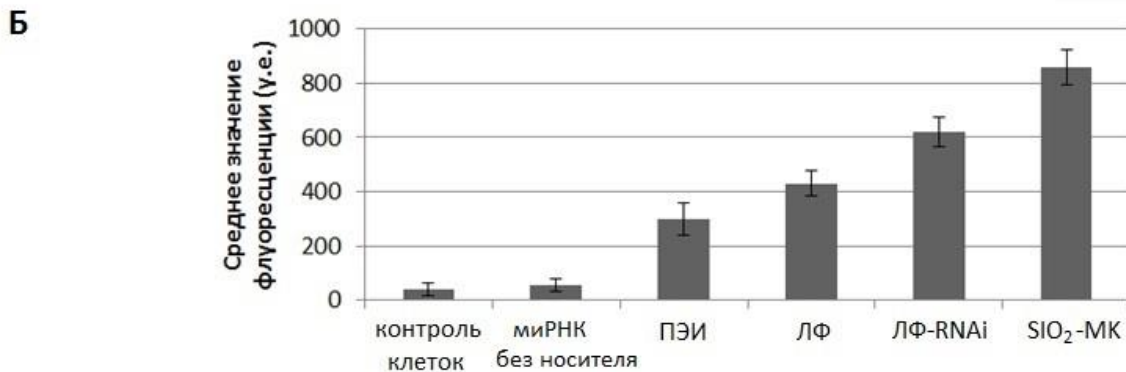
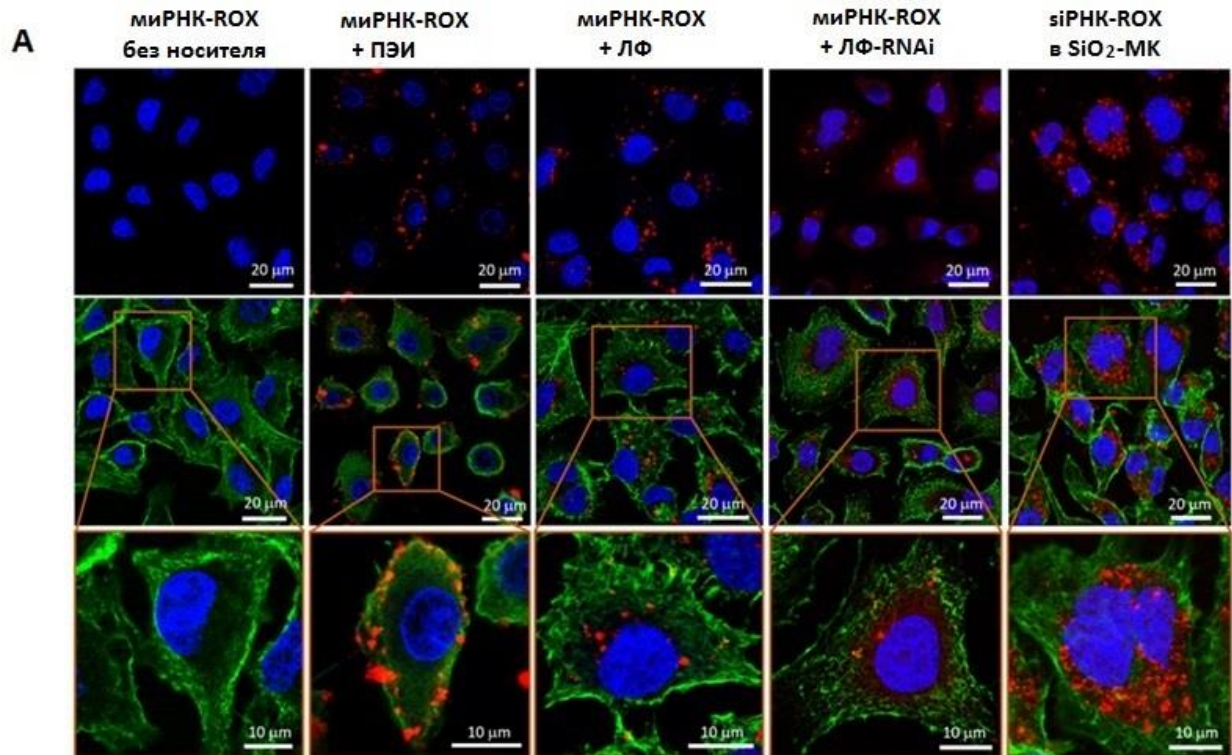


Рисунок 4 – Сравнение эффективности трансфекции миРНК-ROX для различных систем доставки: ПЭИ, ЛФ, ЛФ-RNAi, SiO₂-МК в клетки.

А – Изображения, полученные методом конфокальной микроскопии клеток A549, с предварительной 24 ч. инкубацией комплексов миРНК—ROX с поликатионом, ЛФ, микрокапсулами, а также свободной миРНК (без носителя). Ядра клеток окрашены DAPI (синий), F-актин окрашен AF-488 PL (зеленый), миРНК-ROX (красный).

Б – Средняя интенсивность флуоресценции метки ROX в фиксированных клетках A549 после 24 часа после внесения комплексов миРНК—ROX с различными носителями, определяемая при анализе изображений конфокальной микроскопии

Кроме того, методом ОТ-qПЦР (с использованием набора для амплификации микроРНК) подтвердили присутствие миРНК в клетках. Сравнительная оценка токсичности исследуемых систем доставки продемонстрировала наименьшую токсичность для системы SiO₂-МК (рисунок 5).

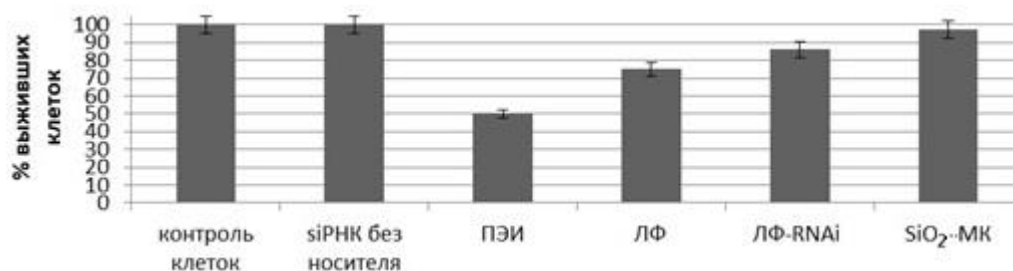


Рисунок 5 – Сравнение цитотоксического действия миРНК-ROX в комплексе с ПЭИ, ЛФ, SiO₂-МК и без носителя после инкубации с клетками A549 в течение 24 ч.

3. Сравнение противовирусной активности миРНК в комплексе с производными хитозана, ПЭИ и SiO₂-МК

Для сравнения противовирусной активности миРНК, доставляемых в клетку с помощью изучаемых носителей, провели оценку ингибирования вирусной репликации методами РГА и ИФА на клеточных культурах A549 и MDCK. Для этого использовали миРНК NP-1496 и PA-1630. Противовирусная активность NP-1496 была показана как максимально эффективная при доставке методом электропорации [Ge et al., 2003], а также при образовании с предшественника в процессе экспрессии плазмидной ДНК (Abrahamyan et al. 2009), то есть без учета вклада системы носителя. миРНК PA-1630 была нами подобрана в процессе выполнения работы. Вирус-ингибирующее действие препаратов миРНК с носителями исследовали для штамма A/PR/8/34 на клетках A549 и MDCK. Доза миРНК во всех случаях была постоянной и составляла 0,125 мкМ.

Независимо от дозы заражения не было выявлено ингибирующего действия комплексов миРНК с МГХ. В то же время для комплексов миРНК с КХ при малых дозах заражения наблюдали достоверное снижение уровня NP в клетках. В случае ПЭИ и ЛФ методом РГА продемонстрировано снижение вирусной репродукции под действием миРНК, однако оно было показано, в том числе, и для неспецифической миРНК. Уровень NP в клетках после воздействия препарата SiO₂-МК с целевой миРНК NP-1496 значительно снижается по сравнению с контролем заражения, однако превышает уровень белка, после воздействия вирусоспецифическим ингибитором нейраминидазы – озельтамивиром. Влияния SiO₂-МК на повышение или понижение уровня инфекции в клетках и культуральной жидкости не выявлено. Относительное вирус-ингибирующее действие препарата инкапсулированных миРНК превосходит эффект препаратов миРНК с поликатионами и ЛФ (рисунок 6-7). Полученные результаты свидетельствуют, что SiO₂-МК являются наиболее оптимальным и эффективным из всех исследуемых способов доставки противовирусных миРНК. Поэтому для проведения дальнейших экспериментов по разработке противовирусного препарата на основе синтетических миРНК использовали SiO₂-МК.

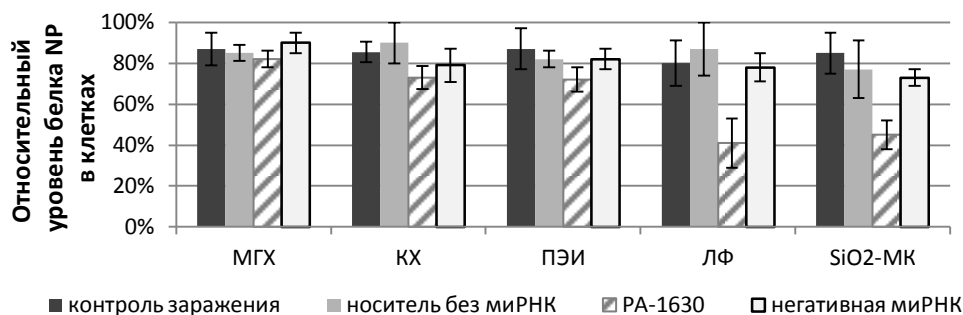


Рисунок 6 – Противовирусная активность миРНК PA-1630 в комплексе с МГХ, КХ, ПЭИ, ЛФ-RNAi и SiO₂-МК, введенной за 24 часа до заражения клеток A549 вирусом A/PR/8/34 (0,01 MOI). Относительный уровень белка NP ВГА, определенный методом ИФА в фиксированных инфицированных клетках. На диаграмме за 100% принят уровень максимального значения среди всех групп, показаны стандартные отклонения по 8 повторам ($p < 0,05$).

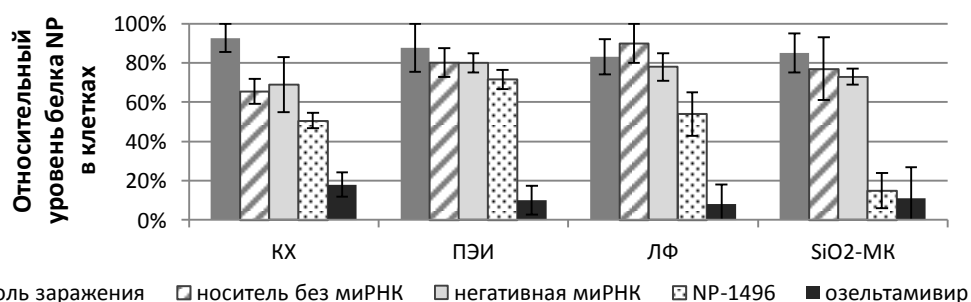


Рисунок 7 – Противовирусная активность миРНК NP-1496 в комплексе с КХ, ПЭИ, ЛФ-RNAi и SiO₂-МК, введенной за 24 часа до заражения клеток A549 вирусом A/PR/8/34 (0,01 MOI). Относительный уровень белка NP ВГА, определенный методом ИФА в фиксированных инфицированных клетках. На диаграмме за 100% принят уровень максимального значения среди всех групп; показаны стандартные отклонения по 8 повторам ($p < 0,05$).

4. Оценка противовирусного действия композиции миРНК, инкапсулированных в SiO₂-МК

Далее для препаратов инкапсулированной миРНК было проведено исследование дозовой зависимости эффективности подавления экспрессии гена *NP* и вирус-ингибирующей способности на клеточных культурах MDCK и A549. Для обеих клеточных линий, трансфицированных анти-NP миРНК (NP-1496 и подобранными в п.1 NP-717 и NP-1155) в диапазоне концентраций 0,1–10 мкМ за 24 часа до заражения штаммом A/PR/8/34 (0,01 MOI), была обнаружена тенденция к снижению титра вторичного потомства вируса по РГА и уровня NP в клетках под воздействием инкапсулированной миРНК [Timin et al., 2017]. Был продемонстрирован дозозависимый эффект снижения уровня экспрессии NP в клетках под действием миРНК (рисунок 8).

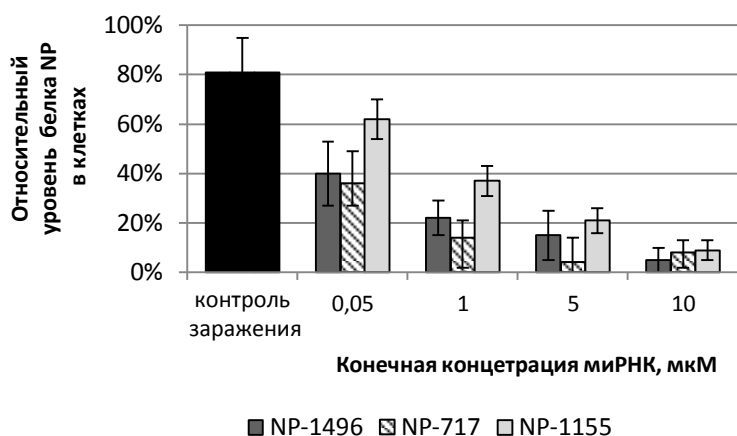


Рисунок 8 – Противовирусная активность анти-NP миРНК инкапсулированных в SiO₂-МК, введенных за 24 часа до заражения клеток A549 вирусом A/PR/8/34 (0,01 MOI). Относительный уровень белка NP ВГА, определенный методом ИФА в фиксированных инфицированных клетках. На диаграмме за 100% принят уровень NP в контрольных инфицированных клетках, показаны стандартные отклонения по 8 повторам ($p < 0,001$)

Также было исследовано вирус-ингибирующее действие инкапсулированных миРНК при их введении одновременно с заражением клеток. В этом случае для пустых SiO₂-МК наблюдалось повышение уровня белка NP в инфицированных клетках по сравнению с контрольными. Под воздействием SiO₂-МК, содержащих миРНК, через 72 часа после заражения наблюдалось снижение уровня NP в клетках по сравнению с пустыми SiO₂-МК, однако этого было недостаточно, чтобы говорить о противовирусном действии (рисунок 9).

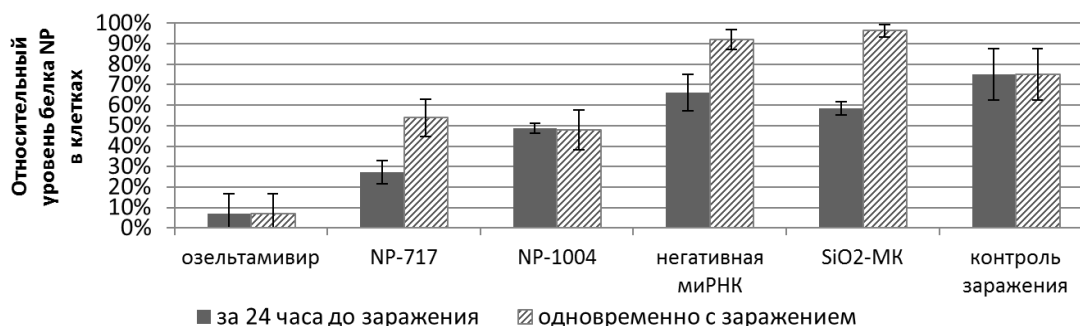


Рисунок 9 – Противовирусная активность анти-NP миРНК, инкапсулированных в SiO₂-МК, введенных за 24 часа и одновременно с заражением клеток A549 вирусом A/PR/8/34 (0,01 MOI). Относительный уровень белка NP ВГА, определенный методом ИФА в фиксированных инфицированных клетках. На диаграмме за 100% принят уровень NP в контрольных инфицированных клетках, показаны стандартные отклонения по 8 повторам ($p < 0,05$).

Высокая ёмкость загрузки SiO₂-МК позволяет проводить инкапсуляцию *in situ* одновременно нескольких разных миРНК. Эта возможность была использована нами в экспериментах по одновременной загрузке в SiO₂-МК ранее отобранных миРНК PA-1630 и NP-717. Было проведено сравнение ингибирования репродукции вируса A/PR/8/34 в клетках A549 при использовании коктейля противовирусных миРНК и при воздействии отдельных миРНК. В состав коктейля вошли три миРНК PA-1630, NP-717 и NS-777, направленные на подавление экспрессии генов PA, NP и NS ВГА,

соответственно. NS-777 была ранее подобрана и охарактеризована в Отделе молекулярной биологии вирусов ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России [данные в печати]. Концентрация каждой миРНК в препаратах составила 1 мкМ. Для синтеза SiO₂-МК, содержащих комбинацию трех миРНК, использовали эквимольное количество каждой миРНК. Конечная концентрация для смеси миРНК составила 6 пмоль/мкл, такую же концентрацию использовали для приготовления SiO₂-МК, содержащих одиночные миРНК. В качестве препарата сравнения был использован озельтамивир в концентрации 15 мкг/мкл.

Установлено, что при введении препарата за 24 часа до заражения на третьи сутки (72 часа) после инфицирования клеток уровень NP по данным ИФА достоверно снижался для каждой из использованных противовирусных миРНК. При этом комбинация трех миРНК обладает существенно большей эффективностью, превосходя, в том числе, действие озельтамивира (рисунок 10). Аналогичные результаты были получены при использовании метода ПЦР в режиме реального времени для определения уровня мРНК М1 ВГА (рисунок 8).

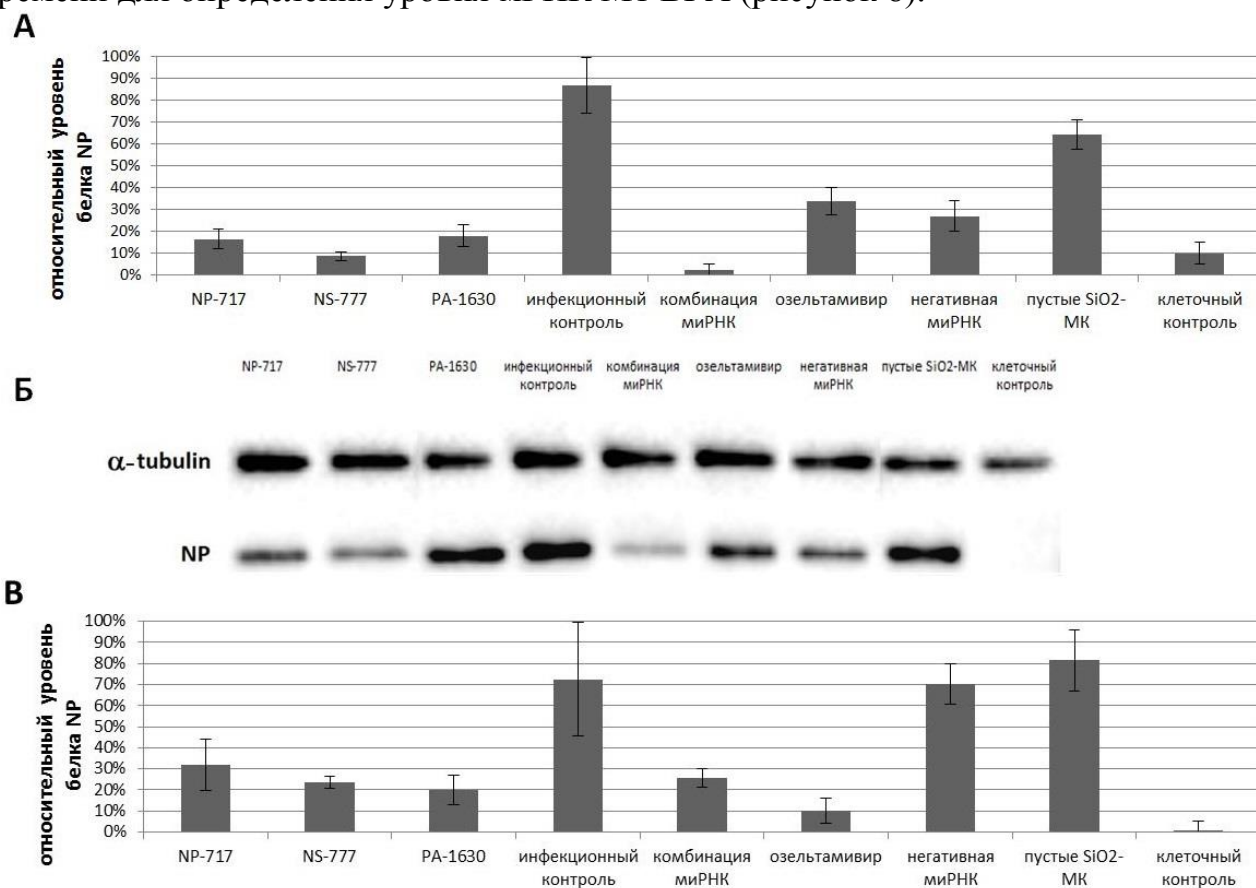


Рисунок 10 – Сравнение противовирусной активности комбинации из трех и одиночных миРНК, инкапсулированных в SiO₂-МК, при введении в клетки A549 за 24 часа до заражения вирусом A/PR/8/34 (0,01 MOI). А – Относительный уровень белка NP ВГА, определенный методом ИФА в фиксированных инфицированных клетках. На диаграмме за 100% принят уровень NP в контрольных инфицированных клетках, показаны стандартные отклонения по 8 повторам ($p < 0,01$). Б – Вестерн-блот клеточных лизатов, нормированный на белок альфа-тубулин. В- Относительный уровень белка NP ВГА, определенный методом ИФА в ВКЖ от инфицированных клеток. На диаграмме за 100% принят уровень NP в ВКЖ контроля заражения, показаны стандартные отклонения по 8 повторам ($p < 0,001$)

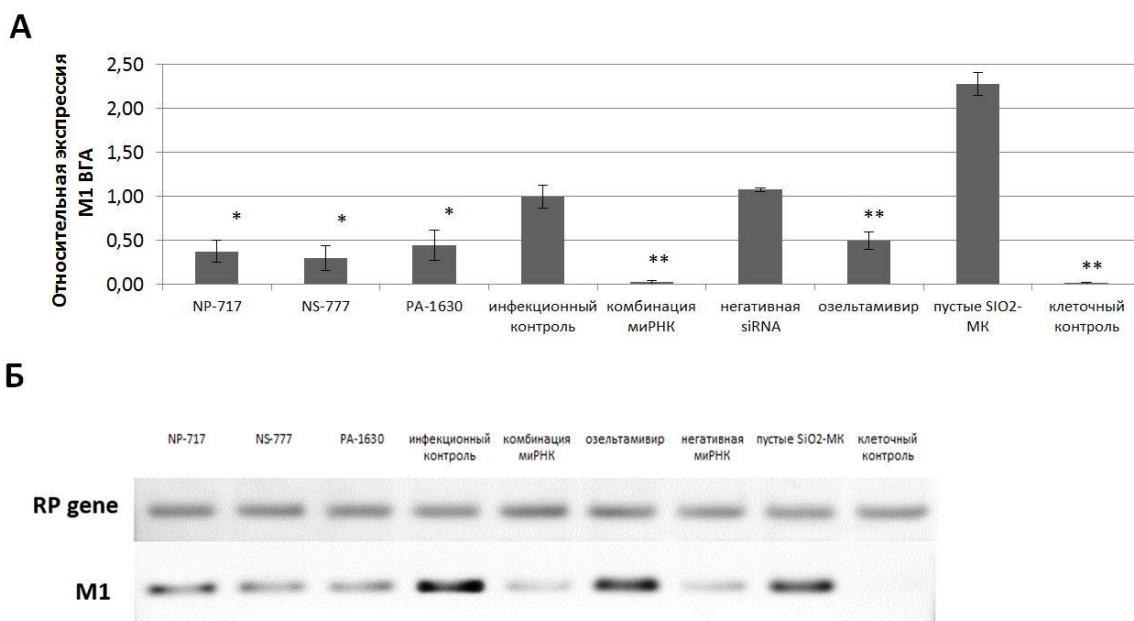


Рисунок 11 – Сравнение противовирусной активности комбинации из трех и одиночных миРНК, инкапсулированных в SiO₂-МК, при введении в клетки A549 за 24 часа до заражения вирусом A/PR/8/34 (0,01 MOI). Относительная экспрессия мРНК М1 в лизатах инфицированных клеток. На диаграмме показаны стандартные отклонения по 3 повторам (* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$). В-Электрофоретическое разделение в 1% агарозном геле, с окрашиванием EtBr ПЦР продуктов амплификации генов М1 и RP, для наглядной демонстрации снижения уровня экспрессии гена М1

Поскольку подобранные нами миРНК направлены на наиболее консервативные участки генов, предположительно они должны обладать противовирусной активностью в отношении ВГА разных подтипов. Была исследована эффективность ингибирования репликации вирусов A/PR/8/34 (H1N1), A/California/7/09 (H1N1_{pdm09}), A/Aichi/2/68 (H3N2), A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2), A/Anhui/1/13 (H7N9) и B/Malaysia/2506/2004 с помощью комбинации из трёх инкапсулированных миРНК. Предварительное введение (за 24 часа до заражения) в клетки коктейля миРНК вызывает специфический противовирусный эффект для ВГА подтипов H1N1, H1N1_{pdm09}, H5N2 и H7N9, приводя к снижению титра вирусного потомства на 2-4 lgТЦД₅₀/мл (таблица 1). Отсутствие ингибирования репродукции вируса B/Malaysia/2506/2004 объясняется тем, что он относится к вирусам гриппа другого типа и имеет большое количество нуклеотидных замен в участках узнавания миРНК в соответствующих генах. Отсутствие противовирусной активности в отношении вируса A/Aichi/2/68 (H3N2), вероятно, также можно объяснить низкой комплементарностью центральной части миРНК (с 5 по 12 нуклеотид с 5'-конца) и мишенной последовательности целевых генов. Тем не менее, эти рассуждения носят скорее предположительный характер, т.к. детали молекулярного взаимодействия генного сайленсинга при РНК-интерференции, их временная последовательность и причинно-следственные связи остаются не до конца выясненными в настоящее время [Filipowicz, Sonenberg, 2015].

Таблица 1 – Противовирусное действие инкапсулированных миРНК при заражении вирусами гриппа А разных подтипов и вирусом гриппа В на клеточной культуре MDCK.

Штамм вируса гриппа	контроль заражения	NP-717	комбинация миРНК	негативная миРНК
A/PR/8/34 (H1N1)	3,25 ± 0,35	1,5 ± 0,7	0 ± 0,5*	3,25 ± 0,35
A/California/7/09 (H1N1 _{pdm09})	7,25 ± 0,35	4 ± 0	3,5 ± 0,7*	5,5 ± 0
A/Aichi/2/68 (H3N2)	3,72 ± 0,25	2,8 ± 0,3	4 ± 0,5	3,5 ± 0
A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2)	6 ± 0	5,5 ± 0	4,3 ± 0,4*	6,5 ± 0
A/Anhui/1/2013 (H7N9)	7,5 ± 0	5,8 ± 0,6	5,7 ± 0,3*	6,83 ± 0,58
B/Malaysia/2506/2004	7,17 ± 1,15	5,9 ± 0,5	5,5 ± 0	5,5 ± 0

Результаты титрования вирусного потомства для образцов инфекционного контроля, негативной миРНК, комбинации из трех миРНК (РА-1630, NP-717 и NS-777) и одиночной миРНК NP-717, выраженные как lg ТЦД₅₀/мл.

*значения статистически достоверно ($p < 0,05$, Критерий Манна-Уитни) отличаются от значений контролей заражения

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведено исследование противовирусного действия препаратов миРНК, направленных на подавление экспрессии генов ВГА, с использованием различных систем невирусной доставки *in vitro*.

Подобраны уникальные миРНК, направленные на консервативные области генов РА и NP ВГА человека, кодирующих ключевые компоненты вирусного РНК комплекса, абсолютно необходимого для развития вирусной инфекции. Проведен первичный *in vitro* скрининг противовирусной активности этих миРНК, доставляемых внутрь клетки с помощью ЛФ, в результате которого выбрали миРНК РА-1630 и NP-717, как наиболее перспективные для терапевтического применения. Их ингибирующая вирусную репликацию активность была на уровне или превышала таковую для некоторых миРНК, ранее описанных в литературе.

Проведено сравнительное исследование эффективности внутриклеточной доставки миРНК и проявляемой ею противовирусной активности *in vitro* в комплексе с поликатионами ПЭИ и производными хитозана, а также ЛФ и SiO₂-МК. Продемонстрировано что эффективность внутриклеточной доставки ROX-миРНК в клетки A549 с помощью SiO₂-МК значительно превосходит эффективность доставки с помощью ПЭИ (на 70%), ЛФ (на 45%), ЛФ-RNAi (на 30%).

Был продемонстрирован противовирусный потенциал миРНК, инкапсулированной в SiO₂-МК в качестве прототипа препарата на основе РНК-интерференции, представляющего собой одиночные миРНК (РА-1630, NP-717 и NS-777) и комбинацию из них. Показано что комбинированный сайленсинг трёх вирусных генов обладает существенно большей эффективностью, превосходя, в том

числе, действие озельтамивира. Также было проведено исследование противовирусного действия разработанного препарата миРНК *in vitro* в отношении различных штаммов ВГА нескольких подтипов и вируса гриппа В. Применение комбинации из трёх миРНК, инкапсулированных в SiO₂-МК, *in vitro* вызывает противовирусный эффект для ВГА нескольких подтипов: А/PR/8/34 (H1N1), А/California/7/09 (H1N1_{pdm09}), А/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2), А/Anhui/1/13 (H7N9), приводя к снижению титра вирусного потомства на 2-4 lgТЦД₅₀/мл.

Таким образом, предлагаемая нами система для миРНК-опосредованного ингибирования репродукции вируса гриппа *in vitro*, основанная на гибридных микроносителях, содержащих коктейль из миРНК к консервативным областям трёх вирусных генов, является действенным и универсальным антивирусным инструментом, обладающим низкой токсичностью и высокой эффективностью доставки миРНК в целевые клетки.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны уникальные миРНК PA-1630 и NP-717, направленные на подавление экспрессии генов PA и NP ВГА, обладающие противовирусной активностью в отношении вируса А/PR/8/34 (H1N1).

2. Гибридные SiO₂-МК обеспечивают наиболее эффективную внутриклеточную доставку миРНК и их противовирусную активность в отношении вируса А/PR/8/34 (H1N1) *in vitro* по сравнению с полиэтиленимином, производными хитозана и липофектаминоном.

3. Гибридные SiO₂-МК обеспечивают защиту инкапсулированных миРНК от действия РНКаз и их полное высвобождение в цитоплазму клеток через 24 часа после введения, обладая минимальным цитотоксическим действием.

4. Препараты анти-NP миРНК, инкапсулированных в гибридные SiO₂-МК, обеспечивают дозозависимое снижение экспрессии гена NP и общее подавление репродукции ВГА при введении за 24 часа до инфицирования клеток.

5. Комбинация из трёх инкапсулированных в гибридные SiO₂-МК миРНК, направленных на подавление экспрессии генов NP, PA и NS, при введении за 24 часа до заражения оказывает специфический противовирусный эффект *in vitro*, превышающий действие соответствующих отдельных миРНК и озельтамивира. Данная композиция миРНК приводит к снижению титра вирусного потомства на 2-4 lgТЦД₅₀/мл для ВГА подтипов H1N1, H1N1_{pdm09}, H5N2 и H7N9.

Список опубликованных работ по теме диссертации в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Timin, A.S., Muslimov, A.R., Petrova A.V., Lepik K.V, Okilova M.V., Vasin A.V., Afanasyev A.V., Sukhorukov G.B. Hybrid inorganic-organic capsules for efficient intracellular delivery of novel siRNAs against influenza A (H1N1) virus infection. // Scientific Reports. – 2017. – №7. – с. 102.

2. Горшков А.Н., Петрова А.В., Васин А.В. РНК-интерференция и патогенез вируса гриппа. // Цитология. – 2017. – Т. 59, № 8. – с: 515-533.

3. Петрова-Бродская А.В., Бондаренко А.Б., Тимин А.С., Плотникова М.А., Афанасьев М.В., Семенова А.А., Лебедев К.И., Горшков А.Н., Горшкова М.Ю., Егоров В.В., Клотченко С.А., Васин А.В. Сравнение эффективностей ингибирования вируса гриппа А *in vitro* комплексами малых интерферирующих РНК с производными хитозана, полиэтиленимином и гибридными микрокапсулами на основе полиаргинина с неорганическими компонентами. // Вопросы вирусологии. – 2017 – Т. 62, № 6. – с: 259-265.

4. Muslimov A.R., Timin A.S., Petrova A.V., Epifanovskaya O.S., Shakirova A.I., Lepik K.V., Gorshkov A., Il'inskaja E.V., Vasin A.V., Afanasyev B.V., Fehse B., Sukhorukov G.B. Mesenchymal Stem Cells Engineering: Microcapsules-Assisted Gene Transfection and Magnetic Cell Separation. //ACS Biomaterials Science. – 2017. – Т.3, №10. – с: 2314–2324

5. Brodskaja A.V., Timin, A.S., Gorshkov A.N., Muslimov A.R., Bondarenko A.B., Tarakanchikova Y.V., Zabrodskaya Y.A., Baranovskaia I.L., Il'inskaja I.V., Sukhorukov G.B., Vasin A.V. Inhibition of Influenza A virus by mixed siRNAs, targeting the PA, NP, and NS genes, delivered by hybrid microcarriers. // Antiviral Research. – 2018 (принято к печати)

Статьи в других изданиях:

1. Петрова А.В., Горшков А.Н., Егоров В.В., Бондаренко А.Б., Шурыгина А.П.С., Грудина Н.А., Васин А.В. Оценка трансфекционной способности производных хитозана в качестве носителей для доставки коротких интерферирующих РНК. // Естественные и математические науки в современном мире. – 2015. – № 36-37. – с: 142-148.

2. I Unksov, A. Slita, A. Petrova, I. Pereviazko, V. Bakulev, V. Rolich, A. Bondarenko, N. A. Kasyanenko. Vectors for the delivery of siRNA and DNA. // European Biophysical Journal. – 2015. – № 44 (Suppl 1). – с: 240

3. Petrova, AV; Bondarenko, A; Timin, A; Afanasev, M; Sukhorukov, G; Vasin, A. Comparison of different strategies for siRNA delivery against influenza A virus. // FEBS JOURNAL. – 2017. – № 284 (P.2.2-017). – с: 170.

Тезисы:

1. Бондаренко А.Б., Бушманова Е.Л., Петрова А.В. Полиплексы производных хитозана, как невирусные векторы доставки коротких интерферирующих РНК, направленных на подавление репликации вируса гриппа А // Молодежный научный форум: Естественные и медицинские науки: электр. сб. ст. по мат. XXVIII междунар. студ. науч.-практ. конф. № 9 (27). – 2015

2. Петрова А.В., Тимин А.С., Муслимов А.Р., Васин А.В. Сравнительное исследование липосомальной, полиплексной и микрокапсульной внутриклеточной доставки противовирусных коротких интерферирующих РНК для терапии вируса гриппа А. // Сборник тезисов «XVIII Зимней молодежной школы по биофизике и молекулярной биологии» 11–16 марта 2017 г.,– Гатчина.– с. 113-114

3. Бондаренко А.Б., Афанасьев М.В., Петрова А.В., Горшков А.Н. Использование модифицированного хитозана, содержащего четвертичные аминогруппы, для невирусной доставки генетических конструкций. // Сборник тезисов «XVIII Зимней

молодежной школы по биофизике и молекулярной биологии» 11–16 марта 2017 г., – Гатчина. – с. 77.

4. Timin A., Petrova-Brodskaya A., Muslimov A., Lepik K., Vasin A., Sukharukov G. New strategies for effective delivery of antiviral siRNA against influenza A virus. // International conference “Trends in Influenza Research” September 18-20, 2017. – Saint-Petersburg. – Abstract book, –p. 89-90

5. Bondarenko A., Petrova-Brodskaya A., Timin A., Muslimov A., Semenova A., Afanasiev M., Gorshkov A., Vasin A. Antiviral activity of small interfering RNAs. // International conference “Trends in Influenza Research” September 18-20, 2017. – Saint-Petersburg. – Abstract book, –p. 123-124

6. Т. Карпов, А. Пельтек, И. Сергеев, А. Muslimov, А. Petrova-Brodskaya, И. Илинская, А. Vasin, А. Timin, G. Sukharukov. Hybrid micro containers for highly efficient delivery of small interfering RNA. // 3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry, September 28 – October 03, 2017, Kazan. – Abstract book. – p. 143

7. Пельтек А.А., Петрова А.В., Муслимов А.Р., Тимин А.С., Васин А.В. Доставка коротких интерферирующих РНК в клетку посредством гибридных микрокапсул. // Конференция с международным участием XLVI «НЕДЕЛЯ НАУКИ СПбПУ», 13-19 ноября, 2017 г. – сборник материалов ИФНиТ, – с. 492-495

Список сокращений и условных обозначений

ВГА – вирус гриппа типа А

миРНК – малая интерферирующая РНК (англ. вар. siRNA)

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ПЭИ – полиэтиленимин

ЛФ – липофектамин

ЛФ-RNAi –Lipofectamine RNAiMAX®

МГХ – метилгликоль хитозан

КХ – кватернизованный хитозан

МОИ «multiplicity of infection» – множественность инфекции

ИФА – иммуноферментный анализ

ОТ-qПЦР – обратная транскрипция с полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю и глубокую благодарность своему научному руководителю к.б.н. Васину Андрею Владимировичу за помощь и поддержку на всех этапах работы. Автор особо признателен к.физ-мат.н. Сухорукову Глебу Борисовичу, а также к.х.н. Тимину Александру Сергеевичу и Муслимову Альберту Радиковичу за неоценимую помощь в работе с микрокапсулами, оказанную в ходе выполнения диссертационного исследования. Автор искренне благодарен к.б.н. Горшкову Андрею Николаевичу за всестороннюю помощь и поддержку при выполнении и написании работы.