



УДК 577.2+577.29

## ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ ПРОТИВ ВИРУСОВ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА

© 2023 г. А. С. Левина\*, #, М. Н. Репкова\*, В. Ф. Зарыгова\*

\*Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Сибирское отделение РАН, Россия, 630090 Новосибирск, просп. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 16.02.2023 г.

После доработки 26.02.2023 г.

Принята к публикации 27.02.2023 г.

Вирус простого герпеса (ВПГ) вызывает широкий спектр заболеваний, начиная от относительно легких первичных поражений кожи и заканчивая тяжелыми и часто смертельными эпизодами энцефалита. В настоящее время наиболее эффективными лекарствами для людей, инфицированных ВПГ, являются аналоги нуклеозидов (например, ацикловир), нацеленные на ферменты, кодируемые вирусной ДНК. Эффективность аналогов нуклеозидов снижается из-за плохой растворимости в воде, быстрого внутриклеточного катаболизма, высокой клеточной токсичности и появления устойчивых вирусных штаммов. Антисмысловая технология, в которой используются терапевтические нуклеиновые кислоты (антисмысловые олигонуклеотиды, их производные и аналоги, а также siРНК), представляется перспективной альтернативой противовирусной терапии из-за высокого сродства этих агентов к нуклеиновым кислотам-мишеням, их высокой растворимости в воде и меньшей цитотоксичности. В последнее десятилетие антисмысловые олигонуклеотиды были исследованы в качестве потенциальных лекарств от различных заболеваний, связанных с “вредными” нуклеиновыми кислотами. Олигонуклеотиды с разными химическими модификациями, нацеленные на конкретные участки генома ВПГ, эффективно подавляли вирус. Агенты на основе siРНК продемонстрировали пролонгированное и эффективное (до 99%) ингибирование репликации ВПГ. На основании публикаций за последние 30 лет, рассмотренных в обзоре, можно сделать вывод о перспективности использования терапевтических нуклеиновых кислот для борьбы с герпес-вирусными инфекциями.

*Ключевые слова:* нуклеозидные аналоги, антисмысловые олигонуклеотиды, siРНК, ВПГ-1, ВПГ-2

DOI: 10.31857/S013234232306009X, EDN: EXWSNV

### СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	591
ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА ПЕРВОГО И ВТОРОГО ТИПОВ .....	592
НУКЛЕОЗИДНЫЕ И НУКЛЕОТИДНЫЕ АНАЛОГИ КАК АГЕНТЫ ПРОТИВ ВИРУСОВ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА .....	594
АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ КАК ПРОТИВОВИРУСНЫЕ АГЕНТЫ.....	596

АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ПРОТИВ ВИРУСОВ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА ..	597
<i>Антисмысловые олигонуклеотиды против ВПГ-1 .....</i>	598
<i>Антисмысловые олигонуклеотиды против ВПГ-2 .....</i>	602
МАЛЫЕ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ РНК (siРНК) ПРОТИВ ВИРУСОВ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА .....	603
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	605
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	607

### ВВЕДЕНИЕ

Вирус простого герпеса (ВПГ) вызывает различные заболевания, начиная от относительно легких первичных поражений кожи, слизистых оболочек и эпителия роговицы до тяжелых и часто смертельных эпизодов энцефалита [1] или глазного герпетического кератита, который может привести к серьезному рубцеванию роговицы и слепоте [2].

Сокращения: АО – антисмысловые олигонуклеотиды; ВПГ – вирус простого герпеса; ВПГ-1 – вирус простого герпеса первого типа; ВПГ-2 – вирус простого герпеса второго типа; НК – нуклеиновые кислоты; АСВ – ацикловир; Ага-А – 9-(β-D-арабинофуранозил)аденин; CDV – цидофовир; FamCV – фамцикловир; FIAC – 1-(2'-дезоксиси-2'-[<sup>18</sup>F]фтор-β-D-арабинофуранозил)-5-иодоцитозин; IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> – концентрация агента для ингибирования процесса на 50 и 90% соответственно; siРНК – короткие интерферирующие РНК; shРНК – шпилечные РНК; VaCV – валацикловир.

# Автор для связи: (тел.: +7 (913) 756-76-93; эл. почта: asl1032@yandex.ru).

ВПГ обладает низкой видовой специфичностью и может одинаково заражать человека и других животных [3]. Вирус герпеса вызывает различные патологии у человека: герпес-вирусную инфекцию плода и новорожденных, инфекции центральной нервной системы и генитальный герпес. Герпетические заболевания особенно тяжело протекают у людей с ослабленным иммунитетом. Таким образом, ВПГ ассоциирован с очень широким патологическим спектром и оказывает значительное воздействие на общественное здоровье.

Распространенность герпес-вирусных инфекций очень высока. По оценкам, 80–90% людей старше 40 лет инфицированы этими вирусами. Эти вирусы неустойчивы в условиях внешней среды, при комнатной температуре сохраняются не более 24 ч; подвержены действию органических растворителей и хлорсодержащих соединений. Способы распространения вирусов простого герпеса чаще всего требуют прямых контактов (через слюну, кровь, слизистые оболочки или др.).

Основные факты, касающиеся вирусов простого герпеса (по данным ВОЗ, 2017 [4]):

- ВПГ, или герпес, бывает двух видов: вирус простого герпеса первого типа (ВПГ-1) и вирус простого герпеса второго типа (ВПГ-2);

- ВПГ-1 передается главным образом через оральный контакт и вызывает оральный герпес (симптомы которого могут проявляться в виде “простуды на губах”), но также может вызывать и генитальный герпес;

- ВПГ-2 относится к инфекциям, передаваемым половым путем, и вызывает генитальный герпес;

- обе формы, ВПГ-1 и ВПГ-2, вызывают пожизненное инфицирование;

- по оценкам, во всем мире вирусом ВПГ-1 инфицированы ~3.7 млрд человек в возрасте до 50 лет (67% населения);

- предполагается, что во всем мире вирусом ВПГ-2 инфицированы ~417 млн человек в возрасте 15–49 лет (11%);

- симптомы герпеса включают болезненные пузырьки или язвы в инфицированной зоне;

- герпетическая инфекция наиболее контагиозна в период наличия симптомов, но может передаваться и в их отсутствие;

- заражение ВПГ-2 увеличивает риск заражения и передачи ВИЧ.

Высокая распространенность вирусов герпеса в человеческой популяции во многом обусловлена их способностью переходить в латентную фазу после продуктивной (литической) фазы инфекции [5]. Латентная инфекция влечет за собой подавление репликации вируса, поддержание вирусного генома в спящем состоянии в инфициро-

ванных клетках и способность к реактивации. Цикл латентности—реактивации позволяет вирусу неопределенно долго находиться внутри организма хозяина с возможностью размножения всякий раз, когда ситуация выгодна вирусу.

Борьба с герпес-вирусными инфекциями — актуальная проблема здравоохранения. Ни одна вакцина еще не была одобрена для лечения и профилактики ВПГ-инфекций. В настоящее время наиболее эффективными лекарствами для людей, инфицированных ВПГ, являются аналоги нуклеозидов, нацеленные на кодируемые вирусом ферменты. Однако эффективность таких препаратов снижается главным образом из-за появления резистентных вирусных штаммов. Антисмысловая технология, в которой используются терапевтические нуклеиновые кислоты (антисмысловые олигонуклеотиды, их производные и аналоги, а также короткие интерферирующие РНК — siРНК), представляется перспективной альтернативой противовирусной терапии из-за высокого сродства этих агентов к нуклеиновым кислотам-мишеням, их высокой растворимости в воде и меньшей цитотоксичности. Следует иметь в виду, что современные противогерпесные препараты подавляют репликацию ВПГ в литической фазе. Молекулярные механизмы, контролирующие переход из литической в латентную фазу и обратно, требуют специального исследования для создания новых терапевтических средств, нацеленных на латентную инфекцию.

Данный обзор посвящен использованию терапевтических нуклеиновых кислот (антисмысловых олигонуклеотидов, их производных и аналогов, а также siРНК) как агентов против ВПГ-1 и ВПГ-2. В дополнение кратко рассмотрены работы, касающиеся использования нуклеозидных и нуклеотидных аналогов в качестве препаратов для борьбы с герпесными инфекциями.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА ПЕРВОГО И ВТОРОГО ТИПОВ

Вирус простого герпеса первого типа (ВПГ-1, Human alphaherpesvirus 1) вызывает у человека оральный герпес, а вирус простого герпеса второго типа (ВПГ-2, Human alphaherpesvirus 2) — генитальный герпес. Эти вирусы нейротрофные и нейроинвазивные, т.е. после заражения могут мигрировать в нервную систему. Они вызывают специфические иммунологические реакции и характеризуются значительными вариациями в последовательности их геномов. ВПГ-2 особенно опасен для людей с ослабленной иммунной системой (например, для ВИЧ-инфицированных), а также для тех, кто недавно перенес операцию по трансплантации органов.

Как оральный, так и генитальный герпес, как правило, протекают бессимптомно, но иногда могут вызывать появление болезненных волдырей или язв в месте заражения. Раз появившись, вирусы остаются в организме в латентной форме на всю жизнь, а симптомы болезни могут проявиться через много лет. Существующие препараты могут уменьшить тяжесть и частоту симптомов, но не устраняют инфекцию.

ВПГ-1 и ВПГ-2 обычно проникают в организм через кожу или слизистую оболочку и могут привести к локальному поражению в месте заражения. Вирус проникает в тройничные или крестцовые ганглии, где может переходить в латентное состояние. Любые причины, приводящие к иммуносупрессии, обуславливают обострение вирусного заболевания, при этом реактивированный вирус распространяется из ганглиев в нижние слои эпидермиса. Исторически сложилось так, что ВПГ-1, персистирующий в тройничных ганглиях, считался причиной рецидива герпеса на губах, в то время как ВПГ-2 в крестцовых ганглиях вызывал рецидивирующий генитальный герпес. Однако ВПГ-2 также может вызывать оролабиальный герпес; новые данные показывают, что на ВПГ-1 приходится до 50% новых случаев генитального герпеса.

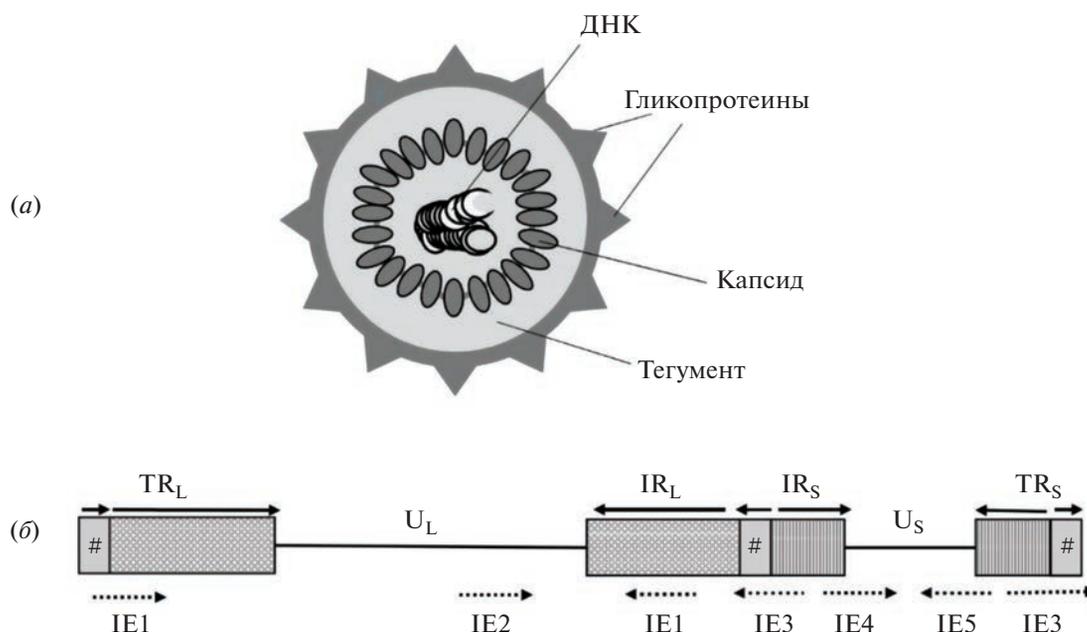
Как и все герпесвирусы, ВПГ имеет две фазы жизнедеятельности: литическую и латентную [6]. Во время литической фазы ВПГ продуцирует инфекционные вирусные частицы для заражения других клеток и организмов, в то время как во время латентной фазы наблюдается ограниченная экспрессия генов и отсутствие инфекционных вирусных частиц. ВПГ может находиться в латентном состоянии в нейронах и способен вызывать заболевание как во время первичной инфекции, так и при реактивации. Механизмы, приводящие к латентности и реактивации, которые обуславливаются вирусными факторами и факторами хозяина, до конца не ясны.

Вирусы простого герпеса – часть большого семейства двухцепочечных ДНК-вирусов с характерной архитектурой вириона. Вирусная частица состоит из нескольких компонентов (рис. 1а). Линейная геномная двухцепочечная ДНК плотно упакована внутри икосаэдрического капсида, который состоит из поверхностных капсомеров (всего 161) и имеет диаметр ~115–130 нм; 150 капсомеров в основном состоят из шести молекул одного вида белка, а 11 капсомеров представляют собой пентамеры того же белка. Капсид окружает сложный белковый слой, тегумент, состоящий из нескольких видов белков. Этот слой, в свою очередь, ограничен самым внешним элементом, оболочкой из липидного бислоя со встроенными молекулами белка (обычно гликозилированными), что дает общий диаметр вирусной частицы ~200 нм.

Геном ВПГ содержит ~150000 п.н., образующих, по крайней мере, 74 гена. В грубом приближении белок-кодирующие гены распределяются с общей плотностью одного гена на 1500–2000 нт. Они транскрибируются РНК-полимеразой хозяина [7]. Вирусная ДНК содержит области уникальных последовательностей, обрамленные прямыми или инвертированными повторами (рис. 1б) [8].

Вирус попадает в клетку после слияния вирусной оболочки и клеточной мембраны. ВПГ использует гликопротеины на своей поверхности для связывания вируса с гепарансульфатом на поверхности клеток-хозяев. Внедрение вируса в клетку подробно описано в обзорах Connolly et al. [1] и Spear et al. [3]. Во время миграции в ядро капсид деградирует. Вирусная транскрипция, репликация ДНК, образование капсида вокруг генетического материала вируса и сборка капсида происходят исключительно в ядре клетки [9].

Вирусы герпеса характеризуются быстрым циклом репликации и могут размножаться во многих тканях, особенно эктодермального происхождения. Репликация ВПГ, как и других герпес-вирусов, – это результат согласованно регулируемого, последовательно упорядоченного каскада событий транскрипции и трансляции, которые классифицируются как немедленно-ранние, ранние и поздние процессы, регулируемые соответствующими генами: immediate-early (IE или  $\alpha$ ), early (E или  $\beta$ ) и late (L или  $\gamma$ ) [8]. Немедленно-ранние гены транскрибируются первыми без необходимости предшествующего синтеза вирусных белков. Первая фаза транскрипции соответствует синтезу ранних матричных РНК, кодирующих белки, участвующие в трансактивации вирусных промоторов и в репликации вирусной ДНК. Репликация ДНК осуществляется ферментами вирусного происхождения, включающими, в частности, ДНК-полимеразу и тимидинкиназу. Немедленно-ранние (IE) гены регулируют последующую экспрессию E- и L-генов с помощью транскрипционных и посттранскрипционных механизмов [9, 10]. Затем происходит транскрипция E-генов, экспрессия которых зависит от наличия продуктов IE-генов. E-гены кодируют ферменты метаболизма вирусной репликации, в частности рибонуклеотидредуктазу, тимидинкиназу и ДНК-полимеразу. Экспрессия генов E-группы знаменует начало репликации вирусной ДНК. Гены типа L, которые экспрессируются позже, кодируют белки и структурные гликопротеины, участвующие в образовании капсомеров и оболочек. В общих чертах, ранние гены кодируют ферменты, участвующие в метаболизме нуклеотидов и репликации ДНК плюс ряд гликопротеинов оболочки, а поздние гены кодируют в основном структурные белки вириона.



**Рис. 1.** Вирус простого герпеса. (а) – Структура вириона; (б) – структура ДНК, состоящая из уникальных последовательностей  $U_L$  и  $U_S$  (unique long and unique short) и фланкирующих прямых или инвертированных повторяющихся последовательностей  $TR_L$ ,  $TR_S$ ,  $IR_L$  и  $IR_S$  (terminal repeat long, terminal repeat short, internal repeat long, internal repeat short). Короткая последовательность # повторяется на концах генома и также присутствует в обратной ориентации между  $IR_L$  и  $IR_S$ . Пунктирными стрелками показано расположение немедленно-ранних транскриптов IE1–IE5.

Создание лекарств, способных ингибировать экспрессию IE-генов, могло бы снижать репликацию вируса на ранних стадиях заражения.

#### НУКЛЕОЗИДНЫЕ И НУКЛЕОТИДНЫЕ АНАЛОГИ КАК АГЕНТЫ ПРОТИВ ВИРУСОВ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА

Противовирусные препараты на основе аналогов нуклеозидов используются для лечения инфекций, вызванных ВПГ, уже более 45 лет [11] и до настоящего времени являются молекулами “золотого стандарта”. Они используются для подавления функций вирусной ДНК-полимеразы, тимидинкиназы и рибонуклеотидредуктазы. Эти агенты требуют первоначального фосфорилирования вирусной тимидинкиназой. Затем клеточные киназы генерируют активные для вирусной ДНК-полимеразы трифосфаты аналогов нуклеозидов, которые останавливают ДНК-полимеризацию, т.е. ингибируют репликацию вирусной ДНК. Эффективность нуклеозидных аналогов ограничена необходимостью раннего введения (в течение 24 ч при ВПГ и 72 ч при опоясывающем герпесе).

Аналоги нуклеозидов можно разделить на два основных класса: аналоги пиримидиновых и пуриновых нуклеозидов. Аналоги пиримидина – производные урацила и цитидина, аналоги пурина – производные гуанозина (ациклогуанозина). Вирусная тимидинкиназа более чувствительна

(на порядки величины) к пиримидиновым нуклеозидам, чем к гуанозиновым. Кроме того, аналоги пиримидина являются субстратами тимидинфосфорилазы, которая расщепляет гликозидную связь между сахаром и основанием, а аналоги гуанозина устойчивы к этому ферменту.

К соединениям класса производных пиримидина относится, например, устаревший препарат 5-иодо-2'-дезоксинуридин (5-I-dUrd) [12] для лечения ВПГ-гингивостоматита и глазного стромального кератита. Его применение в контролируемых клинических исследованиях ВПГ-энцефалита выявило высокую токсичность [13].

Были синтезированы 20 аналогов 2-тиопиримидиновых нуклеозидов и исследована их ингибирующая активность в отношении ВПГ-1 и ВПГ-2 [13]. 2'-Дезокси-2-тиоуридин (или 2-тиотимидин) и их 5-галогенированные производные проявляли анти-ВПГ-активность в клеточной системе. 2'-Дезокси-5-галогенированные-2-тиоцитидины также были активными в отношении ВПГ. Замена атома галогена в 5-м положении пиримидиновых колец на более тяжелый атом увеличивала активность против ВПГ. 2'-Дезокси-5-метил- и 2'-дезоксид-5-иодо-2-тиоуридин показали наибольшую активность против ВПГ. Цитотоксичность аналогов 2-тиопиримидиновых нуклеозидов была меньше, чем у 2-оксипроизводных. Индекс селективности 2'-дезоксид-5-иодо-2-тиоуридина был выше, чем у 5-иодоуридина.

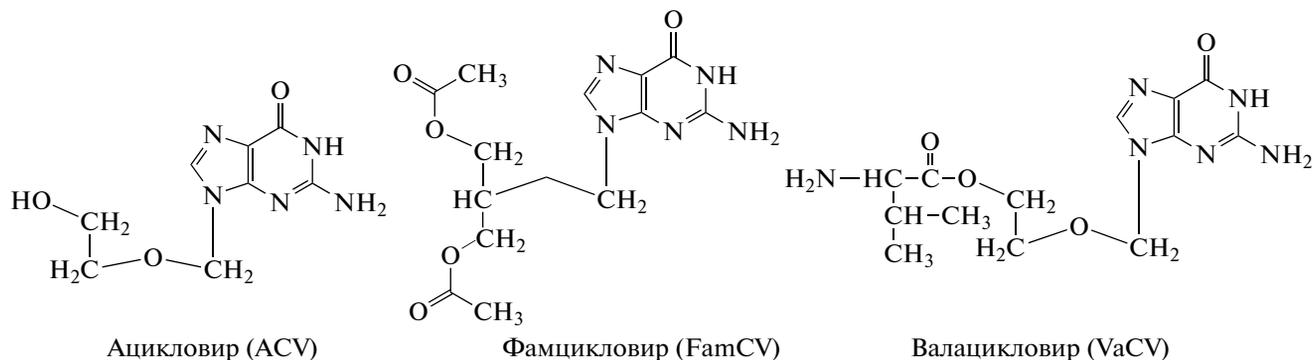


Рис. 2. Структура наиболее эффективных нуклеозидных аналогов для лечения герпес-вирусных инфекций.

Фтор-меченный 1-(2'-дезоксигуанозил)-5-иодоцитозин (<sup>18</sup>F-FIAS) представляет собой аналог цитидина, синтезированный для позитронно-эмиссионной томографии для визуализации гена тимидинкиназы ВПГ-1 [14]. FIAS – мощный ингибитор репликации вируса при концентрации всего 10 нМ. В то же время FIAS проявляет ограниченную цитотоксичность (ТС<sub>50</sub> = 21.7 мкМ) для незараженных клеток, что указывает на то, что FIAS не является субстратом для тимидинкиназы хозяина.

Была синтезирована серия аналогов 3-дезауридина (3-DU) и оценена их антигерпетическая активность против ВПГ-1 *in vitro* в клетках Vero. Показано, что производные С3-ариллированного 3-дезоксигуанидина могут представлять собой новое семейство противогерпетических средств. Интерес к аналогам дезоксиуридина связан с тем, что замена в положении С3 может привести к получению агентов с противовирусной активностью при низкой клеточной токсичности. Однако активность полученных производных уступает таковой для референс-препарата ацикловира [15].

Ряд аналогов пуриновых нуклеозидов, которые препятствуют репликации вирусной ДНК, были одобрены для лечения ВПГ-инфекций человека. 9-(β-D-Арабинофуранозил)аденин (Ara-A, vidarabine) был использован для лечения кератита, энцефалита, неонатальных инфекций и инфекций центральной нервной системы, вызванных вирусом герпеса (преимущественно ВПГ-2) [16, 17]. Сообщения о клинической эффективности противоречивы, основной недостаток для практического применения – крайне низкая растворимость Ara-A в воде.

Вирусная типоспецифическая ДНК-полимераза индуцируется в клетках хозяина при заражении вирусом простого герпеса (ВПГ). Этот фермент необходим для репликации вируса, и его свойства отличаются от свойств ДНК-полимераз хозяина, поэтому он является логической мишенью для разработки селективных противовирус-

ных соединений. Самый широко используемый препарат для воздействия на вирусную ДНК-полимеразу – ацикловир (ACV, рис. 2), разработанный американским фармакологом Г. Элайон, запатентованный в 1974 г. и одобренный для медицинского применения в 1981 г. В 1988 г. Г. Элайон вместе с Д. Блэком и Д. Хитчингсом получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине за разработку принципов создания препаратов, ориентированных на “молекулярные мишени”. Ацикловир – “золотой стандарт” для лечения инфекций слизистых оболочек, кожи и системных инфекций ВПГ-1 и ВПГ-2, инфекций, вызванных вирусом ветряной оспы (ВПГ-3) и цитомегаловирусом.

Ацикловир представляет собой производное гуанозина, 9-(2-гидроксиэтоксиметил)гуанин (рис. 2), который становится активным после фосфорилирования вирусной тимидинкиназой в инфицированных клетках. Активный ингредиент, трифосфат ацикловира, – это субстрат для вирусной ДНК-полимеразы. Сам по себе ACV – конкурентный ингибитор вирусной тимидинкиназы [18], тогда как ACV-трифосфат (ACV-TP) действует как конкурентный ингибитор вирусной ДНК-полимеразы [19]. Местное применение ацикловира уменьшает распространение вируса и ускоряет заживление ран.

6-Тиогуанин (6-TG) [20] – клинически одобренный препарат для лечения острого миелолейкоза у детей, ингибирующий множественные штаммы ВПГ-1 *in vitro* и *in vivo*. 6-TG более эффективен, чем ACV. В клеточной системе значение IC<sub>50</sub> составляет 0.104 мкМ для 6-TG по сравнению с 1.253 мкМ для ACV. Индекс селективности для 6-TG SI > 6000. При инфекции ВПГ-1 в системе *in vivo* 6-TG в дозе 500 мкМ при местном нанесении на веки значительно ингибирует репликацию ВПГ-1 и ослабляет индуцированный вирусом патогенез. Кроме того, 6-TG эффективен против устойчивых к ACV штаммов ВПГ-1.

К сожалению, использование АСV, как и других нуклеозидных аналогов, приводит к выработке резистентности. Основная причина – мутации в гене тимидинкиназы, которая после этого становится неспособной фосфорилировать нуклеозидные аналоги. Ацикловир, как и Ага-А, плохо растворим в воде (0.2%), и эта физическая характеристика также ограничивает его применение.

Ацикловир послужил прототипом для разработки целого ряда новых ациклических или карбоциклических аналогов гуанозина [21]. Производные ацикловира – пенцикловир (PCV) и его ацетилированное производное фамцикловир (FamCV) (рис. 2). PCV обладает в ~100 раз более высоким сродством к вирусной тимидинкиназе по сравнению с АСV, что приводит к образованию гораздо большего количества соответствующего трифосфата. С другой стороны, трифосфат ацикловира проявляет в ~100 раз большее сродство к вирусной ДНК-полимеразе, чем трифосфат пенцикловира [22].

Ганцикловир (GCV), аналог гуанозина, имеет дополнительную гидроксильную группу на предполагаемом 3'-углероде по сравнению с АСV. Подобно АСV, GCV демонстрирует плохую пероральную биодоступность, что было преодолено созданием валганцикловира (VGCV) путем присоединения валина [23]. Попав в организм, VGCV превращается в свою активную форму.

В статье De Clercq et al. [24] приведена сравнительная противовирусная активность, основанная на IC<sub>50</sub> ацикловира (0.1–1 мкМ против ВПГ-1 и ВПГ-2), пенцикловира (0.1–1 мкМ против ВПГ-1 и 1–10 мкМ против ВПГ-2) и ганцикловира (1–10 нМ в отношении ВПГ-1, ВПГ-2). Таким образом, самое активное из упомянутых производных – ганцикловир.

В последние годы разработаны новые противогерпесные препараты на основе нуклеозидов и нуклеотидов, которые либо проходят испытания, либо уже одобрены для использования в клинической практике [21, 25]. Потенциальная проблема, связанная с АСV, – его низкая пероральная биодоступность. Эта проблема была устранена путем присоединения валина к АСV с образованием валацикловира (VaCV, рис. 2) [25]. VaCV имеет гораздо более высокую скорость всасывания в кишечнике, что приводит к меньшему расходу препарата при каждой пероральной дозе. При метаболизме в печени и почках валин отщепляется от VaCV, и высвободившийся АСV приобретает свойственный ему механизм действия.

Как отмечалось ранее, устойчивость к нуклеозидным аналогам в основном приобретает в результате мутаций в гене тимидинкиназы, которая необходима для фосфорилирования, без которого ни один из аналогов нуклеозидов не активен в отношении вирусов герпеса. Один из способов реше-

ния этой проблемы – использование нуклеотидных аналогов, уже содержащих монофосфат.

Примером может служить цидофовир (CDV), аналог монофосфата дезоксицитидина. Устойчивость к CDV возникает в результате мутаций в гене вирусной ДНК-полимеразы, которые могут приводить к устойчивости вируса также к аналогам нуклеозидов. Основным недостатком использования CDV – высокая токсичность для почек [26]. Другой препарат, бринцидофовир, получен после присоединения цепочки липида к CDV [27]. Этот препарат менее токсичен и более эффективен для ингибирования вируса при более низкой общей дозе [28]. Аналог dAMP, адефовир, также ингибирует репликацию ВПГ [29].

Из всех созданных нуклеозидных аналогов наиболее эффективными лекарственными средствами против ВПГ признаны ацикловир (АСV), фамцикловир (FamCV) и валацикловир (VaCV) (рис. 2) из-за их высокой пероральной биодоступности и быстрого метаболизма в их активные формы. По данным ВОЗ, эти препараты помогают снизить тяжесть и частоту появления симптомов [4].

Следует отметить, что противогерпесные препараты на основе нуклеозидных и нуклеотидных аналогов не в состоянии полностью подавить репродукцию, выделение и передачу вируса. Развитие устойчивости – также важная проблема. Кроме того, при длительном применении аналогов пуриновых нуклеозидов в клинической практике происходит их эффективный катаболизм, который не только снижает биологическую активность препарата, но и приводит к образованию токсических катаболитов.

## АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ КАК ПРОТИВОВИРУСНЫЕ АГЕНТЫ

Очевидно, что поиск новых путей диагностики и терапии герпес-вирусных инфекций весьма актуален. Желательно разработать препараты и методы терапии, которые одновременно высокоэффективны и не имеют значительных побочных эффектов. Антисмысловые олигонуклеотиды (АО) – потенциальные фармакологические агенты, мощно и высокоспецифично ингибирующие экспресси мРНК генов различных патогенов, в том числе вирусов.

Терапевтические нуклеиновые кислоты (НК) – перспективные кандидаты для противовирусной терапии, поскольку они обладают высоким сродством к нуклеиновым кислотам и могут быть подобраны практически против любой такой мишени. Они хорошо растворимы в воде, обладают высоким ингибирующим потенциалом и проявляют ограниченную токсичность и иммуногенность [30, 31]. Производные олигонуклеотидов стали

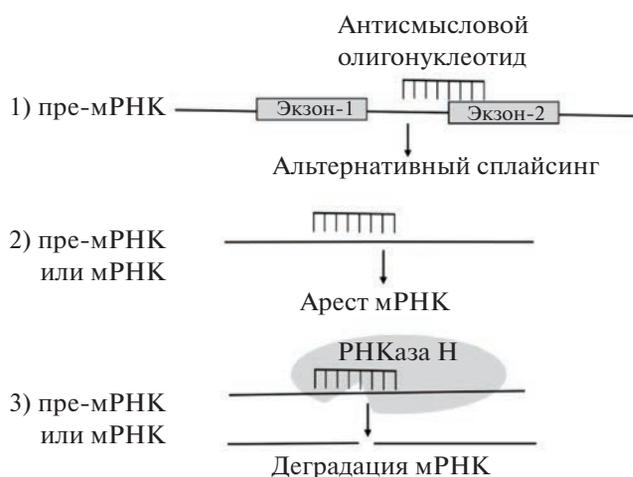
рассматриваться в качестве перспективных терапевтических препаратов более 40 лет назад [32, 33]. В качестве агентов на основе нуклеиновых кислот используются олигонуклеотиды, их аналоги, рибозимы, ДНКзимы, аптамеры, siРНК и др. [31] с различными модификациями как в сахарофосфатном остове, так и в структуре рибозы или гетероциклических оснований [34, 35].

Препараты на основе нуклеиновых кислот – основа нового направления медицины, поскольку они избирательно распознают комплементарные области мишеней – НК – и влияют на их функции в клетках, что позволяет ингибировать экспрессию определенных генов, ответственных за развитие заболевания, не затрагивая гены хозяина. По сравнению с низкомолекулярными фармацевтическими препаратами, агенты на основе НК обладают рядом преимуществ – высокой специфичностью, низкими побочными эффектами и возможностью перенацеливания препаратов на любые целевые НК-мишени, – в то время как поиск новых низкомолекулярных препаратов обычно занимает годы.

Возможны различные механизмы действия АО (рис. 3), один из которых – регулирование сплайсинга. Пре-мРНК сплайсируется в зрелую мРНК в ядре перед трансляцией в цитоплазму. Связываясь с пре-мРНК, АО могут модулировать альтернативный сплайсинг, продуцируя различные варианты белка, что может быть определенным преимуществом для терапии [36]. Другой вариант действия АО – связывание с комплементарными участками мРНК целевых генов, что приводит либо к механическому аресту мРНК, либо к ее деградации с помощью РНКазы Н. В обоих случаях ингибируется экспрессия соответствующего гена [35, 36].

В последнее десятилетие АО-препараты исследовались как потенциальные лекарства от таких заболеваний, как рак [37], диабет [38], боковой амиотрофический склероз (БАС) [39], астма [40], ревматоидный артрит [41], а также заболеваний, вызванных вирусами, например, вирусом иммунодефицита человека [42], вирусом гепатита С [43] и вирусами гриппа [44–48].

Интенсивные исследования в области использования лекарственных препаратов на основе НК начались в 1990-е гг., что привело к появлению в 1998 г. первого противовирусного лекарственного олигонуклеотидного препарата Vitravene (фомивирсен), предназначенного для лечения инфекции, вызванной цитомегаловирусом [49]. Кроме фомивирсена еще несколько АО были одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA): мипомерсен для лечения гомозиготной семейной гиперхолестеринемии, этеплирсен для лечения мышечной дистрофии Дюшенна, спинпраза (нусинер-



**Рис. 3.** Возможные механизмы действия антисмысловых олигонуклеотидов.

сен) для лечения спинальной мышечной атрофии, мипомерсен для воздействия на вирус гепатита С и др. [50].

### АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ПРОТИВ ВИРУСОВ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА

Олигонуклеотиды с различными химическими модификациями, нацеленные на определенные участки генома ВПГ, продемонстрировали различную эффективность при подавлении репликации вирусов герпеса. Сайты сплайсинга немедленно-ранних транскриптов можно рассматривать как возможную мишень для антисмыслового ингибирования. Часто использовались олигонуклеотиды, направленные на акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК немедленно-ранних транскриптов ВПГ IЕ4 и IЕ5. В этом случае олигонуклеотиды ингибируют сплайсинг пре-мРНК и, тем самым, синтез соответствующих белка и ДНК, что приводит к подавлению роста вируса. Сайты инициации трансляции немедленно-ранних генов – также часто используемые мишени для воздействия АО, которые содержат последовательность САТ, комплементарную иницирующему кодону AUG в мРНК мишени. Область мРНК, соответствующая сайтам инициации трансляции, вероятно, не образует вторичную структуру и, следовательно, доступна для антисмысловых молекул [51].

В табл. 1 и 2 приведены данные по использованию олигонуклеотидов для подавления репликации ВПГ-1 и ВПГ-2 соответственно. Рассмотрим некоторые работы более подробно.

*Антисмысловые олигонуклеотиды против ВПГ-1*

Aurelian et al. [52] использовали 12-звенные 2'-*O*-метилрибоолигонуклеотиды с чередующимися фосфодиэфирными и метилфосфонатными межнуклеотидными группами. Один из них, направленный на акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК немедленно-ранних генов ВПГ-1 IE4 и IE5, подавлял репликацию вируса на 80% при концентрации 1 мкМ (табл. 1, № 1).

В работе Kulka et al. [53] 13-звенные олигонуклеотиды с метилфосфонатными межнуклеотидными группами подавляли продукцию ВПГ-1 *in vitro* и *in vivo*. Олигонуклеотид, направленный на акцепторный или донорный сайты сплайсинга пре-мРНК IE4,5 или на сайт инициации трансляции гена IE4, ингибировал рост вируса в клетках на 80–90% при очень высокой концентрации 100–200 мкМ. У мышей наблюдали подавление роста вируса на ~80% при местном применении препарата в концентрации 500 мкМ, а этот же олигонуклеотид, несущий остаток псоралена, после УФ-облучения в месте нанесения подавлял вирус *in vivo* на ~90% при той же концентрации (табл. 1, № 2).

В работе тех же авторов показано [54], что совместное применение олигонуклеотидов, направленных на акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК IE4,5 и на сайты инициации трансляции генов IE1 и IE4 в разных комбинациях, дает синергический эффект, приводя к 70–80%-ному подавлению репликации ВПГ-1 в клеточной системе по сравнению с использованием отдельных олигонуклеотидов (23–28%) при концентрации 12 мкМ (табл. 1, № 3).

Blumenfeld et al. [55] использовали 18-звенный олигонуклеотид с фосфодиэфирными или тиофосфатными межнуклеотидными группами, направленный на акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК IE4 и IE5. Олигонуклеотид P=S проявил большую активность по сравнению с олигонуклеотидом P=O, а в присутствии липофектамина был максимально эффективным (подавление репликации ВПГ-1 на 90% при концентрации 10 нМ) (табл. 1, № 4).

В попытках определить и идентифицировать оптимальные мишени для антисмыслового ингибирования вирусов Reuman et al. [10] провели скрининг ста 20-звенных олигонуклеотидов, направленных на различные участки мРНК целевых генов ВПГ-1. Олигонуклеотиды содержали по две тиофосфатных группы на обоих концах для защиты от нуклеаз. Шесть олигонуклеотидов продемонстрировали заметный противовирусный эффект в клеточной системе, а самым эффективным оказался олигомер (50%-ное подавление репликации ВПГ-1 при концентрации 9 мкМ), который был нацелен на область начала трансляции мРНК IE110 (табл. 1, № 5). В работе Reuman et al.

[56] показано, что увеличение числа тиофосфатных групп повышало противовирусную активность олигонуклеотидов, и при замене всех фосфодиэфирных групп на тиофосфатные все олигонуклеотиды проявляли активность при минимальной ингибирующей концентрации 1–10 мкМ. Однако при этом полностью утрачивалась специфичность, т.е. зависимость от последовательности.

Аналогичный эффект отмечен в работе Birch-Hirschfeld et al. [57], в которой тот же олигонуклеотид с полностью тиофосфатными группами (табл. 1, № 6) в клетках почек зеленой марышки (ГМК) проявил высокую активность против ВПГ-1 (ингибирование 90% при концентрации 20 мкМ) по сравнению с частично модифицированными или полностью фосфодиэфирными межнуклеотидными группами (5% при 40 мкМ).

В работах Shoji et al. [58, 59] тиофосфатные олигонуклеотиды (15-мер и 20-мер соответственно), направленные на акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК IE5, почти полностью подавляли ВПГ-1 при концентрации соответственно 10 и 12.5 мкМ (табл. 1, № 7 и 8), в отличие от фосфодиэфирного аналога, который был совершенно неактивен. Использование трансфекционных агентов для доставки олигонуклеотида в клетки не привело к увеличению противовирусного эффекта тиофосфатного олигонуклеотида, однако фосфодиэфирный олигомер, который не проявил никакого эффекта даже при концентрации >680 мкМ, в присутствии липофектина стал активным ( $IC_{50} = 0.9$  мкМ), и все-таки его эффект был ниже по сравнению с тиофосфатным аналогом. Авторы сделали вывод о том, что нет необходимости в использовании трансфекционных агентов, т.к. они приводят к увеличению токсичности. В работе той же группы авторов [60] вместо трансфекционных агентов была использована липофильная группировка (остаток гераниола), присоединенная к олигонуклеотиду, что способствовало проникновению в клетки и позволило повысить его противовирусную активность (табл. 1, № 9).

Vinogradov et al. [61] использовали фосфодиэфирные олигонуклеотиды, модифицированные путем присоединения гидрофобных группировок по 3'-концу (акридин или гептандиол) и 5'-концу (ундецил или холестерил), повышающих стабильность и проникающую способность. Модифицированные таким образом олигонуклеотиды проявили высокую активность против ВПГ-1 (до 100% при концентрации 4 мкМ при введении через 22 ч после инфекции) (табл. 1, № 10).

Двухпочечный олигонуклеотид, образующий шпильку, проявил не очень высокую активность против ВПГ-1 в клетках Vero (табл. 1, № 11) [62]. Олигонуклеотид, несущий фотоактивируемый остаток псоралена и направленный на акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК IE22 и IE 47, ин-

Таблица 1. Антисмысловые олигонуклеотиды для подавления репликации ВПГ-1

№	Тип АО* (трансфекционный агент)	Последовательность (5'-3')	Мишень	IC <sub>50</sub> (IC <sub>90</sub> ), мкМ	Ингибирование, % (концентрация, мкМ)	Модели <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	Ссылка
1	P-CH <sub>3</sub> /P=O, 2'-O-Me	GGCGTCCCTCCCTT (3'-5')	Акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК IE4,5	0.17 (1.7)	80 (1)	Клетки HeLa	[52]
2	P-CH <sub>3</sub>	TTCCCTCCCTGCGG	Акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК IE4,5	20	80–90 (100–200)	Клетки HeLa	[53]
		GCTTACCCCGTGC	Донорный сайт сплайсинга пре-мРНК IE4,5				
		AATGTCGGCCAT	Сайт инициации трансляции гена IE4	20			
		TTCCCTCCCTGCGG	Акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК IE4,5	–	80 (500)	Мыши Balb/c	
3	P-CH <sub>3</sub>	Psoralen-TTCCCTCCCTGCGG	Сайт инициации трансляции гена IE1	17 (110)	28 (12) (УФ)	Клетки HeLa	[54]
		Psoralen-GCGGGGCTCCAT (A)	Акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК IE4,5				
		TTCCCTCCCTGCGG (B)	Сайт инициации трансляции гена IE4	20 (98)	23 (12)		
		AATGTCGGCCAT (C)		4 (17)	70 (12) (УФ)		
		A + B		3 (15)	80 (12) (УФ)		
		A + C		14	90 (40)	Клетки Vero	[55]
4	P=O	ACGTTCCCTCCCTGCGGAA (3021)	Акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК IE4,5	–	100 (40)		
		P=S	ACGTTCCCTCCCTGCGGAA (3021)	8	90 (0.01)		
5	Сто АО, по две P=S на обоих концах	GCGGGGCTCCATGGGGTCCG (максимальный эффект)	Сайт инициации трансляции гена IE110, кодирующего регуляторный белок	–	50 (9)	Клетки Vero	[10]
		GCGGGGCTCCATGGGGTCCG	Сайт инициации трансляции гена IE110, кодирующего регуляторный белок	–	90 (20) для P=S	Клетки GMK	[57]
7	P=S	AGGGCGTTCCCTCCCTG	Акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК IE5	4	~100 (~10)	Клетки Vero	[58]

Таблица 1. Окончание

№	Тип АО* (трансфекционный агент)	Последовательность (5'-3')	Мишень	IC <sub>50</sub> (IC <sub>90</sub> ), мкМ	Ингибирование, % (концентрация, мкМ)	Модели <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	Ссыл- ка
8	P=S без липофек- тина	ACGAGGGGGTTCCCTCCTGGG	Акцепторный сайт сплайсинга пре- мРНК IE5	2.07	~100 (12.5)	Клетки Vero	[59]
	P=O + липофектин			0.9	—		
9	P=O	GatapuI-GCGGGGTGAGCCCC	пре-мРНК IE5	—	~10 (2.5) без Gcg ~100 (2.5) с Gcg	Клетки Vero	[60]
10	P=O	Undecyl-CGTTCCCTCCTGC-Acг Chol-GGAAAACAATCGCGGTT GTT-Hept	Сайт сплайсинга 983–994 мРНК IE5 Область старт-кодона мРНК гена, кодирующего вирусную ДНК-полиме- разу	—	90 (2) 100 (4)	Клетки Vero	[61]
11	Шпилечный АО (липофектин)	CCCCGATCGTCCACACGGAGC GCG GGGGCTAGCAGGTGTGC CTCGCGC	Ген IE, кодирующий белок ICP4	0.3	60 (1)	Клетки Vero	[62]
12	P=O	Psoralen-GGGCGTCCCTCCTT	Акцепторный сайт сплайсинга пре- мРНК IE22 и IE47	—	80 (0.5) (УФ-облучение)	Клетки Vero	[63]
13	P=S	GACCCATTTCGAGACGAC	Область AUG кодона гена UL12-4, кодирующего щелочную ДНКазу	>250	80 (40)	Клетки Vero	[64]
14	P=S	ACCGAGGTCCATGTCCGTACGC	Область иницирующего кодона гена, кодирующего капсидный белок UL13	—	90 (4)	Клетки HeLa	[65]
15	P=S	GCCGAGGTCCATGTCCGTACGC (1082)	Сайт инициации трансляции мРНК белка UL13	0.275	99.5 (4)	Ретикуло- циты кролика	[66]
16	PPMO**	GGTCGTATCGGGCTGGAGGG TCGC	Участок, примыкающий к сайту иници- ации трансляции мРНК гена ICP0	—	70–98% (20)	Клетки кожи кролика	[70]
						Мыши Webster	
						Клетки кожи кролика	
		GGTGTCCGGATAGGCCCTCTGG TGG	Участок, примыкающий к сайту иници- ации трансляции мРНК гена ICP27		88% (20)	Клетки кожи кролика	

\* Олигонуклеотиды с метилфосфонатными (P=CH<sub>3</sub>), фосфонидэфирными (P=S), тиофосфонатными (P=O), тиофосфонатными (P=S) межнуклеотидными группами и 2'-O-метильными (2'-O-Me) группами.

\*\* Морфолиновые олигонуклеотиды, конъюгированные с транспортным пептидом (PPMO).

Таблица 2. Антисмысловые олигонуклеотиды для подавления репликации ВПГ-2

№	Тип АО* (трансфекционный агент)	Последовательность (5'-3')	Мишень	IC <sub>50</sub> (IC <sub>90</sub> ), мкМ	Ингибирование, % (концентрация, мкМ)	Модели <i>in vitro/in vivo</i>	Ссыл- ка
1	P=O	GCGCCCGGCTGCGAGAA (3023)	Акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК IE4,5	24	40 (20); 60 (40)	Клетки Vero	[55]
	P=S			6	80 (20); 100 (40)		
2	P=S	AGGGCGTTCCTCCTG	Акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК IE5	0.25	~100 (0.5)	Клетки Vero	[59]
3	P=S	GCCGAGGTCCATGTCGTACGC (1082)	Сайт инициации трансляции мРНК белка UL13	0.25	99.5 (4)	Ретикулоциты кролика	[66]
4	P-CH <sub>3</sub> /P=O, 2'-O-Me	GCCATGGAAACC (3'-5')	Сайт инициации трансляции мРНК белка R1	0.11 (1)	89 (1); 99 (5)	Клетки HeLa	[52]
5	P-CH <sub>3</sub> /P=O, 2'-O-Me (вирусный вектор)	TGCCATGGAAACC + UTARVE (вектор)	Сайт инициации трансляции мРНК белка R1	0.002	~80 (0.01)	Клетки A549	[71]
6	РРМО**	GGTCCATGAGCCGGGTAGGGTA	Сайт инициации трансляции мРНК гена ICP0	-	73 (20)	Клетки Vero	[72]
		GTAGCCATGTTGTAGTCCGCCGG	Сайт инициации трансляции мРНК гена ICP27				
		GTAGCCATGTTGTAGTCCGCCGG	Сайт инициации трансляции мРНК гена ICP27				

\* Олигонуклеотиды с метилфосфонатными (P-CH<sub>3</sub>), фосфоэфирными (P=O), тиоэфирными (P=S) межнуклеотидными группами и 2'-O-метильными (2'-O-Me) группами.

\*\* Морфолиновые олигонуклеотиды, конъюгированные с транспортным пептидом (РРМО).

гибировав ВПГ-1 на 80% при концентрации 0.5 мкМ после облучения клеток УФ-светом (табл. 1, № 12) [63].

Chiba et al. [64] для подавления репликации ВПГ-1 использовали олигонуклеотиды с тиофосфатными группами, направленные на AUG-содержащую область гена щелочной ДНКазы. Самый активный из олигонуклеотидов при концентрации 40 мкМ ингибировав репликацию вируса в клетках Vero на ~80% (табл. 1, № 13), при этом количество мРНК соответствующего гена уменьшалось на 88%, что указывает на антисенс-механизм действия олигонуклеотида.

Noke et al. [65] показали большую противовирусную активность олигонуклеотида с полностью модифицированными тиофосфатными межнуклеотидными группами (подавление репликации ВПГ-1 ~90%, табл. 1, № 14) по сравнению с частично модифицированными олигомерами (20–30%).

Draper et al. [66] исследовали противовирусную активность большого числа олигонуклеотидов Р=О и Р=S, направленных на различные участки мРНК генов ВПГ-1 и ВПГ-2. Вирусный белок UL13 демонстрирует высокую степень консервативности и соответствия нуклеотидной последовательности среди гомологов различных ВПГ-1 и ВПГ-2, поэтому он представляет собой подходящую мишень для антисмыслового ингибирования. Капсидный белок вириона UL13, обладающий протеинкиназной активностью, участвует в специфическом фосфорилировании капсидных белков вириона. Как и в других случаях, тиофосфатные аналоги оказались намного более активными, чем олигонуклеотиды Р=О. Наиболее эффективный олигонуклеотид Р=S 1082, направленный на сайт инициации трансляции мРНК белка UL13, ингибировав репликацию обоих вирусов в клеточной системе на 99.5% при концентрации 4 мкМ (табл. 1, № 15 и табл. 2, № 5). Его активность была сравнима с активностью ацикловира. Олигонуклеотид Р=S 1082 проявил активность в отношении устойчивых к АСВ штаммам вируса. Кроме того, на кроликах было показано, что местное применение Р=S 1082 значительно уменьшало тяжесть ВПГ-индуцированного стромального кератита (табл. 1, № 15 и табл. 2, № 3).

Вышеперечисленные работы были проведены 20–30 лет назад. Чаще всего в них использовались олигонуклеотиды с нативными фосфодиэфирными или модифицированными (тиофосфатными, метилфосфонатными) межнуклеотидными группами. После некоторого перерыва работы по использованию антисенс-технологии в отношении герпесных инфекций были продолжены. На новом этапе использования антисенс-технологии для борьбы с вирусами герпеса стали применяться агенты на основе нуклеиновых кислот следующего поколения, в частности морфолиновые олигонук-

леотиды (РМО) и siРНК. РМО представляют собой аналоги олигонуклеотидов, содержащих морфолиновые кольца вместо рибозы [67]. Они устойчивы к клеточным нуклеазам и не теряют способность образовывать комплементарные дуплексы с РНК-мишенями. РМО, конъюгированные с транспортным пептидом (РРМО) используются в качестве противовирусных антисенс-олигомеров во многих работах (например, [68, 69]).

Moerdyk-Schauwecker et al. [70] исследовали противогерпесный эффект РРМО, направленных на участки, примыкающие к сайту инициации немедленного-ранних генов ВПГ-1 (*ICP0* и *ICP27*), важных для жизнедеятельности вируса. Белок *ICP0* предотвращает подавление вирусной ДНК, а белок *ICP27* функционирует на всех стадиях биогенеза мРНК: транскрипции, процессинга, трансляции и др. Конъюгат РРМО, направленный на сайт инициации трансляции мРНК гена *ICP0*, ингибировав в клеточной системе репликацию нескольких штаммов ВПГ-1 (70–98%), включая устойчивые к ацикловиру штаммы (70–90%) при концентрации 20 мкМ, и проявил значительную эффективность *in vivo* на модели глазной герпетической инфекции у мышей (снижение частоты заболеваний глаз на 37.5–50.0% по сравнению с контрольной группой) (табл. 1, № 16).

#### Антисмысловые олигонуклеотиды против ВПГ-2

Относительно небольшое число исследований посвящено воздействию антисмысловых олигонуклеотидов на ВПГ-2, причем авторы этих работ, как правило, одновременно исследовали противовирусный эффект в отношении обоих типов вируса.

Blumenfeld et al. [55] использовали 18-звенный олигонуклеотид 3023 (табл. 2, № 1) с тиофосфатными или фосфодиэфирными межнуклеотидными группами, направленный на акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК IE4 и IE5 ВПГ-2. Полностью тиофосфатный олигонуклеотид 3023 проявил высокую противовирусную активность (подавление репликации вируса на 100% при концентрации 40 мкМ, табл. 2, № 1), аналогичную активности олигонуклеотида 3021, направленного на такую же область ВПГ-1 (табл. 1, № 4).

Олигонуклеотид Р=S, направленный на акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК IE5, был использован для подавления репликации как ВПГ-1 (табл. 1, № 7), так и ВПГ-2 (табл. 2, № 2) [58]. В обоих случаях было показано практически полное ингибирование обоих типов вируса при концентрации 0.5 мкМ.

Draper et al. [66] подтвердили большую эффективность олигонуклеотидов Р=S. Один и тот же олигонуклеотид Р=S 1082, направленный на сайт инициации трансляции мРНК белка UL13, ис-

пользовали для воздействия на ВПГ-1 и ВПГ-2, поскольку последовательность гена, кодирующего этот белок, гомологична для обоих типов вируса. Как и в случае ВПГ-1, использованный олигонуклеотид ингибировал репликацию ВПГ-2 на 99.5% при концентрации 4 мкМ (табл. 1, № 15 и табл. 2, № 3).

Aurelian et al. [52, 71], как и в случае работы с ВПГ-1, использовали модифицированный 2'-О-метилрибоолигонуклеотид с чередующимися фосфодиэфирными и метилфосфонатными межунклеотидными группами, направленный на сайт инициации трансляции мРНК белка R1 (также известного как ICP10) ВПГ-2. Ингибирование репликации ВПГ-2 было высокоэффективным (99% при концентрации 5 мкМ) (табл. 2, № 4). Концентрацию олигонуклеотида удалось значительно снизить при использовании вирусного вектора UTARVE для доставки олигонуклеотида в клетки (ингибирование 80% при концентрации 0.01 мкМ) (табл. 2, № 5).

В работе Eide et al. [72] морфолиновый олигонуклеотид (РРМО), направленный на сайт инициации трансляции мРНК гена *ICP27*, ингибировал репликацию ВПГ-2 *in vitro* на ~90% при концентрации 20 мкМ (табл. 2, № 6), причем был более эффективен при профилактическом применении. Эффективное ингибирование (84%) показано также для штаммов, устойчивых к ацикловиру. На модели *in vivo* на крысах, зараженных ВПГ-2, показан благоприятный эффект РРМО, применение которого привело к уменьшению генитальных поражений и снизило смертность на 50% по сравнению с контролем.

### МАЛЫЕ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ РНК (siРНК) ПРОТИВ ВИРУСОВ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА

Один из классов олигонуклеотидных терапевтических средств – двухцепочечные siРНК (длина 21–25 нт). Показано, что siРНК связываются с комплексом белков RISC (RNA-induced silencing complex), в состав которого входит эндонуклеаза семейства Argonaute (AGO). Одна из цепей siРНК (пассажирская) деградирует и удаляется из комплекса с RISC. Оставшаяся (направляющая) цепь в составе RISC связывается с комплементарным участком целевой РНК. После точной комплементации эндонуклеаза AGO в составе RISC разрушает вываленную РНК. Процесс разрушения РНК с участием siРНК и комплекса белков RISC каталитический. Благодаря такому механизму действия молекула siРНК может быть использована для нацеливания почти на все гены, представляющие интерес.

Агенты на основе siРНК использовались для подавления репликации ВПГ обоих типов в большом числе исследований (~200 работ). siРНК по-

давляет экспрессию генов, как и в случае АО, специфичным для последовательности образом. Основные проблемы, связанные с использованием siРНК, – их быстрый гидролиз под действием клеточных нуклеаз и необходимость разработки эффективной системы доставки к клеткам-мишеням. В обзорах [73–75] рассмотрен механизм действия siРНК и способы ее доставки в клетки при использовании против вирусов ВПГ и ВИЧ. Особые сложности возникают при доставке siРНК в клетки в случае ВПГ-2. В обзоре Vaxi et al. [76] рассмотрены системы для усиления вагинальной доставки siРНК на основе липидов, полимерных наночастиц, транспортных пептидов и др. В обзоре Manda et al. [75] исследованы различные мишени для воздействия siРНК и обсуждены преимущества нацеливания на менее изученный ген *UL10*.

В настоящем обзоре мы упомянем некоторые из работ последних лет (вплоть до 2022 г.), касающиеся конкретного воздействия siРНК на мРНК определенных генов ВПГ-1 и ВПГ-2.

Mollaei et al. [77] использовали две siРНК, доставленные с помощью трансфекционного агента и нацеленные на различные участки гена *UL42* ВПГ-1, который кодирует многофункциональный полипептид, ассоциированный с вирусной ДНК-полимеразой и жизненно важный для репликации ДНК вируса. Использование более эффективной siРНК привело к снижению титра ВПГ-1 на 90–99% и блокированию экспрессии гена *UL42* на 96–99% в экспериментах *in vitro*. Авторы показали специфичность действия использованной siРНК. Следует отметить, что высокий противовирусный эффект достигался при использовании достаточно низких (наномолярных) концентраций препаратов (табл. 3, № 1).

Jbara-Agbaria et al. [78] для подавления репликации ВПГ-1 использовали siРНК, направленную на мРНК гена, кодирующего белок ICP0, который важен для регуляции вирусной инфекции (предотвращает подавление вирусной ДНК). Авторы исследовали роль различных трансфекционных агентов для действия siРНК. При использовании липофектамина для доставки siРНК в клетки продемонстрирована значительная противовирусная активность препарата при концентрации 1.5–6 мкг/мл (соответствует ~0.1–0.4 мкМ), выраженная в уменьшении числа бляшек и в снижении уровня экспрессии белка ICP0 (табл. 3, № 2).

Белки *UL29* и *UL28* ВПГ-1 имеют решающее значение для его репликации и упаковки соответственно. Song et al. [79] для подавления репликации ВПГ-1 использовали шпилечные РНК (shРНК), нацеленные на гены *UL29* и *UL28* и доставленные в клетки в составе вектора аденовируса человека 5-го типа с дефектом репликации. Результаты показали, что shРНК, доставляемые с

**Таблица 3.** Малые интерферирующие РНК (siРНК) для подавления репликации ВПГ-1

№	Тип АО (трансфекционный агент)	Мишень (клетки <i>in vitro</i> ; модель <i>in vivo</i> )	Ингибирование, % (концентрация, нМ)	Модель <i>in vitro/in vivo</i>	Ссылка
1	siРНК, Р=О (транспортный пептид)	мРНК гена, кодирующего белок UL42	96–99 (0.5–30)	Клетки HeLa	[77]
2	siРНК, Р=О (липофектамин)	мРНК гена, кодирующего белок ICP0	~85 (400)	Клетки HaCaT	[78]
3	shРНК, Р=О (аденовирусный вектор)	мРНК генов белков UL28 и UL29, ответственных за репли- кацию и упаковку	90–98	Клетки Vero	[79]
4	Набор siРНК, Р=О (липофектамин)	Разные участки мРНК гена, кодирующего белок UL29	99.9 (50)	Клетки U373MG	[80]
5	Набор siРНК, Р=О	Разные участки мРНК гена, кодирующего белок UL29	Выживаемость 60% (250 пмоль на один глаз)	Мыши BALB/c	[81]
6	Набор siРНК, Р=О (липофектамин)	Разные участки мРНК гена, кодирующего белок UL29	98 (10)	Клетки Vero	[82]
7	Набор siРНК, Р=О, 2'-F (липофектамин)	Разные участки мРНК гена, кодирующего белок UL29	99 (1.8)	Эпителиальные клетки роговицы глаза человека	[83]

помощью вектора, значительно (в 10 и 20 раз соответственно) подавляли репликацию ВПГ-1 *in vitro*. Использование двух shРНК, направленных одновременно на оба гена, давали синергический эффект (подавление репликации на 98%) (табл. 3, № 3).

Группа исследователей под руководством V. Niskanen [80–83] использовала ферментативно созданные наборы siРНК для подавления репликации ВПГ. Проведена оценка противовирусной активности набора siРНК, нацеленных на гены *UL54*, *UL29* или *UL27*, против различных патогенных штаммов ВПГ-1 [80]. Исследование проводили на трех клеточных линиях, представляющих ткани хозяина, которые поддерживают репликацию ВПГ-1: эпителиальные, глазные и нервные клетки. На клетках астроцитомы человека U373MG показано, что пул, нацеленный на ген *UL29* (10 пмоль на лунку), оказывает наиболее выраженный противовирусный эффект (ингибирование вируса на три порядка) (табл. 3, № 4).

В работе той же группы авторов [81] исследована противовирусная активность набора siРНК, направленных на ген *UL29*, *in vivo* на мышьях линии BALB/c. Показано уменьшение вирусной нагрузки, облегчение симптомов болезни и значительное увеличение выживаемости по сравнению с контролем (60 против 20%) (табл. 3, № 5).

Проведена оценка противовирусного потенциала ферментативно полученного набора siРНК, нацеленных на мРНК гена *UL29* ВПГ-1, против 17 циркулирующих штаммов ВПГ-1 в сравнении

с ацикловиром [82]. В клеточной системе значения  $IC_{50}$  для siРНК (0.5–3.0 нМ) были гораздо ниже по сравнению с ацикловиром (350–1911 нМ). Кроме того, показано, что устойчивый к ацикловиру штамм ВПГ-1, лишенный тимидинкиназы, высокочувствителен к используемой siРНК ( $IC_{50} = 1.0$  нМ) и подавляется на 98% при концентрации 10 нМ (табл. 3, № 6).

Показана высокая эффективность набора 2-фтор-модифицированных антивирусных siРНК, нацеленных на ген *UL29* ВПГ-1, в эпителиальных клетках роговицы глаза человека [83]. Репликацию вируса удалось снизить на 99% при использовании полностью или частично модифицированных siРНК при концентрации 2.6 и 1.8 нМ соответственно, в то время как практически такая же эффективность немодифицированных siРНК достигалась при большей концентрации (5.5 нМ) (табл. 3, № 7).

Достаточно много работ посвящено использованию siРНК против ВПГ-2. Особое внимание уделено способам доставки siРНК.

Steinbach et al. [84] использовали siРНК для нокдауна нектина, рецепторного белка клетки-хозяина, необходимого для первоначального связывания и последующего распространения вируса. Показано, что siРНК в виде конъюгата с наночастицами PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid)) (si-NP) или в присутствии липофектина (si-LP) обеспечила подавление синтеза мРНК нектина в клетках HeLa до 80% при концентрации 100 нМ

**Таблица 4.** Малые интерферирующие РНК (siРНК) для подавления репликации ВПГ-2

№	Тип АО (трансфекционный агент)	Мишень (клетки <i>in vitro</i> , модель <i>in vivo</i> )	Ингибирование, % (концентрация, нМ)	Модель <i>in vitro/in vivo</i>	Ссылка
1	siРНК, Р=О (наночастицы PLGA или липофектин)	мРНК гена нектина	50–80 (100)	Клетки HeLa	[84]
			85–95 (0.5 нмоль на мышь)	Мыши C57BL/6	
2	Chol-siРНК, Р=S	мРНК гена нектина или гена, кодирующего белок UL29	97–98 (не указано)	Клетки NIH3T3	[85]
			Выживаемость 60–80 (2 нмоль/кг)	Мыши BALB/c	
3	siРНК, Р=О (олигофектамин)	мРНК гена, кодирующего белок UL29	96–98 (100)	Клетки NIH3T3 или Vero	[86]
			Выживаемость 75 (0.5 нмоль) <i>in vivo</i>	Трансгенные мыши	
4	Au-siРНК, Р=О	мРНК генов, кодирующих капсомер UL18.1 и ДНК-связывающий белок UL29.2	~100 (2–4)	Клетки Vero	[87]

(по siРНК). Интравагинальное введение si-NP и si-LP мышам (0.5 нмоль на мышь) привело к увеличению выживаемости зараженных мышей и уменьшению показателей клинического расстройства, а подавление экспрессии мРНК нектина достигал 85–95% (табл. 4, № 1).

В работе Wu et al. [85] использование тиофосфатных siРНК, конъюгированных с холестерином (chol-siРНК) и направленных на ген нектина или белка UL29, привело к 97–98%-ному подавлению репликации ВПГ-2 *in vitro*. Интравагинальное введение chol-siРНК защищало мышей от ВПГ-2 в течение недели, независимо от того, вводили препарат до или после заражения. При концентрации 2 нмоль/кг использование chol-siРНК повышало выживаемость мышей до 60–80% (табл. 4, № 2).

Palliser et al. [86] использовали siРНК, конъюгированные с олигофектамином и нацеленные на мРНК генов UL5, UL27 и UL29 ВПГ-2 (кодирующих, соответственно, комплекс геликаза–праймаза, гликопротеин В оболочки и ДНК-связывающий белок). Показано, что наиболее эффективная siРНК UL29 в клеточной системе подавляет вирусную репликацию на 96–98% при концентрации 100 нМ. На трансгенных мышях, несущих ген GFP, показано, что интравагинальное введение siРНК UL29 (0.5 нмоль) улучшает выживаемость мышей до 75%, причем у выживших мышей не наблюдалось клинических проявлений заболевания (табл. 4, № 3).

Palliser et al. [87] показали, что siРНК, конъюгированные с наночастицами золота и направленные на различные гены ВПГ-2, представляют собой многообещающую платформу для разра-

ботки новых противоинфекционных препаратов. В этом случае нет необходимости в дополнительном трансфекционном агенте для доставки siРНК в клетки. В работе использованы siРНК, направленные на гены, кодирующие капсид UL18.1 и ДНК-связывающий белок UL29.2. Оба препарата практически полностью ингибировали репликацию ВПГ-2 в культуре клеток при концентрации 2–4 нМ (табл. 4, № 4), в отличие от полностью неактивных siРНК, не связанных с золотом.

Curtie et al. [88] разработали наноноситель на основе полисукцинимиды, метоксиполиэтиленгликоля и пиренметиламина (РРАР) для доставки siРНК. На примере нокдауна гена домашнего хозяйства GAPDH (~97%) показано потенциальное применение РРАР-siРНК для интравагинальной доставки siРНК для борьбы с инфекциями, передающимися половым путем.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Герпес – хроническая вирусная инфекция. При попадании в организм человека вирус простого герпеса сохраняется там на всю жизнь. Избавиться от него навсегда, к сожалению, невозможно, поскольку вирус остается в нервных клетках в латентном состоянии и при определенных условиях (например, при снижении иммунитета, простуде, стрессе и т.д.) реактивируется и снова начинает размножаться.

Появление штаммов ВПГ, устойчивых к применяемым в настоящее время нуклеозидным препаратам, а также токсическое действие этих препаратов делают поиск альтернативных методов лечения актуальной задачей. Разработка методов

с использованием антисенс-технологии – перспективный шаг в данном направлении. Успех этой стратегии зависит как от эффективной системы доставки в клетки, так и от выбора подходящей мишени.

Терапевтические нуклеиновые кислоты, рассмотренные в данном обзоре в качестве перспективных препаратов против ВПГ, действуют на мРНК, продукт транскрипции вирусной ДНК.

Разброс данных об эффективности применения тех или иных антисенс-реагентов связан с несколькими причинами:

- антисенс-реагенты направлены на различные участки разных генов;
- применяли антисенс-реагенты, модифицированные различным образом;
- использовали разные дозы при заражении вирусами;
- исследовали воздействие антисенс-реагентов на разных этапах заражения;
- применяли разные способы доставки антисенс-реагентов в клетки;
- использовали разные модели (клетки или животные).

Тем не менее можно сделать несколько общих выводов.

В качестве мишеней для антисенс-реагентов почти всегда используются мРНК немедленно-ранних генов (*IE*), в частности генов белков ICP (Infected Cell Polypeptides), причем чаще всего используются сайты инициации трансляции этих генов, включающих иницирующий кодон AUG. Акцепторные сайты сплайсинга IE-транскриптов – также часто используемые мишени.

Олигонуклеотиды с природными фосфодиэфирными межнуклеотидными группами практически неэффективны без дополнительных приемов, обеспечивающих их доставку в клетки (например, использование трансфекционных агентов или конъюгирование с определенными группировками). Чаще всего используются частично или полностью модифицированные олигонуклеотиды с тиофосфатными межнуклеотидными группами.

В самых ранних работах для достижения ощутимого противовирусного эффекта часто использовались олигонуклеотиды в очень высокой концентрации (вплоть до 100 или даже 500 мкМ, см. табл. 1, № 2), хотя в некоторых случаях хорошие результаты (до 100% ингибирования) были получены при использовании меньших, но все же микромолярных концентраций (например, табл. 1, № 7, 8 и 10).

В большинстве случаев описано использование антисмысловых олигонуклеотидов для подав-

ления репликации ВПГ-1. Что касается ВПГ-2, то, как правило, эти исследования – продолжение работ, касающихся ВПГ-1. В некоторых случаях для подавления репликации обоих вирусов используется один и тот же олигонуклеотид, поскольку нуклеотидные последовательности генов-мишеней у обоих типов вирусов гомологичны (см., например, работы Shoji et al. [59] (табл. 1, № 7 и табл. 2, № 2) и Draper et al. [66] (табл. 1, № 15 и табл. 2, № 3).

Следует отметить, что в последние годы для борьбы с герпес-вирусными инфекциями почти не используются АО или их аналоги в качестве агентов для непосредственного воздействия на вирусы. Однако появились работы по успешному использованию АО для воздействия на TNF- $\alpha$ , который играет роль в иммунопатологии и репликации вируса в модели острого ретинита, вызванного ВПГ-1 (например, [89–91]).

Достаточно много работ посвящено применению siРНК против ВПГ-1 и ВПГ-2, причем как в исследованиях *in vitro*, так и *in vivo*. Внимание исследователей в последние годы переключилось на siРНК, которые используются для подавления репликации не только вирусов герпеса, но и других вирусов, а также для воздействия на гены, ответственные за другие заболевания (онкологические наследственные, нейродегенеративные и др.).

Большое значение в последние годы придается решению проблемы доставки АО и siРНК в клетки. Эта проблема особенно сложна в случае борьбы с ВПГ-2 и другими инфекциями, передаваемыми половым путем. При разработке эффективной системы доставки следует учитывать различные физиологические барьеры, такие как pH и эпителий влагалища, препятствующих проникновению siРНК в клетки при местном применении [76].

Необходимо подчеркнуть, что siРНК используются в гораздо меньших (наномолярных) концентрациях по сравнению с микромолярными концентрациями АО, что свидетельствует об экономической целесообразности использования siРНК, несмотря на их более высокую стоимость по сравнению с АО.

Во всех работах отмечается селективность действия АО и siРНК, т.е. противовирусный эффект достигается исключительно агентами, комплементарными выбранным мРНК-мишеням. Таким образом, подтверждается антисенс-механизм воздействия на вирусный геном. Кроме того, показано, что используемые препараты в рабочих концентрациях не токсичны *in vitro* и *in vivo*.

В целом на основании литературных данных, рассмотренных в данном обзоре, можно сделать вывод о перспективности использования тера-

пептических нуклеиновых кислот для борьбы с герпес-вирусными инфекциями. Антисенс-терапия в настоящее время проходит клиническую оценку; это способствует масштабным исследованиям, и можно надеяться на ощутимые успехи этого направления в отношении не только вирусных инфекций, но и других заболеваний, ассоциированных с нуклеиновыми кислотами.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00184).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описание исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Connolly S.A., Jackson J.O., Jardtzyk T., Longnecker R.* // Nat. Rev. Microbiol. 2011. V. 9. P. 369–381. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2548>
2. *Crooke R.M., Hoke G.D., Shoemaker J.E.* // Antimicrob. Agents Chemother. 1992. V. 36. P. 527–532. <https://doi.org/10.1128/AAC.36.3.527>
3. *Spear P.G., Longnecker R.* // J. Virology. 2003. V. 77. P. 10179–10185. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.19.10179-10185.2003>
4. Всемирная организация здравоохранения. Вирус простого герпеса. <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>
5. *Knipe D.M., Raja P., Lee J.S.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. P. 11993–11994. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516224112>
6. *Zhu S., Viejo-Borbolla A.* // Virulence. 2021. V. 12. P. 2670–2702. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1982373>
7. *McGeoch D.J., Rixon F.J., Davison A.J.* // Virus Res. 2006. V. 117. P. 90–104. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.01.002>
8. *Roizman B., Knipe D.M., Whitley R.J.* // Herpes Simplex Viruses. Fields Virology / Eds. Knipe D.M., Howley P.M. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
9. *Sedlackova L., Rice S.A.* // J. Virol. 2008. V. 82. P. 1268–1277. <https://doi.org/10.1128/JVI.01588-07>
10. *Peyman A., Helsberg M., Kretzschmar G., Mag M., Grabley S., Uhlmann E.* // Biol. Chem. Hoppe Seyler. 1995. V. 376. P. 195–198. <https://doi.org/10.1515/bchm3.1995.376.3.195>
11. *Field H.J.* // J. Clin. Virol. 2001. V. 21. P. 261–269. [https://doi.org/10.1016/s1386-6532\(00\)00169-4](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(00)00169-4)
12. *Breeden C.J., Hall T.C., Tyler H.R.* // Ann. Intern. Med. 1966. V. 65. P. 1050–1056. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-65-5-1050>
13. *Shigeta S., Mori S., Kira T., Takahashi K., Kodama E., Konno K., Nagata T., Kato H., Wakayama T., Koike N., Saneyoshi M.* // Antivir. Chem. Chemother. 1999. V. 10. P. 195–209. <https://doi.org/10.1177/095632029901000404>
14. *Chan P.C., Wu C.Y., Chang W.Y., Chang W.T., Alaudin M., Liu R.S., Lin W.J., Chen F.D., Chen C.L., Wang H.E.* // Nucl. Med. Biol. 2011. V. 38. P. 987–995. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2011.04.003>
15. *Lalut J., Tripoteau L., Marty C., Bares H., Bourgougnon N., Felpin F.X.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2012. V. 22. P. 7461–7464. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.10.047>
16. *Thomson C., Whitley R.* // Adv. Exp. Med. Biol. 2011. V. 697. P. 221–230. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7185-2\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7185-2_15)
17. *Chong E.M., Wilhelmus K.R., Matoba A.Y., Jones D.B., Coats D.K., Paysse E.A.* // Am. J. Ophthalmol. 2004. V. 138. P. 474–475. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2004.04.027>
18. *Elion G.B.* // Am. J. Med. 1982. V. 73. P. 7–13. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(82\)90055-9](https://doi.org/10.1016/0002-9343(82)90055-9)
19. *Furman P.A., St Clair M.H., Spector T.* // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. P. 9575–9579.
20. *Chen D., Liu Y., Zhang F., You Q., Ma W., Wu J.* // Microbiol. Spectr. V. 9. P. e00646-21. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00646-21>
21. *Sadowski L.A., Upadhyay R., Greeley Z.W., Margulies B.J.* // Viruses. 2021. V. 13. P. 1228. <https://doi.org/10.3390/v13071228>
22. *Lazarus H.M., Belanger R., Candoni A., Aoun M., Jurewicz R., Marks L.* // Antimicrob. Agents Chemother. 1999. V. 43. P. 1192–1197. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.5.1192>
23. *Jung D., Dorr A.* // J. Clin. Pharmacol. 1999. V. 39. P. 800–804. <https://doi.org/10.1177/00912709922008452>
24. *De Clercq E., Andrei G., Snoeck R., De Bolle L., Naesens L., Degreè B., Balzarini J., Zhang Y., Schols D., Leyssen P., Ying C., Neyts J.* // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2001. V. 20. P. 271–285. <https://doi.org/10.1081/NCN-100002298>
25. *Birkmann A., Zimmermann H.* // Curr. Opin. Virol. 2016. V. 18. P. 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.01.013>
26. *Meier P., Dautheville-Guibal S., Ronco P.M., Rossert J.* // Nephrol. Dial. Transplant. 2002. V. 17. P. 148–149. <https://doi.org/10.1093/ndt/17.1.148>
27. *Ahmed A.* // Infect. Disord. Drug Targets. 2011. V. 11. P. 475–503. <https://doi.org/10.2174/187152611797636640>

28. *Griffiths P., Lumley S.* // *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2014. V. 27. P. 554–559.  
<https://doi.org/10.1097/QCO.000000000000107>
29. *Aduma P., Connelly M.C., Srinivas R.V., Fridland A.* // *Mol. Pharmacol.* 1995. V. 47. P. 816–822.
30. *Hagedorn P.H., Yakimov V., Ottosen S., Kammler S., Nielsen N.F., Hög A.M., Hedtjärn M., Meldgaard M., Møller M.R., Orum H., Koch T., Lindow M.* // *Nucleic Acid Ther.* 2013. V. 23. P. 302–310.  
<https://doi.org/10.1089/nat.2013.0436>
31. *Mescalchin A., Restle T.* // *Molecules.* 2011. V. 16. P. 1271–1296.  
<https://doi.org/10.3390/molecules16021271>
32. *Belikova A.M., Zarytova V.F., Grineva N.I.* // *Tetrahedron Lett.* 1967. V. 37. P. 3557–3562.  
[https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(01\)89794-x](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(01)89794-x)
33. *Zamecnik P., Stephenson M.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1978. V. 75. P. 280–284.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.75.1.280>
34. *Bennett C.F.* // *Annu. Rev. Med.* 2019. V. 70. P. 307–321.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-med-041217-010829>
35. *Shen X., Corey D.R.* // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. P. 1584–1600.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx1239>
36. *Havens M.A., Hastings M.L.* // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. P. 6549–6563.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw533>
37. *Castanotto D., Stein C.A.* // *Curr. Opin. Oncol.* 2014. V. 26. P. 584–589.  
<https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000127>
38. *Hnik P., Boyer D.S., Grillone L.R., Clement J.G., Henry S.P., Green E.A.* // *J. Diabetes Sci. Technol.* 2009. V. 3. P. 924–930.  
<https://doi.org/10.1177/193229680900300440>
39. *Amado D.A., Davidson B.L.* // *Mol. Ther.* 2021. V. 29. P. 345–358.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.04.008>
40. *Seguin R.M., Ferrary N.* // *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2009. V. 18. P. 1505–1517.  
<https://doi.org/10.1517/13543780903179294>
41. *Roman-Blas J.A., Jimenez S.A.* // *Osteoarthritis Cartilage.* 2006. V. 14. P. 839–848.  
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2006.04.008>
42. *Matzen K., Elzaouk L., Matskevich A.A., Nitzsche A., Heinrich J., Moelling K.* // *Nat. Biotechnol.* 2007. V. 25. P. 669–674.  
<https://doi.org/10.1038/nbt1311>
43. *Janssen H.L.A., Reesink H.W., Lawitz E.J., Zeuzem S., Rodriguez-Torres M., Patel K., van der Meer A.J., Patrick A.K., Chen A., Zhou Y., Persson R., King B.D., Kauppinen S., Levin A.A., Hodges M.R.* // *N. Engl. J. Med.* 2013. V. 368. P. 1685–1694.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1209026>
44. *Wong J.P., Christopher M.E., Salazar A.M., Sun L.Q., Viswanathan S., Wang M., Saravolac E.G., Cairns M.J.* // *Front. Biosci. Schol.* 2010. V. 2. P. 791–800.  
<https://doi.org/10.2741/s102>
45. *Ge Q., Pастey M., Kobasa D., Puthavathana P., Lupfer C., Bestwick R.K., Iversen P.L., Chen J., Stein D.A.* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006. V. 50. P. 3724–3733.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00644-06>
46. *Zhang T., Wang T., Zhao P., Liang M., Gao Y., Yang S., Qin C., Wang C., Xia X.* // *Int. Immunopharmacol.* 2011. V. 11. P. 2057–2061.  
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.08.019>
47. *Levina A.S., Repkova M.N., Ismagilov Z.R., Shikina N.V., Malygin E.G., Mazurkova N.A., Zinov'ev V.V., Evdokimov A.A., Baiborodin S.I., Zarytova V.F.* // *Sci. Rep.* 2012. V. 2. P. 256.  
<https://doi.org/10.1038/srep00756>
48. *Levina A.S., Repkova M.N., Bessudnova E.V., Filippova E.I., Mazurkova N.A., Zarytova V.F.* // *Beilstein J. Nanotechnol.* 2016. V. 7. P. 1166–1173.  
<https://doi.org/10.3762/bjnano.7.108>
49. *Perry C.M., Balfour J.A.* // *Drugs.* 1999. V. 57. P. 375–380.  
<https://doi.org/10.2165/00003495-199957030-00010>
50. *Yu A.M., Tu M.J.* // *Pharmacol. Ther.* 2022. V. 230. P. 107967.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107967>
51. *Cantin E.M., Podsakoff G., Willey D.E., Openshaw H.* // *Adv. Exp. Med. Biol.* 1992. V. 312. P. 139–149.  
<https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3462-4>
52. *Aurelian L., Smith C.C.* // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2000. V. 10. P. 77–85.  
<https://doi.org/10.1089/oli.1.2000.10.77>
53. *Kulka M., Wachsman M., Miura S., Fischelevich R., Miller P.S., Ts'o P.O., Aurelian L.* // *Antiviral. Res.* 1993. V. 20. P. 115–130.  
[https://doi.org/10.1016/0166-3542\(93\)90002-z](https://doi.org/10.1016/0166-3542(93)90002-z)
54. *Kulka M., Smith C.C., Levis J., Fischelevich R., Hunter J.C., Cushman C.D., Miller P.S., Ts'o P.O.* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994. V. 38. P. 675–680.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.38.4.675>
55. *Blumenfeld M., Meguenni S., Poddevin B., Vasseur M.* // *WO1995004141A1*, 09.02.1995.
56. *Peyman A., Helsberg M., Kretzschmar G., Mag M., Ryte A., Uhlmann E.* // *Antivir. Res.* 1997. V. 33. P. 135–139.  
[https://doi.org/10.1016/s0166-3542\(96\)01003-0](https://doi.org/10.1016/s0166-3542(96)01003-0)
57. *Birch-Hirschfeld E., Knorre C.M., Stelzner A., Schmidtke M.* // *Nucleos. Nucleot.* 1997. V. 16. P. 623–628.  
<https://doi.org/10.1080/07328319708002926>
58. *Shoji Y., Shimada J., Mizushima Y., Iwasawa A., Nakamura Y., Inouye K., Azuma T., Sakurai M., Nishimura T.* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996. V. 40. P. 1670–1675.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.40.7.1670>
59. *Shoji Y., Norimatsu M., Shimada J., Mizushima Y.* // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1998. V. 8. P. 255–263.  
<https://doi.org/10.1089/oli.1.1998.8.255>
60. *Shoji Y., Ishige H., Tamura N., Iwatani W., Norimatsu M., Shimada J., Mizushima Y.* // *J. Drug Target* 1998. V. 5.

- P. 261–273.  
<https://doi.org/0.3109/10611869808995880>
61. *Vinogradov S.V., Suzdaltseva Y., Alakhov V.Y., Kabanov A.V.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994. V. 203. P. 959–966.  
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2275>
  62. *Clusel C., Meguenni S., Elias I., Vasseur M., Blumenfeld M.* // *Gene Expr.* 1995. V. 4. P. 301–309.
  63. *Jacob A., Duval-Valentin G., Ingrand D., Thuong N.T.* // *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 216. P. 19–24.  
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18111.x>
  64. *Chiba A., Ogasawara M., Yoshida I., Knox Y.M., Suzutani T.* // *Tohoku J. Exp. Med.* 2000. V. 192. P. 141–149.  
<https://doi.org/doi/10.1620/tjem.192.141>
  65. *Hoke G.D., Draper K., Freier S.M., Gonzalez C., Driver V.B., Zounes M.C., Ecker D.J.* // *Nucleic Acids Res.* 1991. V. 19. P. 5743–5748.  
<https://doi.org/10.1093/nar/19.20.5743>
  66. *Draper K.G., Ecker D.J., Mirabelli C.K., Crooke S.T.* // Patent US 6310044 B1, publ. 30.10.2001.
  67. *Nelson M.H., Stein D.A., Kroeker A.D., Hatlevig S.A., Iversen P.L., Moulton H.M.* // *Bioconjug. Chem.* 2005. V. 16. P. 959–966.  
<https://doi.org/10.1021/bc0501045>
  68. *Patel D., Opriessnig T., Stein D.A., Halbur P.G., Meng X.J., Iversen P.L., Zhang Y.J.* // *Antiviral Res.* 2008. V. 77. P. 95–107.  
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.09.002>
  69. *Ge Q., McManus M.T., Nguyen T., Shen C.H., Sharp P.A., Eisen H.N., Chen J.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 2718–2723.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0437841100>
  70. *Moerdyk-Schauwecker M., Stein D.A., Eide K., Blouch R.E., Bildfell R., Iversen P., Jin L.* // *Antiviral Res.* 2009. V. 84. P. 131–141.  
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.07.020>
  71. *Smith C.C., Kulka M., Aurelian L.* // *Int. J. Oncol.* 2000. V. 17. P. 841–850.  
<https://doi.org/10.3892/ijo.17.4.841>
  72. *Eide K., Moerdyk-Schauwecker M., Stein D.A., Bildfell R., Koelle D.M., Jin L.* // *Antivir. Ther.* 2010. V. 15. P. 1141–1149.  
<https://doi.org/10.3851/IMP1694>
  73. *Wheeler L.A.* // *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2014. V. 2014. P. 125087.  
<https://doi.org/10.1155/2014/125087>
  74. *Katakowski J.A., Palliser D.* // *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2010. V. 12. P. 192–202.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20373263>
  75. *Manda V., Josyula V.R., Hariharapura R.C.* // *VirusDis.* 2019. V. 30. P. 180–185.  
<https://doi.org/10.1007/s13337-018-00508-z>
  76. *Baxi K., Sawarkar S., Momin M., Patel V., Fernandes T.* // *Drug Del. Transl. Res.* 2020. V. 10. P. 962–974.  
<https://doi.org/10.1007/s13346-020-00741-4>
  77. *Mollaei H., Monavari S., Arabzadeh S., Shahrabadi M.S., Fazlalipour M.* // *J. Antivir. Antiretrovir.* 2014. V. 6. P. 114–119.  
<https://doi.org/10.4172/JAA.10000106>
  78. *Jbara-Agbaria D., Blondzik S., Burger-Kentischer A., Agbaria M., Nordling-David M.M., Giterman A., Aizik G., Rupp S., Golomb G.* // *Pharmaceutics.* 2022. V. 14. P. 633.  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030633>
  79. *Song B., Liu X., Wang Q., Zhang R., Yang T., Han Z., Xu Y.* // *J. Neurovirol.* 2016. V. 22. P. 799–807.  
<https://doi.org/10.1007/s13365-016-0453-4>
  80. *Paavilainen H., Lehtinen J., Romanovskaya A., Nygårdas M., Bamford D.H., Poranen M.M., Hukkanen V.* // *J. Med. Virol.* 2016. V. 88. P. 2196–2205.  
<https://doi.org/10.1002/jmv.24578>
  81. *Paavilainen H., Lehtinen J., Romanovskaya A., Nygårdas M., Bamford D.H., Poranen M.M., Hukkanen V.* // *Antivir. Ther.* 2017. V. 22. P. 631–637.  
<https://doi.org/10.3851/IMP3153>
  82. *Kalke K., Lehtinen J., Gnjatovic J., Lund L.M., Nyman M.C., Paavilainen H., Orpana J., Lasanen T., Frejborg F., Levanova A.A., Vuorinen T., Poranen M.M., Hukkanen V.* // *Viruses.* 2020. V. 12. P. 1434.  
<https://doi.org/10.3390/v12121434>
  83. *Kalke K., Lund L.M., Nyman M.C., Levanova A.A., Urtti A., Poranen M.M., Hukkanen V., Paavilainen H.* // *PLoS Pathog.* 2022. V. 18. e1010688.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010688>
  84. *Steinbach J.M., Weller C.E., Booth C.J., Saltzman W.M.* // *J. Control. Release.* 2012. V. 162. P. 102–110.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.008>
  85. *Wu Y., Navarro F., Lal A., Basar E., Pandey R.K., Manoharan M., Feng Y., Lee S.J., Lieberman J., Palliser D.* // *Cell Host Microbe.* 2009. V. 5. P. 84–94.  
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.12.003>
  86. *Palliser D., Chowdhury D., Wang Q.Y., Lee S.J., Bronson R.T., Knipe D.M., Lieberman J.* // *Nature.* 2006. V. 439. P. 89–94.  
<https://doi.org/10.1038/nature04263>
  87. *Wolff N., Kollenda S., Klein K., Loza K., Heggen M., Brochhagen L., Witzke O., Krawczyk A., Hilger I., Epple M.* // *Nanoscale Adv.* 2022. V. 4. P. 4502–4516.  
<https://doi.org/10.1039/d2na00250g>
  88. *Currie S., Kim S., Gu X., Ren X., Lin F., Liu S., Yang C., Kim J., Liu S.* // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2020. V. 196. P. 111287.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111287>
  89. *Grajewski R.S., Li J., Wasmuth S., Hennig M., Bauer D., Heiligenhaus A.* // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2012. V. 250. P. 231–238.  
<https://doi.org/10.1007/s00417-011-1840-4>
  90. *Li J., Wasmuth S., Bauer D., Baehler H., Hennig M., Heiligenhaus A.* // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2008. V. 246. P. 1265–1273.  
<https://doi.org/10.1007/s00417-008-0839-y>
  91. *Mei H., Xing Y., Yang J., Wang A., Xu Y., Heiligenhaus A.* // *Pathobiology.* 2009. V. 76. P. 45–50.  
<https://doi.org/10.1159/000178155>

## Therapeutic Nucleic Acids against Herpes Simplex Viruses

A. S. Levina\*., #, M. N. Repkova\*, and V. F. Zarytova\*

#Phone +7 (913) 756-76-93; e-mail: asl1032@yandex.ru

\*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, pr. Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

The Herpes simplex virus (HSV) causes a wide range of diseases, ranging from relatively mild primary skin lesions to severe and often fatal episodes of encephalitis. Currently, the most effective drugs for HSV-infected people are nucleoside analogs (e.g., acyclovir) targeting enzymes encoded by viral DNA. The effectiveness of nucleoside analogs is reduced because of poor solubility in water, rapid intracellular catabolism, high cellular toxicity, and the appearance of resistant viral strains. Antisense technology that exploits nucleic acid fragments (NA-based agents) is a promising alternative to antiviral therapy due to the high affinity of these agents to target nucleic acids, their high solubility in water, and lower cellular toxicity. In the last decade, antisense oligonucleotides have been investigated as potential drugs for various diseases associated with "harmful" nucleic acids. Oligonucleotides with different chemical modifications targeted at specific regions of the HSV genome have shown effectiveness in suppressing the virus. siRNA-based agents have demonstrated prolonged and effective (up to 99%) inhibition of HSV replication. Based on the publications reviewed in the review over the past 30 years, it can be concluded about the prospects of using NA-based agents to combat herpes viral infections.

*Keywords: nucleoside analogs, antisense oligonucleotides, siRNA, HSV-1, HSV-2*