

ПЕРВИЧНЫЙ СКРИНИНГ ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ИММУНОСУПРЕССОРНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ НА ЛИМФОЦИТАХ СЕЛЕЗЕНКИ В МОДЕЛИ *IN VITRO*

Гаврилова Е.Д.^{1,2}, Гойман Е.В.^{1,2}, Держалова А.Ш.¹, Стеценко Д.А.^{1,3},
Буракова Е.А.^{1,3}

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

³ ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Контроль за иммунными реакциями, протекающими в организме при трансплантации клеток, тканей или органов, в том числе для снижения негативных последствий при острой форме болезни «трансплантат против хозяина» (РТПХ), развивающейся при пересадке костного мозга, является актуальной задачей на сегодняшний день в клинической практике. В этой связи перспективным направлением является управление иммунологической толерантностью и способность иммунных клеток, в частности дендритных, индуцировать ее в моделях отторжения аллогенного трансплантата, РТПХ и аутоиммунных расстройств. Вот почему важен поиск соединений, способных эффективно активировать или подавлять иммунные клетки и регулировать иммунологическую толерантность. Целью настоящей работы было изучение влияния синтетических иммуносупрессорных олигодезоксинуклеотидов (INH-ODN) на пролиферацию спленоцитов и продукцию IL-12 *in vitro* для отбора наиболее перспективных для дальнейших экспериментов *in vivo*. Для исследования были синтезированы иммуносупрессорные тиофосфатные олигодезоксинуклеотиды (A151, ODN2088 и ODN4084-F), которые включают G-богатые участки, а также их аналоги – тиофосфатные олигодезоксинуклеотиды с мезилфосфорамидными (μ) модификациями по GrG связям (μ -A151, μ -ODN2088 и μ -ODN4084-F). Эффекты химически модифицированных олигонуклеотидов оценивали на модели CpG-стимулированных спленоцитов *in vitro*. Первичный скрининг иммуносупрессорных олигонуклеотидов в культуре *in vitro* по их влиянию на пролиферацию спленоцитов и продукцию IL-12 позво-

Адрес для переписки:

Гаврилова Елена Давидовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск,
ул. Ядринцевская, 14, каб. 215.
Тел.: 8 (383) 222-04-38.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: edav.gavr@mail.ru

Address for correspondence:

Elena D. Gavrilova
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
14 Yadrinsevskaya St, Room 215
Novosibirsk
630099 Russian Federation
Phone: +7 (383) 222-04-38.
Fax: +7 (383) 222-70-28.
E-mail: edav.gavr@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Д. Гаврилова, Е.В. Гойман, А.Ш. Держалова,
Д.А. Стеценко, Е.А. Буракова «Первичный скрининг
химически модифицированных иммуносупрессорных
олигонуклеотидов на лимфоцитах селезенки в модели
in vitro» // Российский иммунологический журнал, 2025.
Т. 28, № 1. С. 25-32.
doi: 10.46235/1028-7221-16962-PSO

© Гаврилова Е.Д. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.D. Gavrilova, E.V. Goiman, A.Sh. Derzalova,
D.A. Stetsenko, E.A. Burakova "Primary screening
of chemically modified immunosuppressive oligonucleotides
using *in vitro* model with spleen lymphocytes", *Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal*, 2025,
Vol. 28, no. 1, pp. 25-32.
doi: 10.46235/1028-7221-16962-PSO

© Gavrilova E.D. et al., 2025

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16962-PSO

лил выделить несколько наиболее активных соединений и определить характер последовательности с наиболее выраженными иммунодепрессивными свойствами.

Ключевые слова: иммунологическая толерантность, реакция «трансплантат против хозяина», аутоиммунные заболевания, антагонисты TLR9, иммуносупрессорные олигонуклеотиды, регуляторные T-клетки, аналоги ДНК

PRIMARY SCREENING OF CHEMICALLY MODIFIED IMMUNOSUPPRESSIVE OLIGONUCLEOTIDES USING *IN VITRO* MODEL WITH SPLEEN LYMPHOCYTES

Gavrilova E.D.^{a, b}, Goiman E.V.^{a, b}, Derzalova A.Sh.^a, Stetsenko D.A.^{a, c}, Burakova E.A.^{a, c}

^a Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

^b Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

^c Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Control of immune response following transplantation of cells, tissues, or organs includes reduction negative effects caused by acute graft-versus-host disease (GVHD) developing during bone marrow transplantation, thus being an urgent task of modern clinical practice. In this view, the management of immunological tolerance is a promising approach, in particular, the ability of immune cells (especially, dendritic cells) to induce this response using experimental models of allogeneic transplant rejection, GVHD and autoimmune disorders. Therefore, the search for compounds that can effectively activate or suppress immune cells and regulate immunological tolerance is of importance. The purpose of this work was to study the effects of synthetic immunosuppressive oligodeoxynucleotides (INH-ODN) on *in vitro* splenocyte proliferation and IL-12 production, in order to select the most promising compounds for subsequent *in vivo* experiments. We have tested several immunosuppressive agents: thiophosphate oligodeoxynucleotides (A151, ODN2088 and ODN4084-F), which include G-rich regions, as well as their analogues, i.e., thiophosphate oligodeoxynucleotides with mesylphosphoramidate (μ) modifications at GpG bonds (μ -A151, μ -ODN2088 and μ -ODN4084-F). The effects of chemically modified oligonucleotides were assessed in the *in vitro* model of CpG-stimulated splenocytes, using CpG-ODN SD-101 in its complete thiophosphate (PS) version. Primary *in vitro* screening of immunosuppressive oligonucleotides by their effect on splenocyte proliferation and IL-12 production enabled us to identify the most active compounds and determine the features of sequences with the most pronounced immunosuppressive properties, as well as establish optimal concentrations of the studied oligodeoxynucleotides selected for subsequent *in vivo* studies.

Keywords: immune tolerance, graft-versus-host disease, autoimmune disorders, TLR9 antagonists, immunosuppressive oligonucleotides, regulatory T cells, DNA analogues

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (соглашение № 23-23-00487).

Введение

Управление иммунологической толерантностью является актуальной задачей для решения проблем, связанных с контролем иммунных реакций при трансплантации клеток, тканей или органов, в том числе для контроля острой формы реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ),

являющейся главной причиной смертности при пересадке костного мозга [6]. Так, широкое использование аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеточных клеток ограничено в связи с развитием у 40-60% реципиентов осложнения в виде острой или хронической РТПХ, несмотря на улучшение режимов трансплантации и профилактики осложнений [14]. Современные подходы к профилактике РТПХ основаны на истощении донорских лимфоцитов/ T-клеток или общей иммуносупрессии, что неэф-

фактивно для предотвращения РТПХ. Ключевую роль в патофизиологии РТПХ играют дендритные клетки (ДК). В качестве мощных антиген-презентирующих клеток ДК составляют наиболее гетерогенную клеточную популяцию со значительной клеточной фенотипической и функциональной пластичностью, способностью инициировать развитие как иммунитета, так и толерантности, что позволяет рассматривать их в качестве подходящего объекта для иммунотерапевтического воздействия [4, 7, 8, 9, 12, 13]. Способность ДК индуцировать толерантность привела к терапевтическим исследованиям с использованием этих клеток с целью контроля иммунных реакций на моделях отторжения аллотрансплантата, РТПХ и аутоиммунных расстройств [4].

В последние годы накопилось достаточно разнообразных данных, которые позволяют прогнозировать положительный эффект от использования иммуносупрессорных олигонуклеотидов – антагонистов TLR9 при острой РТПХ. Хотя активные последовательности INH-ODN известны из литературы [5], ключ к возможному клиническому применению данных олигонуклеотидов лежит в их химической модификации с целью обеспечить продолжительный биологический эффект *in vivo*. Впервые полученные нами олигонуклеотиды с мезилфосфорамидными группами (μ -ODN), успешно проявившие себя в роли антисмысловых регуляторов экспрессии генов [10, 11], а также показавшие высокую иммуностимуляторную активность *in vitro* [2], в зависимости от нуклеотидного контекста могут также проявлять иммуносупрессорную активность. Однако выбор только одной из доступных групп – тиофосфатной (PS) или мезилфосфорамидной (μ), как представляется, не в полной мере отвечает задаче создания реально действующего лекарственного препарата. Широко известна токсичность PS-олигонуклеотидов. В то же время μ -ODN для наиболее полного проявления своих преимуществ нуждаются в средствах доставки, таких как катионные липосомы [11]. Выходом из такой ситуации представляется сочетание в одном олигонуклеотиде и тиофосфатных, и мезилфосфорамидных групп. Эта идея недавно нашла свое подтверждение, когда олигонуклеотиды со смешанным набором фосфатных модификаций оказались наиболее активными [3].

Таким образом, представляется обоснованным выбор олигонуклеотидов со смешанным набором фосфатных модификаций (тиофосфатных и мезилфосфорамидных групп) как перспективного объекта исследования в области создания иммуносупрессорных олигонуклеотидов. В данном исследовании ODN с μ -модификациями изучались как потенциальные иммуносупрессоры

in vitro для применения при РТПХ в дальнейшем. Одним из наиболее значимых результатов может стать создание иммуносупрессорных олигонуклеотидов нового типа с более выраженным и пролонгированным эффектом и меньшей токсичностью, чем у традиционных тиофосфатных производных, для использования при развитии острой РТПХ после пересадки костного мозга.

Материалы и методы

Олигонуклеотиды были синтезированы на автоматическом синтезаторе ДНК ASM-800E (ООО «Биоссет», г. Новосибирск, Россия) с использованием стандартных β -цианэтильных амидофосфитов дезоксинуклеозидов и соответствующих полимерных носителей с привитыми 3'-нуклеозидами на основе пористого стекла (CPG). Синтез олигонуклеотидов с модифицированными фосфатными группами проводили с изменением в протоколе амидофосфитного синтеза, включающего замену окисления иодом. Тиофосфаты (PS-ODN) получали реакцией тионирования с использованием Sulfurizing Reagent II (3-((диметиламиноэтилиден)амино)-3H-1,2,4-дигидро-3-тион) (Glen Research, США). Олигодезоксинуклеотиды с мезилфосфорамидными модификациями (μ -ODN) получали реакцией Штаудингера с метансульфонилазидом (мезилазидом) в течение 30 мин, как описано в работе [10].

Очищенные олигонуклеотиды растворяли в 50%-ном ацетонитриле и определяли концентрацию по оптической плотности раствора с помощью УФ-спектрофотометра Implen NanoPhotometer N80 (Implen, Германия). Электрофорез для определения чистоты олигонуклеотидов проводили в 20% ПААГ толщиной 0,4 мм. Визуализация полос проводилась окрашиванием геля красителем Stains-All.

Работа *in vitro* проведена на лимфоцитах селезенки (спленоцитах) мышей линии C57Bl6, самки. Пролиферативную активность лимфоцитов селезенки оценивали с помощью WST-1 cell proliferation assay Kit (Takara Bio USA, США).

Оценка секреции IL-12p70 лимфоцитами селезенки на фоне добавления INH-ODN была проведена иммуноферментным методом (Mouse IL-12p70 ELISA kit, ABclonal, Китай). После совместного культивирования клеток в 96-луночный круглодонный планшет (0,7 × 10⁶ клеток в лунке) с CpG-ODN в концентрации 2,5 мкг/мл в стандартных условиях (T = 37 °C, 5% CO₂), через 2 ч добавляли INH-ODN в концентрациях 2,5 мкг/мл и 5 мкг/мл. Через 24 ч отбирали супернатанты и измеряли уровень цитокинов на мультимодальном планшетном ридере LB 941 TriStar (Berthold Technologies, Германия), при длинах

волн 450 нм и 620 нм согласно рекомендациям производителя.

Модель CpG-стимулированной пролиферации спленоцитов *in vitro* проводили следующим способом: вносили клетки селезенки в 96-луночный плоскодонный планшет ($0,1 \times 10^6$ клеток в лунке) одновременно с CpG-ODN в концентрации 2,5 мкг/мл, через 2 ч добавляли INH-ODN в концентрации от 2,5 мкг/мл до 20 мкг/мл в триплексах. Через 72 ч в каждую лунку культурального планшета вносили 10 мкл WST-1, тщательно перемешивали, инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 4 ч в стандартных условиях (T = 37 °C, 5% CO₂, увлажненная атмосфера). После этого производилась детекция показателей оптического поглощения на мультимодальном планшетном ридере LB 941 TriStar (Berthold Technologies, Германия), при длинах волн 450 нм и 620 нм согласно рекомендациям производителя.

Полученные данные использовали для вычисления процента ингибиции:

$$\text{Аотн} = (1 - (\text{Аоо}/\text{Аок})) \times 100\%,$$

где Аоо – значение оптического поглощения для образца INH-ODN, Аок – значение оптического поглощения CpG-ODN.

Исследования повторяли в трех независимых экспериментах на спленоцитах мышей линии С57В16. Статистическую обработку проводили в пакете прикладных программ Statistica 6.0 для Windows. Данные представлены в виде средних значений. Для выявления значимых значений сравниваемых показателей использовали непараметрические критерии Манна–Уитни. Выявленные различий считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В качестве иммуносупрессорных олигодезоксинуклеотидов (INH-ODNs) были выбраны известные из литературы тиофосфатные олигодезоксинуклеотиды А151 (2), ODN 2088 (5) и ODN4084-F (8). Кроме того, были синтезированы их контроли, описанные в литературе, С151 (3), ODN2088С (7), также содержащие тиофосфатные (PS) межнуклеотидные группы. Иммуносупрессорные ODN выбранные в данной работе (2, 5 и 8) содержат G-богатые участки, и механизм их действия может включать образование G-квадруплекса [5], а как ранее нами показано, G-богатые μ -ODN способны образовывать G-квадруплексы, слабо отличающиеся по устойчивости от нативных [15]. На основе ингибиторных последовательностей А151, ODN2088, ODN4084-F были синтезированы аналоги – тиофосфатные олигодезоксинуклеотиды с мезилфосфорамидными (μ) модификациями по CpG-связям, а именно: олигодезоксинуклеоти-

ды μ -А151 (4), μ -ODN2088 (6) и μ -ODN4084-F (9). Для активации дендритных клеток был синтезирован контрольный иммуностимулирующий CpG-олигодезоксинуклеотид (CpG-ODN) SD-101 (1) в полностью тиофосфатном (PS) варианте.

Таким образом, в исследовании всего были синтезированы и использованы девять олигодезоксинуклеотидов, в том числе восемь из них – иммуносупрессорных: SD-101 PS (1) – 5't_sc_sg_sa_sa_sc_s g_st_st_s c_sg_sa_s a_sc_sg_s t_st_sc_s g_sa_sa_s c_sg_st_s t_sc_sg_s a_sa_st_s3'; А-151(2) – 5't_st_sa_s g_sg_sg_s t_st_sa_s g_sg_sg_s t_st_sa_s g_sg_sg_s t_st_sa_s g_sg_sg_s3'; С-151(3) – 5't_st_sc_s a_sa_sa_s t_st_sc_s a_sa_sa_s t_st_sc_s a_sa_sa_s t_st_sc_s a_sa_sa_s3'; μ -А151(4) – 5't_st_sa_s g^μg^μg^μ t_st_sa_s g^μg^μg^μ t_st_sa_s g^μg^μg^μ t_st_sa_s g^μg^μg^μ3'; ODN2088 (5) – 5't_sc_sc_s t_sg_sg_s c_sg_sg_sg_s a_sg_st_s3'; μ -ODN2088 (6) – 5't_sc_sc_s t_sg^μg^μ c_sg^μg^μg^μ a_sg_st_s3'; ODN2088С(7) – 5't_sc_sc_s t_sg_sa_s g_sc_st_s t_sg_sa_s a_sg_st_s3'; ODN4084-F (8) – 5'c_sc_st_s g_sg_sa_s t_sg_sg_s g_sa_sa_s 3'; μ -ODN4084-F (9) – 5'c_sc_st_s g_sg_sa_s t_sg^μg^μ g_sa_s3'.

Скрининг иммуносупрессорных свойств ингибиторных олигонуклеотидов INH-ODNs на CpG-стимулированную пролиферацию спленоцитов *in vitro* был проведен при добавлении INH-ODNs в дозах от 2,5 до 20 мкг/мл, чтобы варианты соотношений CpG-ODN: INH-ODN составляли 1:1, 1:2, 1:4, 1:8.

Для оценки пролиферативной активности спленоцитов мы выбрали метод с использованием соли тетразолия (WST-1). В отличие от метода с использованием радиоактивной метки (НЗ-тимидин) этот способ оценки является абсолютно безопасным, а в сравнении с другими красителями WST используется без дополнительных стадий при добавлении в культуру клеток и показывает лучшую воспроизводимость и более высокую чувствительность [1]. Данные по сумме трех независимых экспериментов представлены в таблице 1. По измеренной оптической плотности подсчитан уровень ингибиции для каждого из ODNs по формуле, приведенной в материалах и методах, и представлен в процентах.

Как видно из таблицы 1, из всех исследуемых ODN олигонуклеотиды А151 (2) и ODN4084 (8), описанные в литературе, проявляют наиболее сильную ингибицию в интервале от 59% до 66,4%. Во всех дозах подавление достоверное ($p = 0,009$, $p = 0,009$, $p = 0,009$, $p = 0,014$), в случае ODN2 и ($p = 0,009$, $p = 0,047$, $p = 0,009$, $p = 0,014$) в случае ODN8. Мы не наблюдали выраженной зависимости ингибиции от дозы, что видно из того, что дозы в 4 и 8 раз выше дозы для CpG-стимуляции не дают должного эффекта. Таким образом, для дальнейших исследований можно брать дозы INH-ODN в равной концентрации с CpG-ODN (2,5 мкг/мл), или в концентрации, не превышающей двукратное увеличение, т. е. 5 мкг/мл. В случае модифицированного аналога μ -ODN4084-F (9)

уровень ингибции для него сопоставим с уровнем оригинального ODN4084-F (8) и составляет от 58,5% до 64,3%. (табл. 1). Для μ -A151 (4) ингибция почти в два раза ниже, чем у оригинального A151 (2) (рис. 1). Результаты исследования влияния ODN2088 (5) в сравнении с его контролем ODN2088C (7) и модифицированным аналогом μ -ODN2088 (6) на пролиферативную активность CpG-стимулированных спленоцитов представлены в таблице 1. Индекс ингибции оригинального ODN2088 (5) варьировал от 54,2% до 57,7%, что несколько ниже, чем ингибция описанных выше ODN. При этом его модифицированный аналог μ -ODN2088 (6) не показывает такой значимой ингибции (практически в два раза снижена до 31% в случае соотношения 1:1, 1:4, при двукратной дозе ODN – ингибция пролиферативной активности составила 42%, достигает 55,4% только для максимальной восьмикратной дозы (табл. 1). Возможно, эту модификацию целесообразнее использовать в более высоких дозах, чем оригинальный ODN, что требует дополнительных исследований. Оценка пролиферативной активности при совместном культивировании с ODN2088C (7) не дает достоверной ингибции ни в одной из дозировок. ODN7 во всех экспериментах ингибирует только до 20–30%.

В отдельной серии экспериментов был осуществлен скрининг иммуносупрессорных ингибиторных олигонуклеотидов (INH-ODNs) и контролей на секрецию IL-12 CpG-стимулированными спленоцитами *in vitro*. Для оценки секреции IL-12 реше-

но было взять только две дозы ODN 2,5 мкг/мл и 5 мкг/мл (в соотношении 1:1 и 1:2 к CpG-ODN, соответственно), учитывая описанные выше результаты скрининга ODN. Данные измерений (в пкг/мл) представлены на рисунке 1.

Относительно CpG-стимулированных спленоцитов, при пролиферации которых секреция IL-12 достигает 141 пкг/мл, добавление любых (INH-ODN) снижает секрецию IL-12 в той или иной степени. ODN A151 (2) снижает наиболее активно – синтез данного цитокина в этом случае опускается до 50 пкг/мл и 64 пкг/мл при дозах ODN 2,5 мкг/мл и 5 мкг/мл соответственно. При этом нужно отметить, что A-151 (2) дает прирост секреции цитокина на 28% в большей, двойной дозе. В противоположность двойная доза ODN4084-F (8) существенно снижает синтез IL-12 относительно уровня цитокина, синтезируемого при более низких дозах соответствующего ODN, а именно до 35 пкг/мл в дозе 5 мкг/мл и только до 81 пкг/мл в дозе 2,5 мкг/мл. Для его аналога μ -ODN4084-F (9) тенденция к снижению наблюдается незначительная, с 105 пкг/мл до 89 пкг/мл (в дозе 2,5 и 5 мкг/мл соответственно). Модифицированный аналог μ -A151 (4) снижает секрецию IL-12 до 90 пкг/мл и 81 пкг/мл в дозе 2,5 и 5 мкг/мл внесения в культуру соответственно. Таким образом, мезильные аналоги μ -A151 (4) и μ -ODN4084-F (9) в данном эксперименте проявляют несколько более высокую способность к стимуляции синтеза IL-12 по сравнению с исходным соответствующим ODN. В случае

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ ИНГИБИРОВАНИЯ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ В МОДЕЛИ CpG-СТИМУЛИРОВАННЫХ СПЛЕНОЦИТОВ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ INH-ODN (%)

TABLE 1. LEVEL INHIBITION OF PROLIFERATIVE ACTIVITY IN THE MODEL OF CpG-STIMULATED SPLENOCYTES WITH THE ADDITION OF INH-ODN (%)

Олигонуклеотиды Oligonucleotide	Соотношение дозы CpG к INH-ODN Dose ratio of CpG to INH-ODN			
	1:1	1:2	1:4	1:8
A 151	64	65	59	66,4
C 151	40,8	36,5	42,7	58,5
μ-A151	39,2	34,6	47	48,1
ODN 2088	54,2	55,8	55,8	57,7
μ-ODN 2088	31	42	31,2	55,4
ODN 2088 C	22	25	4,2	30,4
ODN 4084	65,8	60	62,4	64,3
μ-ODN 4084-F	58,5	62,3	66,2	64,3

Примечание. INH-ODN в дозах 2,5 мкг/мл (1:1), 5 мкг/мл (1:2), 10 мкг/мл (1:4) и 20 мкг/мл (1:8). Полужирным шрифтом выделены ODN с наиболее высоким процентом ингибирования, курсивом – с наиболее низким.

Note. INH-ODN at doses of 2,5 μ g/mL (1:1), 5 μ g/mL (1:2), 10 μ g/mL (1:4) and 20 μ g/mL (1:8). ODNs with the highest percentage of inhibition are in bold, and the lowest in italics.

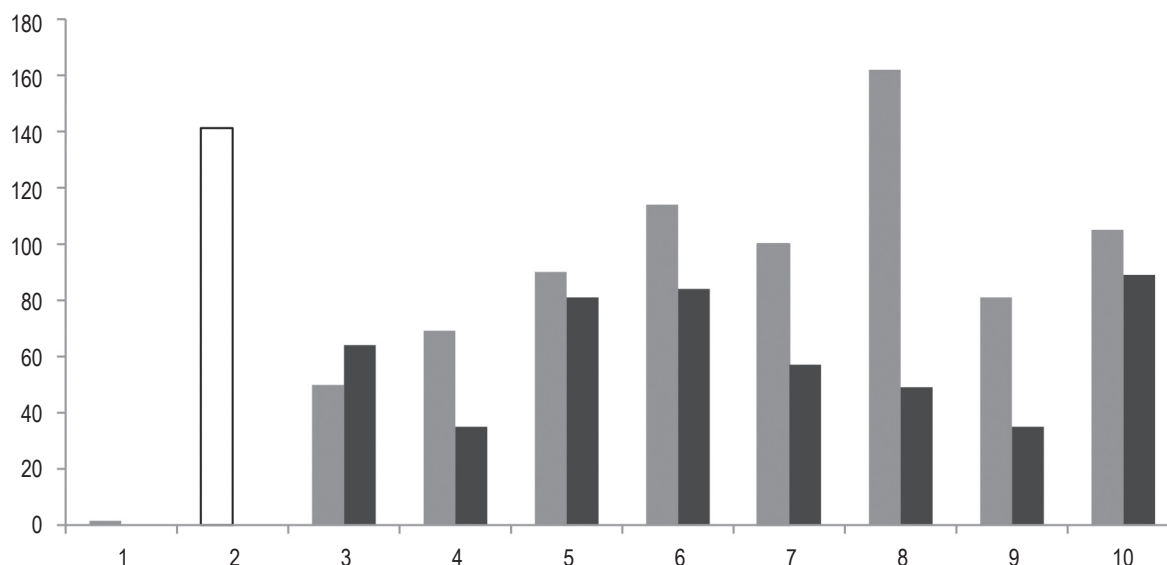


Рисунок 1. Продукция цитокина IL-12p70 CpG-стимулированными лимфоцитами селезенки

Примечание. По оси ординат – концентрация (пкг/мл), по оси абсцисс – группы ODN и соотношение доз CpG: INH-ODN. Светлый столбик – CpG-стимулированные спленоциты без INH-ODN; серый столбик – доза 1:1 (2,5 мкг/мл); черный столбик – доза 1:2 (5 мкг/мл). 1 – необработанный контроль; 2 – CpG; 3 – ODN2; 4 – ODN3; 5 – ODN4; 6 – ODN5; 7 – ODN6; 8 – ODN7; 9 – ODN8; 10 – ODN9.

Figure 1. Production of IL-12p70 cytokine by CpG-stimulated splenic lymphocytes

Note. Y-axis concentration (pg/mL). The abscissa shows ODN groups and the CpG doses ratio: IND-ODN. Light column, CpG-stimulated splenocytes without ODN; gray column, dose 1: 1 (2,5 µg/mL); black column, dose 1: 2 (5 µg/mL). 1, NTC; 2, CpG; 3, ODN2; 4, ODN3; 5, ODN4; 6, ODN5; 7, ODN6; 8, ODN7; 9, ODN8; 10, ODN9.

ODN2088 (5), его модифицированное производное μ -ODN2088 (6) немного активнее снижает синтез IL-12. Для μ -ODN2088 (6) синтез цитокина опускается до 100 пкг/мл и 57 пкг/мл – при дозах ODN 2,5 мкг/мл и 5 мкг/мл, соответственно, против 114 пкг/мл и 84 пкг/мл при добавлении ODN2088 (5).

Наше исследование направлено на разработку новой стратегии индукции иммунологической толерантности путем воздействия на сигнальные пути дендритных клеток с помощью иммуносупрессорных олигонуклеотидов, выступающих как антагонисты TLR9 и обеспечивающих снижение уровня экспрессии ко-стимуляторных молекул CD40, CD80 и CD86, молекул MHC класса II, а также снижение секреции провоспалительных цитокинов IL-1, IL-6 IL-12 и TNF α . В данном исследовании из синтезированных восьми ODN нам необходимо было определить наиболее перспективные *in vitro* для использования их на модели *in vivo* в дальнейшем.

Заключение

В данной работе нами изучены 8 химически модифицированных ингибиторных олигонуклеотидов. Наибольшей супрессорной активностью *in vitro* во всех исследуемых дозах обладают описанные в литературе олигону-

клеотиды с PS-межнуклеотидными группами A151 (2), ODN4084-F (8), а также модифицированный мезильной группой олигонуклеотид μ -ODN4084-F (9). Были выбраны оптимальные концентрация INH-ODN 2,5 или 5 мкг/мл в зависимости от последовательности олигодезоксинуклеотида. Была отработана схема оптимального соотношения иммуностимуляторных CpG-ODN и иммуносупрессорных INH-ODN (1:1, 1:2) при внесении в культуру спленоцитов. Первичный скрининг иммуносупрессорных олигонуклеотидов в культуре *in vitro* по их влиянию на пролиферацию спленоцитов и продукцию IL-12 позволил выделить несколько наиболее активных соединений и определить характер последовательности с наиболее выраженными иммунодепрессивными свойствами, а также установить оптимальные концентрации изучаемых олигодезоксинуклеотидов для дальнейших исследований *in vitro*.

Необходимы дальнейшие исследования в мышиных экспериментальных моделях, в частности на модели острой РТПХ, чтобы проанализировать эффективность μ -модифицированных тиофосфатных иммуносупрессорных ODN на изменения баланса Th1/Th2, что позволит снизить негативные последствия трансплантации и увеличить продолжительность жизни животных.

Список литературы / References

1. Головинская О.В., Байкова М.Л., Алпатова Н.А., Зубков Д.А., Фоменко В.В., Гайдерова Л.А. Сравнительный анализ красителей, используемых при оценке специфической активности лекарственных средств на основе филграстима биологическим методом *in vitro* // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение, 2020. Т. 20, № 3. С. 193-201. [Golovinskaya O.V., Baykova M.L., Alpatova N.A., Zubkov D.A., Fomenko V.V., Gaiderova L.A. Comparative analysis of dyes used in assessing the specific activity of filgrastim-based drugs using a biological method *in vitro*. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2020, Vol. 20, no. 3, pp. 193-201. (In Russ.)]
2. Останин А.А., Леплина О.Ю., Буракова Е.А., Тыринова Т.В., Фокина А.А., Проскурина А.С., Богачев С.С., Стеценко Д.А., Черных Е.Р. CpG олигонуклеотиды с модифицированными фосфатными группами индуцируют созревание миелоидных дендритных клеток человека *in vitro* // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2020. Т.24, № 6. С. 653-660. [Ostanin A.A., Leplina O.Y., Burakova E.A., Tyrinova T.V., Fokina A.A., Proskurina A.S., Bogachev S.S., Stetsenko D.A., Chernykh E.R. Phosphate-modified CpG oligonucleotides induce *in vitro* maturation of human myeloid dendritic cells. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020, Vol. 24, no 6, pp. 653-660. (In Russ.)]
3. Anderson B.A., Freestone G.C., Low A., De-Hoyos C.L., III W.J.D., Østergaard M.E., Migawa M.T., Fazio M., Wan, W.B., Berdeja, A., Scandalis E., Burel S.A., Vickers T.A., Crooke S.T., Swayze E.E., Liang X., Seth P.P. Towards next generation antisense oligonucleotides: mesylphosphoramidate modification improves therapeutic index and duration of effect of gapmer antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.*, 2021, Vol. 49, no. 16, pp. 9026–9041.
4. Audiger C., Rahman M.J., Yun T.J., Tarbell K.V., Lesage S. The importance of dendritic cells in maintaining immune tolerance. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 198, pp. 2223-2231.
5. Bayik D., Gursel I., Klinman D.M. Structure, mechanism and therapeutic utility of immunosuppressive oligonucleotides. *Pharmacol. Res.*, 2016, Vol. 105, pp. 216-225.
6. Gratwohl A., Baldomero H. Trends of hematopoietic stem cell transplantation in the third millennium. *Curr. Opin. Hematol.*, 2009, Vol. 16, no. 6, pp. 420-426.
7. Haniffa M., Collin M., Ginhoux F. Ontogeny and functional specialization of dendritic cells in human and mouse. *Adv. Immunol.*, 2013, Vol. 120, pp. 1-49.
8. Lutz M.B. Induction of CD4(+) regulatory and polarized effector/helper T cells by dendritic cells. *Immune Netw.*, 2016, no. 16, pp. 13-25.
9. Maldonado R.A., von Andrian U.H. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv. Immunol.*, 2010, Vol. 108, pp. 111-165.
10. Miroshnichenko S.K., Patutina O.A., Burakova E.A., Chelobanov B.P., Fokina A.A., Vlassov V.V., Altman S., Zenkova M.A., Stetsenko D.A. Mesyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates with improved biochemical and biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2019, Vol. 116, no. 4, pp. 1229-1234.
11. Patutina O.A., Gaponova (Miroshnichenko) S.K., Senkova A.V., Savin I.A., Gladkikh D.V., Burakova E.A., Fokina A.A., Maslov M.A., Shmendel E.V., Wood M.J.A., Vlassov V.V., Altman S., Stetsenko D.A., Zenkova M.A. Mesyl phosphoramidate backbone modified antisense oligonucleotides targeting miR-21 with enhanced *in vivo* therapeutic potency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020, Vol. 117, no. 51, pp. 32370-32379.
12. Qian C., Cao X. Dendritic cells in the regulation of immunity and inflammation. *Semin. Immunol.*, 2018, Vol. 35, no. 2, pp. 3-11.
13. Raker V.K., Domogalla M.P., Steinbrink K. Tolerogenic dendritic cells for regulatory T cell induction in man. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, 569. doi: 10.3389/fimmu.2015.00569.
14. Socié G., Blazar B.R. Acute graft-versus-host disease: from the bench to the bedside. *Blood*, 2009, Vol. 114, no. 20, pp. 4327-4336.
15. Su Y., Fujii H., Burakova E.A., Chelobanov B.P., Fujii M., Stetsenko D.A., Filichev V.V. Neutral and negatively charged phosphate modifications altering thermal stability, kinetics of formation and monovalent ion dependence of DNA G-Quadruplexes. *Chem. Asian J.*, 2019, Vol. 14, no. 8, pp. 1212-1220.

Авторы:

Гаврилова Е.Д. — к.б.н., заведующая лабораторией экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»; старший научный сотрудник лаборатории иммунологии нуклеиновых кислот ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Gavrilova E.D., PhD (Biology), Head, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology; Senior Research Associate, Laboratory of Immunology of Nucleic Acids, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Гойман Е.В. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»; инженер лаборатории иммунологии нуклеиновых кислот ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”», г. Новосибирск, Россия

Держалова А.Ш. — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии нуклеиновых кислот ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”», г. Новосибирск, Россия

Стеценко Д.А. — к.х.н., заведующий лабораторией химии нуклеиновых кислот ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”»; заведующий Российско-франко-японской лабораторией бионанотехнологии ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

Буракова Е.А. — к.х.н., заведующая лабораторией иммунологии нуклеиновых кислот ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”»; научный сотрудник Российско-франко-японской лаборатории бионанотехнологии ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

Goiman E.V., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology; Engineer, Laboratory of Immunology of Nucleic Acids, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Derzalova A.Sh., Junior Research Associate, Laboratory of Immunology of Nucleic Acids, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Stetsenko D.A., PhD (Chemistry), Head, Laboratory of Chemistry of Nucleic Acids, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Head, Russo-Franco-Japanese Laboratory of Bionanotechnology, Faculty of Physics, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Burakova E.A., PhD (Chemistry), Head, Laboratory of Immunology of Nucleic Acids, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Research Associate, Russo-Franco-Japanese Laboratory of Bionanotechnology, Faculty of Physics, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 07.05.2024
Принята к печати 31.07.2024

Received 07.05.2024
Accepted 31.07.2024