

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.113.6:578.832.1:578.282

КОНСТРУИРОВАНИЕ ДЕЗОКСИРИБОЗИМОВ ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ
РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСА ГРИППА А

© 2013 г. А. А. Евдокимов¹, Н. А. Мазуркова¹, Э. Г. Малыгин¹, В. Ф. Зарытова^{2*},
А. С. Левина², М. Н. Репкова², С. Н. Загребельный³, Н. А. Нетесова¹

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”, Кольцово, Новосибирская обл., 630559

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090

³Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090

Поступила в редакцию 29.02.2012 г.

Принята к печати 22.04.2012 г.

Регулярно вызывая эпидемии и эпизоотии, вирусы гриппа А занимают видное место в инфекционной патологии человека и животных, а разработка новых противогриппозных средств становится все более насущной. Способность дезоксирибозимов эффективно и с высокой специфичностью расщеплять молекулы РНК позволяет рассматривать их в качестве перспективных противовирусных агентов. В данном исследовании проведен сравнительный анализ геномных последовательностей ряда штаммов вирусов гриппа А наиболее актуальных подтипов: H5N1, H3N2 и H1N1. Выявлены консервативные участки в пяти наименее вариабельных сегментах РНК фрагментированного вирусного генома и определены потенциальные сайты их расщепления дезоксирибозимами типа “10-23”. Сконструированы и синтезированы 46 вирусспецифических 33-звенных дезоксирибозимов с общей структурой 5'N₈AGGCTAGCTACAACGAN₉. Скрининг противовирусной активности этих препаратов в комплексе с липофектином на культуре клеток MDCK, инфицированной высокопатогенным штаммом гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1), позволил выявить 17 дезоксирибозимов, подавлявших титр тканецитопатического действия вируса не менее чем на 2.5 lgTCID₅₀/мл (т.е. индекс нейтрализации вируса ≥300), причем 5 из них подавляли титр вируса на три порядка. Наиболее активные препараты оказались специфичны к сегменту 5 генома вируса гриппа А – этот сегмент кодирует белок нуклеокапсида, или нуклеопротеин (NP).

Ключевые слова: дезоксирибозимы, вирус гриппа А, культура клеток, ингибирование репродукции вируса.

DESIGN OF DEOXYRIBOZYMES FOR INHIBITION OF INFLUENZA A VIRUS, by A. A. Evdokimov¹, N. A. Mazurkova¹, E. G. Malygin¹, V. F. Zarytova^{2*}, A. S. Levina², M. N. Repkova², S. N. Zagrebelyi³, N. A. Netesova¹ (¹State Research Center of Virology and Biotechnology “VECTOR”, Koltsovo, Novosibirsk region, 630559 Russia; ²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia, *e-mail: zarytova@niboch.nsc.ru; ³Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia). Influenza A viruses take a significant place in human and animal pathology causing epidemics and epizootics. Therefore, the development of new antifu drugs has become more and more urgent. Deoxyribozymes can be considered as promising antiviral agents due to their ability to efficiently and highly specifically cleave RNA molecules. In this study, a number of genomic sequences of the most relevant influenza A virus subtypes, H5N1, H3N2, and H1N1, were analyzed. Conservative regions were revealed in five the least variable segments of the fragmented viral RNA genome, and potential sites of their cleavage with “10-23” deoxyribozymes were determined. 46 virus-specific 33-mer deoxyribozymes with the general structure of 5'N₈AGGCTAGCTACAACGAN₉ were designed and synthesized. Screening of the antiviral activity of these agents in conjugation with lipofectin on the Madin-Darby Canine Kidney cells infected with highly pathogenic avian influenza virus A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) revealed 17 deoxyribozymes, which suppressed the titer of virus cytopathicity by more than 2.5 lgTCID₅₀/mL (i.e. the virus neutralization index was more than 300), with five of them suppressing the virus titer by a factor of 1000 and more. The most active deoxyribozymes appeared to be specific to segment 5 of the influenza A virus genome, which encoded nucleoprotein (NP).

Keywords: deoxyribozymes, influenza A virus, cell culture, inhibition of viral replication.

DOI: 10.7868/S0026898412060043

Принятые сокращения: ДНКзим (dz) – дезоксирибозим; РНКзим – рибозим; MDCK – культура клеток почки собаки.
* Эл. почта: zarytova@niboch.nsc.ru

Вирусы гриппа А принадлежат к семейству *Orthomyxoviridae*. Их геном представлен восемью одноцепочечными сегментами РНК отрицательной полярности, каждый из которых кодирует один–два белковых продукта: гемагглютинин (НА), нейраминидазу (NA), три субъединицы РНК-зависимой РНК-полимеразы (PB1, PB2 и PA), нуклеопротеин (NP), матриксный белок (M1), мембранный белок (M2) и неструктурные белки (NS1 и NEP/NS2) [1, 2]. Вирион диаметром 80–120 нм имеет сферическую форму и представляет собой нуклеокапсид, окруженный липидным бислоем, покрытым “шипами” двух гликопротеинов – гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (NA). Эти белки несут антигенные детерминанты вируса гриппа и определяют его подтип. В случае вирусов гриппа типа А подтип обозначают как H1N1, H3N2, H5N1 и т.д. К настоящему времени от птиц выделены вирусы гриппа А 16 подтипов гемагглютинина (H1–H16) и 9 подтипов нейраминидазы (N1–N9).

Вирусы гриппа А занимают видное место в инфекционной патологии человека и животных, периодически вызывая эпидемии и эпизоотии. В XX веке с вирусами гриппа А связано три глобальных пандемии, в результате которых погибло более 50 миллионов человек. На протяжении последнего десятилетия Всемирная Организация Здравоохранения озабочена появлением в человеческой популяции новых штаммов вируса гриппа: высокопатогенного H5N1 птиц и вызвавшего пандемический всплеск H1N1 свиней. Часть вновь возникающих штаммов проявляет устойчивость не только к применявшимся ранее лекарствам адамантанового ряда – амантадину и ремантадину (ингибиторам мембранного белка M2), но и к современным противогриппозным препаратам – озельтамивиру и занамивиру (ингибиторам NA) [3–5]. Можно также отметить, что препараты-ингибиторы NA малоэффективны, если лечение ими начато через двое-трое суток после заражения; кроме того, в последнее время появились сообщения о случаях острых психических расстройств у пациентов, принимавших озельтамивир [6]. Таким образом, лекарственная проблема в отношении вирусов гриппа А весьма далека от разрешения.

В настоящее время значительное развитие получили работы по созданию новых, в том числе противовирусных, терапевтических препаратов, основанных на применении нативных или химически модифицированных нуклеиновых кислот. Это антисмысловые олигонуклеотиды, нуклеозимы (рибо- и дезоксирибозимы), аптамеры и малые интерферирующие РНК, способные селективно подавлять экспрессию генов, ингибировать активность определенных ферментов либо выполнять другие специфические функции [7–9]. Сегодня около ста препаратов такого рода находятся на различных стадиях клинических испыта-

ний [10]. Два из них уже вышли на фармацевтический рынок: тиофосфорилированный олигонуклеотид Vitravene® для лечения ретинитов, вызванных цитомегаловирусной инфекцией, и аптамер Macugen® для лечения влажной формы сенильной макулодистрофии. Как известно, принцип действия антисмысловых олигонуклеотидов состоит в образовании ДНК/РНК-гибридных дуплексов с комплементарными участками целевой мРНК, что приводит к ее расщеплению клеточной РНКазой H и/или, в зависимости от введения определенных химических модификаций, к блокированию трансляции мРНК. Преимущество нуклеозимов состоит в присущей им каталитической активности, в том числе способности расщеплять комплементарные последовательности РНК. В отличие от рибозимов (РНКзимов), природные дезоксирибозимы (ДНКзимы) пока не найдены. В то же время, искусственные нуклеозимы могут быть получены путем селекции *in vitro* [11, 12]. На сегодняшний день известен ряд обладающих РНКазной активностью нуклеозимов, отличающихся высокой каталитической скоростью, большим числом оборотов и способностью расщеплять широкий набор РНК-субстратов [13–15]. ДНКзимы выгодно отличаются от РНКзимов относительно высокой устойчивостью к действию сывороточных и клеточных нуклеаз *in vivo*.

Цель настоящей работы – конструирование ДНКзимов, адресованных к общим консервативным участкам РНК актуальных в последнее время подтипов H5N1, H3N2 и H1N1 вируса гриппа А, и сравнительное исследование их способности подавлять вирусную репродукцию на примере высокопатогенного штамма вируса гриппа птиц H5N1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали высокопатогенный штамм вируса гриппа птиц А/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) из коллекции микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” (Новосибирск) и культуру клеток MDCK (клетки почки собаки) из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” (Новосибирск). Дезоксирибозимы синтезированы стандартным фосфитамидным методом на автоматическом синтезаторе (“Биосан”, Новосибирск) с использованием коммерческих фосфитамидных мономеров (“Glen Research”, США). Концентрации олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически, молярные коэффициенты экстинкции рассчитывали исходя из структуры каждой последовательности при помощи программы OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>).

Поиск общих консервативных участков РНК штаммов вируса гриппа А подтипов H5N1, H3N2 и H1N1 проводили, используя ресурсы специализированных баз данных NCBI Influenza Virus Resource (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/flu>) и Influenza Sequence Database (<http://flu.lanl.gov>). Для множественного выравнивания последовательностей применяли стандартный алгоритм ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) и программу BioEdit 7.0 [16].

Для проверки расщепления ДНКзимом модельной РНК-мишени *in vitro* использовали 25-звенный синтетический олигорибонуклеотид, меченный по 5'-концу с помощью [γ - 32 P]АТР и Т4 полинуклеотидкиназы. Реакцию [32 P]РНК-мишени (10 мкМ) с ДНКзимом (10 мкМ) проводили в буфере, содержащем 25 мМ MgCl₂ и 50 мМ Трис-HCl (рН 7.5), при 37°C. Продукты реакции анализировали методом электрофореза в 20%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. Радиоавтографию гелей, содержащих [32 P]РНК-мишень и продукты ее расщепления, проводили на пленке CP-BU NIF 100 ("Agfa", Бельгия). Интенсивность сигналов на радиоавтографах оценивали с помощью программного пакета GelPro ("Media Cybernetics", США). Степень расщепления рассчитывали по формуле $I/I + I_0$, где I и I_0 – интенсивности полос, соответствующих продукту расщепления и исходной РНК-мишени соответственно.

Исследование противовирусной активности ДНКзимов проводили на модели инфицированных клеток МДСК. Клетки выращивали в 96-луночных планшетах на среде RPMI-1640 ("Биолот", Россия) в течение 1–1.5 сут до образования монослоя в присутствии 5%-ной фетальной сыворотки крупного рогатого скота ("Биолот", Россия) с добавлением пенициллина (100 МЕ/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). Нарработку вируса производили на 10-суточных развивающихся куриных эмбрионах [17]. Концентрация вируса в вирус-содержащей аллантоисной жидкости, определенная путем титрования на клетках МДСК, составляла 8.5 lgТЦД₅₀/мл (десятичных логарифмов 50% тканевых цитопатических доз в 1 мл). Для 10-кратных разведений аллантоисной жидкости использовали среду RPMI-1640, содержащую 2 мкг/мл трипсина. Разведенные образцы (100 мкл/лунку) вносили в клеточный монослой (множественность заражения составляла от 0.0001 до 1.0 ТЦД₅₀/кл) и после 1 ч инкубации при комнатной температуре вирус удаляли, а клетки промывали средой. Затем в каждую лунку клеточного монослоя вносили 100 мкл питательной среды RPMI-1640, содержащей исследуемый препарат ДНКзима с конечной концентрацией 10 мкМ вместе с трансфекционным агентом липофектином ("Invitrogen", США), который брали в количестве, вдвое превышающем массу ДНКзима. В

контрольные лунки вносили 100 мкл питательной среды RPMI-1640, содержащей липофектин без добавления ДНКзима. Клетки инкубировали в течение 5 ч при температуре 37°C в атмосфере 5%-ного CO₂, после чего среду с препаратом (в опыте) и без препарата (в контроле) удаляли, вносили новую порцию среды RPMI-1640, содержащей 2 мкг/мл трипсина. Через 3 сут с помощью инвертированного микроскопа в монослое клеток каждой лунки регистрировали цитопатическое действие вируса, и его наличие в среде культивирования подтверждали титрованием на клетках МДСК. Учет результатов осуществляли через 3 сут в реакции гемагглютинации с 0.5%-ными эритроцитами петуха [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выбор общей структуры вирусспецифических ДНКзимов

На сегодняшний день к наиболее перспективным реагентам для направленного расщепления молекул РНК различного генеза относят дезоксирибозимы типа "10-23". Это олигодезоксирибонуклеотиды вида $5'N_nR\overline{GGCTAGCTACAACGA}N_n$ [18], состоящие из 15-звенного каталитически активного фрагмента (взят в рамку), фланкированного РНК-узнающими последовательностями (рис. 1). ДНКзимы "10-23" могут расщеплять субстратную РНК по минимальному сайту $5'N_nR\downarrow YN_n$, где $R = A$ или G , а $Y = U$ или C , однако значительно эффективнее они расщепляют дуплеты $A\downarrow U$ и $G\downarrow U$ [18]. ДНКзимы "10-23" не требуют кофакторов и катализируют реакцию расщепления РНК с образованием 2',3'-циклофосфата и 5'-гидроксильной группы (рис. 1). Авторы [19] отмечают, что скорость реакции ($k_{cat} \approx 1 \text{ мин}^{-1}$) для ДНКзима "10-23" в 10^4 раз меньше по сравнению с природными белковыми рибонуклеазами (например, РНКазой А), однако величина их константы Михаэлиса ($K_m < 1 \text{ нМ}$) меньше в 10^5 раз. Таким образом, по коэффициенту специфичности, как стандартному критерию эффективности ферментативной реакции ($k_{cat}/K_m \approx 10^9 \text{ М}^{-1} \text{ мин}^{-1}$), ДНКзим "10-23" даже превосходит белковую РНКазу.

От длины субстрат-связывающих участков дезоксирибозима зависят специфичность и стабильность комплексов ДНКзим/РНК, а также скорость "освобождения" ДНКзима из комплексов с продуктами расщепления РНК. Следовательно, длина фланков должна обеспечивать оптимальный баланс этих параметров и, в зависимости от решаемой задачи, может меняться от 6 до 10 и даже более нуклеотидов. Длину фланков при необходимости можно асимметрично варьировать в зависимости от структуры конкретной РНК-мишени или иных экспериментальных

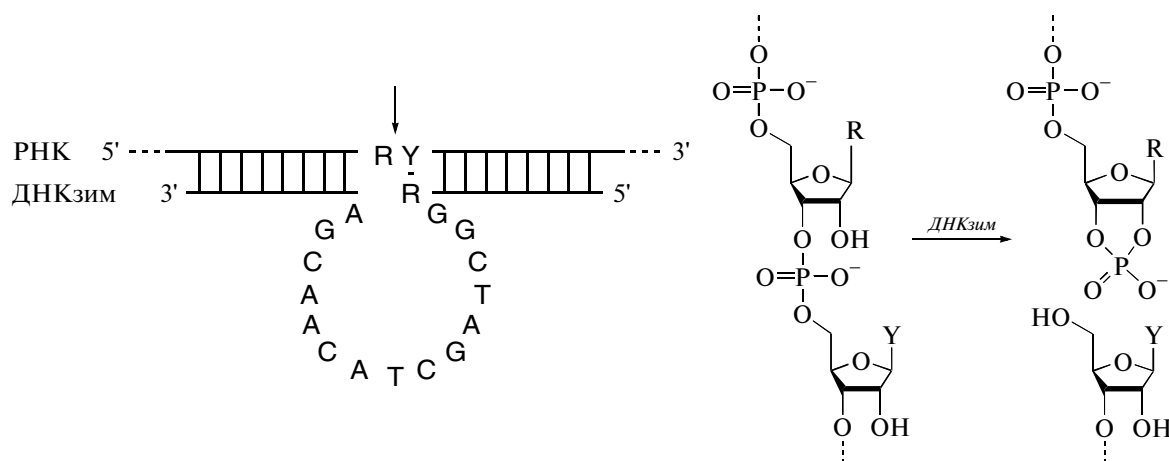


Рис. 1. Структура ДНКзима “10-23” в комплексе с РНК-субстратом и схема катализируемой им реакции расщепления РНК с образованием 2',3'-циклофосфатной группы на 3'-конце и гидроксильной группы на 5'-конце. “R” и “Y” обозначают, соответственно, пуриновое и пиримидиновое основание/нуклеотид.

факторов, однако нужно иметь в виду, что это может ощутимо влиять на РНКазную активность ДНКзима.

При расщеплении высокомолекулярных РНК-мишеней (в том числе вирусных) основная проблема связана с их сложной вторичной и третичной структурой, т.е. со стерической доступностью сайтов расщепления. Эта задача, как правило, решается экспериментально посредством скрининга активности большого числа ДНКзимов [20].

С учетом вышеизложенного, мы остановили свой выбор на ДНКзимах “10-23” со следующей общей структурой: 5'N₈A[GGCTAGCTACAACGA]N₉. Эти ДНКзимы представляют собой 33-звенные олигонуклеотиды, содержащие консервативный каталитический домен (взяты в рамку), фланкированный двумя переменными субстрат-узнающими 9-звенными (в нескольких случаях 8/10-звенными) участками. ДНКзимы предназначены для расщепления РНК-мишеней по AU или GU дуплетам с образованием 2',3'-циклофосфата неспаренного пуринового нуклеотида на 3'-конце образующегося РНК-фрагмента.

Изучение активности и специфичности ДНКзима на модельной РНК-мишени

Ранее, в работах японских авторов [21, 22] был изучен ДНКзим “10-23” и его модифицированные производные, адресованные к участку инициации трансляции гена PB2 штамма вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34(H1N1). Авторы исследовали активность ДНКзима, названного PB2Dz, на синтетической РНК-мишени и его противовирусный эффект в отношении вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34(H1N1) на модели инфицированных клеток MDCK. При использовании липофектина

и DOTAP в качестве реагентов для трансфекции клеток удалось достичь 50–100 кратного снижения титра вируса [22].

В данной работе мы использовали ДНКзим PB2Dz [21, 22] в качестве основы для создания контрольного образца. Поскольку PB2Dz разрабатывали под конкретный штамм (A/Puerto Rico/8/34(H1N1)) и его последовательность комплементарна довольно варибельному участку, мы скорректировали его РНК-узнающие фланки, заменив два нуклеотида с целью “подгонки” под последовательность штамма вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1). Полученный ДНКзим, обозначенный как dzPB2-28+, имеет следующую структуру: 5'-TTCTCTCCAGGCTAGCTACAACGAATTGAATAT-3'.

Прежде всего, нами исследована эффективность действия dzPB2-28+ на синтетическую РНК-мишень – радиоактивно меченный 25-звенный олигорибонуклеотид 5' [³²P]-AAUUAUUCAAU[A↓UG]AUGGAGAGAAUAA, соответствующий участку инициации трансляции (взяты в рамку) мРНК гена PB2 штамма вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005(H5N1). На рис. 2 приведены результаты электрофоретического анализа реакционных смесей, содержащих dzPB2-28+ и РНК-мишень в молярном соотношении 1 : 1. Видно, что через 10 мин гидролизу подверглось уже более 85% РНК-мишени, а через 2 ч расщепление, можно считать, прошло количественно.

Далее определяли специфичность расщепления ДНКзимом dzPB2-28+ синтетической РНК-мишени. На рис. 3 приведены результаты электрофоретического анализа продуктов расщепления РНК-мишени ДНКзимом dzPB2-28+, взятых в молярном соотношении 1 : 10. Видно, что расщепление РНК происходит строго специфично

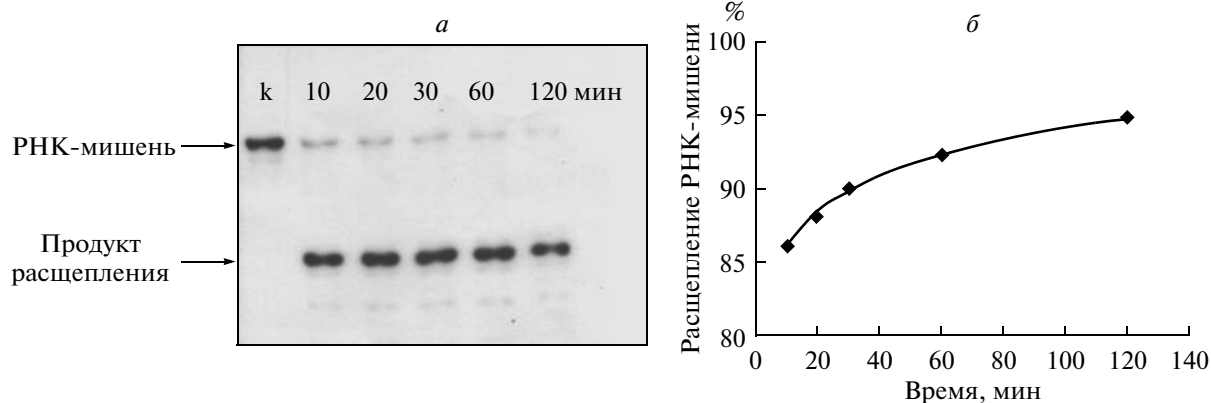


Рис. 2. Расщепление модельной РНК-мишени ДНКзимом dzPB2-28+ (табл. 2, №1). Последовательность синтетической [³²P]-меченой РНК-мишени соответствует участку инициации трансляции гена PB2 штамма вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1). Концентрации ДНКзима и РНК-мишени – 10 мкМ. Реакцию проводили в буфере, содержащем 25 мМ MgCl₂ и 50 мМ Трис-НСl (рН 7.5) при 37°С. *a* – Электрофоретический анализ продуктов реакции в 20%-ном ПААГ с радиоавтографической детекцией, размер РНК-мишени 25 нуклеотидов, размер продукта гидролиза 13 нуклеотидов; *б* – графическое представление результатов электрофореза.

по ожидаемому сайту AU между неспаренным А и спаренным U.

Таким образом, синтезированный в качестве контрольного ДНКзим dzPB2-28+ сохраняет способность прототипного ДНКзима PB2Dz [21, 22] эффективно и сайт-специфично расщеплять РНК-мишень в комплементарном комплексе.

Выбор участков РНК вирусов гриппа А и сайтов их расщепления вирус-специфическими ДНКзимами

Как отмечалось ранее, цель настоящего исследования – разработка “универсальных” ДНКзимов, направленных против штаммов вируса гриппа А подтипов H5N1, H3N2 и H1N1. Задача осложняется тем, что генетический материал вируса состоит из восьми сегментов РНК, и при совместной инфекции двумя или более штаммами одного и того же организма сегменты вирусных геномов “смешиваются”, приводя к образованию вирусов-реассортантов с непредсказуемыми сочетаниями компонентов. Еще одна причина высокой частоты изменчивости вирусов гриппа А – адаптивные мутации РНК, возникающие в ходе репликации. Таким образом, мишенями воздействия ДНКзимов должны быть наиболее функционально значимые сегменты вирусного генома, точнее их консервативные участки.

Из данных работы [23], где был проведен обобщающий анализ более 36 тыс. белковых последовательностей, кодируемых различными штаммами вирусов гриппа А, изолированными за последние 30 лет, следует, что в случае гетерогенных и изменчивых поверхностных гликопротеинов, HA и NA, определяющих подтип вируса, уровень консервативности, как и следовало ожидать, ни-

зок. Наиболее консервативны субъединицы РНК-зависимой РНК-полимеразы (PB2, PB1 и PA), белок NP и белок M1. Именно эти белки считаются ключевыми для репликации вируса. Таким образом, очевидно, что в качестве интересующих нас мишеней воздействия ДНКзимов наиболее перспективны достаточно протяженные невариабельные участки пяти сегментов вирусных РНК и/или их транскриптов, кодирующих PB2, PB1, PA, NP и M1.

Для выявления общих консервативных участков мы использовали следующие штаммы: A/turkey/Suzdalka/12/05 (H5N1), A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1), A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1), A/Hong Kong/1/68 (H3N2), A/New York/392/2004 (H3N2), A/Brisbane/10/2007 (H3N2), A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/New Caledonia/20/1999 (H1N1) и A/California/04/2009 (H1N1). Эти штаммы служат либо распространёнными лабораторными стандартами, либо выбраны из соображений их актуальности в последние несколько лет и доступности их полной геномной последовательности. Будучи небольшой, такая выборка, на наш взгляд, вполне достаточна для решения задач данной работы.

В результате выравнивания последовательностей пяти сегментов РНК указанных штаммов вирусов гриппа А удалось обнаружить 24 консервативных участка (каждый длиной более 19 н.), перспективных с точки зрения дизайна вирус-специфических олигонуклеотидных реагентов, таких как антисмысловые олигонуклеотиды, малые интерферирующие РНК и РНК-расщепляющие нуклеозимы.

В качестве примера в таблице 1 приведен результат поиска консервативных участков и потенциальных сайтов их расщепления ДНКзимами

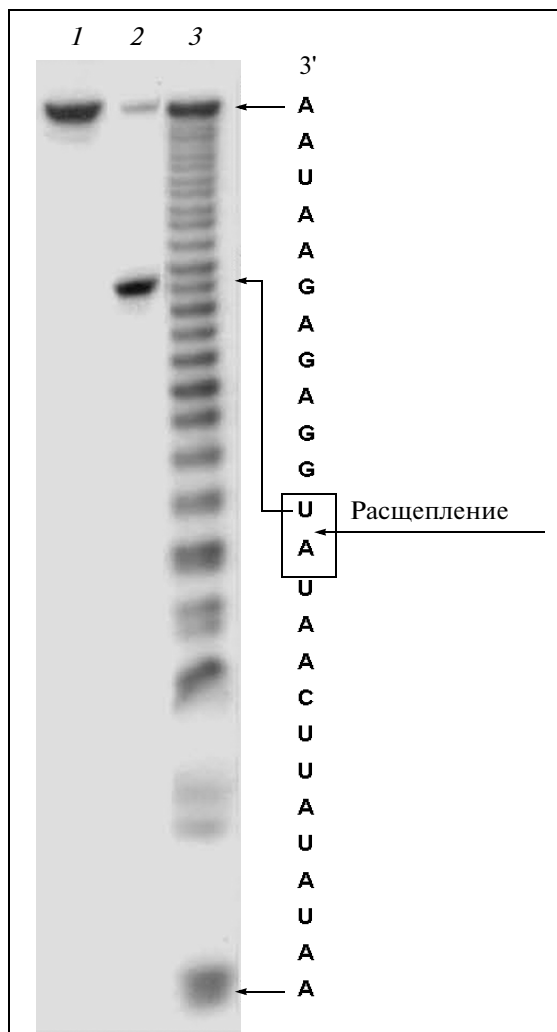


Рис. 3. Электрофоретический анализ гидролиза модельной [^{32}P]РНК-мишени ДНКзимом dzPB2-28+. Концентрации ДНКзима и РНК-мишени – 10 и 1 мкМ соответственно. Реакцию проводили 30 мин в буфере, содержащем 25 мМ MgCl_2 и 50 мМ Трис-НС1 (рН 7.5) при 37°C. Исходная [^{32}P]РНК-мишень в буфере без ДНКзима (дорожка 1), РНК-мишень + ДНКзим (дорожка 2), неполный щелочной гидролиз РНК-мишени (дорожка 3). Справа приведена структура РНК-мишени и обозначен сайт ее расщепления ДНКзимом.

“10-23” вида $5'\text{N}_8\text{A}\boxed{\text{GGCTAGCTACAACGA}}\text{N}_9$, для сегмента 5 вируса гриппа А, кодирующего белок NP. Как видно из таблицы, несмотря на ожидаемо высокий общий уровень идентичности нуклеотидных последовательностей, практический интерес с точки зрения дизайна вирус-специфических ДНКзимов представляют (+) и (–) цепи лишь четырех консервативных участков длиной от 22 до 36 н., содержащих 15 потенциальных сайтов расщепления. Аналогичный анализ сегментов 1, 2, 3 и 7, кодирующих субъединицы РНК-зави-

симой РНК-полимеразы и белок М1, выявил еще примерно 70 возможных сайтов расщепления.

Для дальнейшего синтеза отбор структур ДНКзимов определяли по таким критериям как минимизация образования гомодимерных либо шпилечных структур и максимально приближенное к центру положение в пределах мишенного консервативного участка вирусной РНК (при наличии нескольких потенциальных сайтов расщепления в пределах одного участка). В результате, помимо контрольного ДНКзима dzPB2-28+, нами синтезированы 45 ДНКзимов длиной 33 н., специфичных как к (+), так и к (–) цепям невариабельных участков сегментов РНК вирусов гриппа А подтипов H5N1, H3N2 и H1N1 (табл. 2).

Исследование противовирусной активности ДНКзимов на культуре инфицированных клеток МДСК

Исследование противовирусной активности синтезированных ДНКзимов проводили на модели клеток МДСК, инфицированных высокопатогенным штаммом вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1). Эксперименты проводили при концентрации ДНКзимов 10 мкМ с использованием липофектина – распространенного трансфекционного агента для доставки олигонуклеотидных/плазмидных ДНК в эукариотические клетки. Учет результатов осуществляли через 3 сут после трансфекции инфицированных клеток. С помощью инвертированного микроскопа регистрировали цитопатическое действие в монослое клеток, после чего определяли наличие вируса в среде культивирования по реакции геммагглютинации с 0.5%-ными эритроцитами петуха [17].

Результаты скрининга противовирусной активности синтезированных ДНКзимов суммированы в табл. 2 в единицах $\text{lgTЦД}_{50}/\text{мл}$ (титры вируса в десятичных логарифмах 50%-ных тканевых цитопатических доз в 1 мл) без добавления (контроль вируса) и с добавлением ДНКзима в культуру инфицированных клеток. Для наглядности на рис. 4 приведены также гистограммы индексов нейтрализации (отношение $\text{TЦД}_{50}/\text{мл}$ в контрольном эксперименте без добавления ДНКзима к $\text{TЦД}_{50}/\text{мл}$ в присутствии ДНКзима). Как видно, большая часть ДНКзимов в той или иной мере проявляет противовирусную активность. Особого внимания заслуживают 17 ДНКзимов, вызывавших в условиях эксперимента понижение цитопатической активности вируса не менее чем на 2.5 $\text{lgTЦД}_{50}/\text{мл}$ (т.е. индекс нейтрализации ≥ 300), а 5 из них снижали титр вируса на 3 порядка. Следует отметить, что 4 из 5 наиболее активных ДНКзимов (dzNP-17+, dzNP-44–, dzNP-42– и dzNP-1500+) были специфичны к (+) или (–) цепи

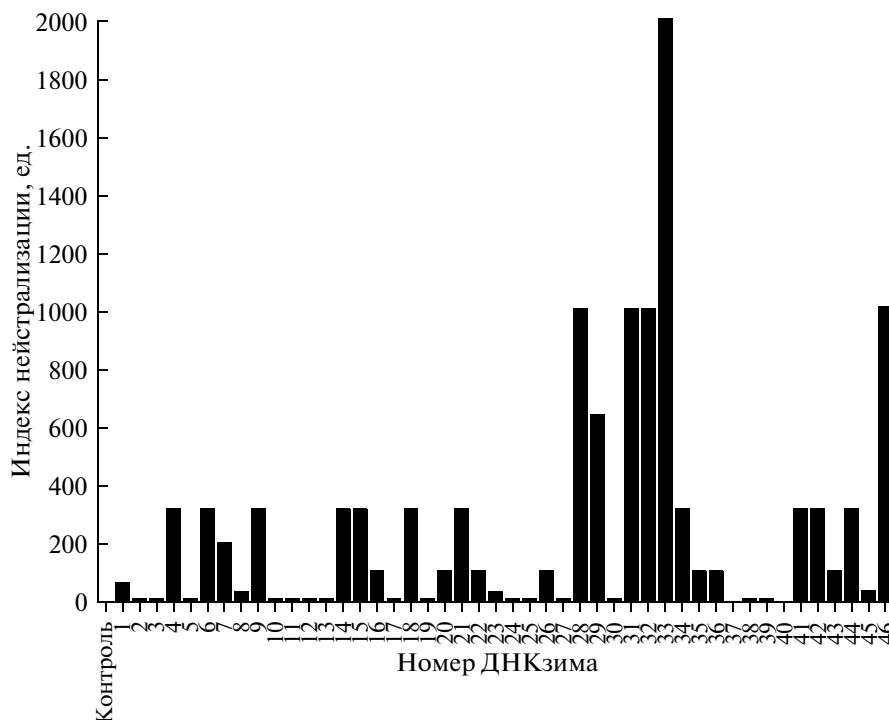


Рис. 4. Графическое представление результатов скрининга противовирусной активности ДНКзимов на модели клеток MDCK, инфицированных вирусом гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1). Скрининг проводили с использованием липофектина как трансфекционного агента при концентрации ДНКзимов 10 мкМ. Даны гистограммы индексов нейтрализации (ТЦД₅₀/мл контроля вируса/ ТЦД₅₀/мл при добавлении ДНКзима). Нумерация ДНКзимов по оси абсцисс соответствуют их номерам в табл. 2.

РНК 5-го сегмента вирусного генома, кодирующего NP. Белок NP играет центральную роль в процессе внедрения генетической информации вируса в ядро инфицированной клетки и необходим для его последующей репликации и сборки [24–26]. Пятый из наиболее эффективных ДНКзимов (dzM-1012–) специфичен к (–) цепи РНК

7-го сегмента вирусного генома, кодирующего белки M1 и M2.

Контрольный ДНКзим dzPB2-28+ (модифицированный вариант PB2Dz [21, 22]), как и ожидалось, также проявлял противовирусную активность: в условиях эксперимента наблюдалось 50-кратное снижение титра вируса.

Таблица 1. Результат поиска консервативных участков и потенциальных сайтов их расщепления ДНКзимами “10-23” применительно к 5-му сегменту РНК вирусов гриппа А

(+/-) цепь РНК	5'-последовательность-3'(+ или (-) цепи консервативного участка РНК*	Длина участка	Позиции в сегменте**
(+) (-)	AGCAAAGCAGG <u>G↓U</u> AG <u>A↓U</u> <u>A↓U</u> CACUCAC GUGAGUG <u>A↓U</u> <u>A↓U</u> CUACCCUGCUUUUGCU	28	1–28
(+) (-)	GAGUGACAUAAC <u>A↓U</u> CAUGGCGUC GACGCCAUG <u>A↓U</u> <u>G↓U</u> UGAUGUCACUC	24	30–53
(+) (-)	UAAUGAAGG <u>A↓U</u> CUU <u>A↓U</u> UUCUUCGGAGACAAUGCAGA UCUGCAUU <u>G↓U</u> CUCCGAAGAA <u>A↓U</u> AAG <u>A↓U</u> CCUUCAUA	36	1491–1526
(+) (-)	GAAAAUACCCU <u>G↓U</u> UUCUACU AGUAGAAACAAGG <u>G↓U</u> AUUUUUC	22	1544–1565

* Прямоугольниками и стрелками выделены потенциальные сайты расщепления.
** Нумерация нуклеотидов дана для комплементарных (+) РНК копий.

Таблица 2. Структура синтезированных ДНКзимов и их влияние на репродукцию штамма вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5 N1) в клетках MDCK*

№	Обозначение**	5'-3'-последовательность ДНКзима***	Титр вируса, lgТЦД ₅₀ /мл
	Контроль	—	6.5
1.	dzPB2-28+	TTCTCTCCA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> ATTGAATAT	4.7
2.	dzPB2-175+	TTGCCATCA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> CCATTTCAT	5.5
3.	dzPB2-179—	AATGGATGA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> GGCAATGAA	5.5
4.	dzPB2-406—	AGGTTAAAA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> ATGGAACCT	4.0
5.	dzPB2-2254+	CAGTAAGTA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> GCTAGAGTC	5.5
6.	dzPB2-2287+	CCATCCGAA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> TCTTTTGGT	4.0
7.	dzPB2-2294—	GAATTCGGA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> GGCCATCAA	4.2
8.	dzPB2-2273—	ACAGCCAGA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> AGCGACCAA	5.0
9.	dzPB2-2255—	ACTCTAGCA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> ACTTACTGA	4.0
10.	dzPB2-2329—	TAAAAACGA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> CTTGTTTCT	5.5
11.	dzPB1-19+	CCATTCAA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> GGTTTGCCCT	5.5
12.	dzPB1-25+	TGACATCCA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> TCAAATGGT	5.5
13.	dzPB1-30—	TTGAATGGA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> GTCATCCG	5.5
14.	dzPB1-20—	GGCAAACCA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> TTGAATGGA	4.0
15.	dzPB1-2260+	TGGAACAGA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> CTTCATGAT	4.0
16.	dzPB1-2270—	TCTGTCCA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> TTGAAGA	4.5
17.	dzPB1-2255—	CTGAGATCA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> GAAGATCTG	5.5
18.	dzPA-43—	TTTGTGCGA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> AATGCTTCA	4.0
19.	dzPA-719+	CCATCCACA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> AGGCTCTAA	5.5
20.	dzPA-725+	TCGAATCCA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> CCACATAGG	4.5
21.	dzPA-736—	GGATTGCAA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> CGAACGGCT	4.0
22.	dzPA-726—	CTATGTGGA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> GGATTGCAA	4.5
23.	dzPA-2092+	ACTCCTCAA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> TGCTTCATA	5.0
24.	dzPA-2093—	ATGAAGCAA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> TGAGGAGTG	5.5
25.	dzPA-2218+	AACAAGGTA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> TTTTTTGGA	5.5
26.	dzPA-2221—	AAAAAAGTA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> CTTGTTTCT	4.5
27.	dzNP-13+	GATTATCTA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> CCTGCTTTT	5.5
28.	dzNP-17+	GAGTGATTA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> CTACCCTGC	3.5
29.	dzNP-18—	CAGGGTAGA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> AATCACTCA	3.7
30.	dzNP-43+	ACGCCATGA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> GTTGATGTC	5.5
31.	dzNP-44—	ACATCAACA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> CATGGCGTC	3.5
32.	dzNP-42—	TGACATCAA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> ATCATGGCG	3.5
33.	dzNP-1500+	GAAATAAGA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> CCTTCATTA	3.2
34.	dzNP-1505+	CCGAAGAAA <u>GGCTAGCTACAACGA</u> AAGATCCTT	4.0

Таблица 2. Окончание

№	Обозначение**	5'-3'-последовательность ДНКзима***	Титр вируса, lgТЦД ₅₀ /мл
	Контроль	—	
35.	dzNP-1506—	AGGATCTTA[GGCTAGCTACAACGA]TTCTTCGGA	4.5
36.	dzNP-1501—	AATGAAGGA[GGCTAGCTACAACGA]CTTATTTCT	4.5
37.	dzNP-1557+	AGTAGAAA[GGCTAGCTACAACGA]AAGGGTATTT	6.5
38.	dzNP-1551—	GAAAAATA[GGCTAGCTACAACGA]CCTTGTCTTCT	5.5
39.	dzM-44+	ACGTTTCGA[GGCTAGCTACAACGA]CTCGGTAG	5.5
40.	dzM-168—	GGCTAAAGA[GGCTAGCTACAACGA]AAGACCAAT	6.5
41.	dzM-227+	CACTGGGCA[GGCTAGCTACAACGA]GGTGAGCGT	4.0
42.	dzM-252+	AAGCGTCTA[GGCTAGCTACAACGA]GCTGCAGTC	4.0
43.	dzM-257—	CAGCGTAGA[GGCTAGCTACAACGA]GCTTTGTCC	4.5
44.	dzM-225—	TCACGCTCA[GGCTAGCTACAACGA]CGTGCCAG	4.0
45.	dzM-579—	CCAGCACTA[GGCTAGCTACAACGA]AGCTAAGGC	5.0
46.	dzM-1012—	AGTAAAAAA[GGCTAGCTACAACGA]TACCTTGTT	3.5

* В течение 3 сут после заражения вирусом клетки инкубировали с ДНКзимами (титры вируса даны в десятичных логарифмах 50%-ной тканевой цитопатической дозы в 1 мл).

** PB2, PB1, PA, NP и M обозначают сегменты РНК; цифра обозначает номер нуклеотида (или комплементарного ему) в полноразмерной (+) РНК сегмента (равно как и в кДНК), по 3'-концу которого происходит расщепление РНК ДНКзимом; +/- обозначают (+) или (-) цепь вирусной РНК, расщепляемой ДНКзимом.

*** Прямоугольником выделен каталитически активный фрагмент ДНКзимов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Угроза гриппозных инфекций, к которой многие относятся как к обычному сезонному явлению, вызванному тем или иным циркулирующим в человеческой популяции, но несколько изменившим антигенные свойства штаммом вируса гриппа (угроза эпидемии), приобретает совсем другие оттенки, когда новый, не циркулировавший ранее среди людей, штамм вируса гриппа уносит жизни миллионов (пандемия). Противостоять гриппу и лечить грипп трудно из-за высокой изменчивости вируса, ограниченной эффективности сезонных вакцин и несовершенства терапии. Так что необходимость дальнейшей работы по поиску новых терапевтических средств ни у кого не вызывает сомнения. Реализуемые подходы к разработке эффективных агентов, подавляющих размножение вируса гриппа, описаны в обобщающей монографии [27], материалы которой показывают, что немалые надежды связываются, в частности, с исследованиями, посвященными созданию ДНКзимов, способных высокоспецифично катализировать расщепление функционально важных последовательностей вирусных РНК. Ряд работ направлен на создание новых, химически модифицированных ДНКзимов, с целью повышения их каталитической ак-

тивности, стабильности в отношении клеточных экзо- и эндонуклеаз, изменения сайта расщепления и др., а также на разработку методов оценки антивирусной активности в системах *in vitro* и *in vivo* [22, 27–29]. Тем не менее, до сих пор не выбраны те области генома вируса гриппа, последовательности которых наиболее консервативны среди всех известных подтипов (см. [27, с. 138]). Эта стратегия может способствовать созданию терапевтических препаратов, активность которых окажется мало зависящей от мутаций.

Цель, которую мы ставили при проведении этой работы, – конструирование ДНКзимов, адресованных к общим консервативным участкам РНК актуальных в последнее время подтипов H5N1, H3N2 и H1N1 вируса гриппа А, и сравнительное исследование их способности подавлять вирусную репродукцию на примере высокопатогенного штамма вируса гриппа птиц подтипа H5N1.

На первом этапе для определения максимально “универсальных” ДНКзимов, направленных против ряда вирусов гриппа А, использовали данные работы [23], где дан глобальный анализ белковых последовательностей, кодируемых штаммами вирусов гриппа А человека и птиц (подтипов H1N1, H1N2, H3N2, H5N1 и т.д.), изолированны-

ми за последние 30 лет. Как и следовало ожидать, в случае чрезвычайно изменчивых поверхностных гликопротеинов HA и NA, определяющих подтип вируса гриппа А, консервативности не выявлено. Среди различных подтипов вируса гриппа А наиболее консервативны следующие компоненты вириона: субъединицы РНК-зависимой РНК-полимеразы (PB2, PB1 и PA), белок NP и белок M1.

При выравнивании пяти указанных сегментов РНК выявлено 24 консервативных блока (длина каждого ≥ 19 н.), которые далее были использованы для дизайна вирус-специфических ДНКзимов. В качестве основы для синтеза ДНКзимов мы выбрали каталитически активную дезоксирибонуклеотидную последовательность “10-23” [18], расщепляющую РНК-последовательности вида $5'N_nR\downarrow YN_n$.

Пример результатов поиска потенциальных сайтов расщепления 5-го сегмента РНК вирусов гриппа А ДНКзимами “10-23” приведен в табл. 1. Аналогичным образом, в (+) и (-) цепях консервативных участков сегментов 1, 2, 3 и 7 геномов вирусов гриппа А в общей сложности выявлено около 80 потенциальных сайтов расщепления ДНКзимами типа “10-23”. Следующий этап отбора ДНКзимов проводили по таким критериям как минимизация вероятности образования гомодимерных или шпилечных структур и максимально приближенное к центру положение ДНКзима в пределах мишени – целевого консервативного участка вирусной РНК (при наличии нескольких потенциальных сайтов расщепления в одном участке). В результате были отобраны и синтезированы 46 (с учетом контрольного dzPB2-28+) ДНКзимов длиной 33 н., специфичных как к (+), так и к (-) цепям полноразмерных (включая не-транслируемые 5'- и 3'-последовательности) сегментов РНК вирусов гриппа А (табл. 2).

Основным экспериментальным результатом стал скрининг противовирусной активности ДНКзимов, адресованных к геномным последовательностям вирусов гриппа А, на модели клеток MDCK, инфицированных вирусом гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1). Данные, приведенные в табл. 2 и на рис. 4, свидетельствуют о том, что большая часть ДНКзимов в той или иной мере проявляет противовирусную активность. Особого внимания заслуживают 17 ДНКзимов, которые подавляют тканецитопатическое действие вируса в ~ 300 и более раз, а 5 из них снижали титр вируса на три порядка. Примечательно, что 4 из наиболее активных ДНКзимов специфичны к (+) или (-) РНК 5-го сегмента вирусного генома – сегмента, кодирующего белок NP. Роль этого белка в инфекционном цикле вируса гриппа известна [24–26]. Шестой препарат (dzM-1012-) специфичен к (-) РНК 7-го сегмента, кодирующего белки M1 и M2. Таким образом,

в ходе данного исследования выявлен ряд вирус-специфических ДНКзимов, обладающих выраженной активностью против вируса гриппа A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и, следовательно, перспективных с точки зрения получения на их основе противогриппозных препаратов.

В заключение отметим, что подобные ген-направленные препараты могут быть быстро переориентированы на любой вновь возникший штамм вируса (включая мутантные лекарственно устойчивые формы), тогда как поиск новых эффективных низкомолекулярных химических соединений занимает, как правило, годы.

Работа выполнена при поддержке Федеральной научно-технической программы по направлению “Живые системы” в рамках Государственного контракта № 02.512.12.2038 и ведомственной аналитической программы Министерства образования и науки РФ “Развитие научного потенциала высшей школы” (№ 2.1.1/5642).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лемб Р. 1986. Сегменты РНК вируса гриппа и кодированные ими белки. *Генетика вирусов гриппа*. Под ред. Пейлиза П., Кингсбери Д.У. М.: Медицина, стр. 31–58.
2. Bouvier N.M., Palese P. 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine*. **26**, Suppl. 4, D49–D53.
3. Hurt A.C., Selleck P., Komadina N., Shaw R., Brown L., Barr I.G. 2007. Susceptibility of highly pathogenic A(H5N1) avian influenza viruses to the neuraminidase inhibitors and adamantanes. *Antivir. Res.* **73**, 228–231.
4. Lackenby A., Hungnes O., Dudman S.G., Meijer A., Paget W.J., Hay A.J., Zambon M.C. 2008. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A (H1N1) viruses in Europe. *Euro Surveill.* **13**, 8026.
5. Бурцева Е.И., Шевченко Е.С., Белякова Н.В., Оскерко Т.А., Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Вартамян Р.В., Прилипов А.Г., Ротанов М., Заплатников А.Л. 2009. Мониторинг чувствительности выделенных в России эпидемических штаммов вирусов гриппа к этиотропным химиопрепаратам. *Вопр. вирусологии*. **54**, 24–28.
6. Toovey S., Rayner C., Prinssen E., Chu T., Donner B., Thakrar B., Dutkowski R., Hoffmann G., Breidenbach A., Lindemann L., Carey E., Boak L., Gieschke R., Sacks S., Solsky J., Small I., Reddy D. 2008. Assessment of neuropsychiatric adverse events in influenza patients treated with oseltamivir: a comprehensive review. *Drug Saf.* **31**, 1097–1114.
7. Silverman S.K. 2009. Artificial functional nucleic acids: aptamers, ribozymes, and deoxyribozymes identified by in vitro selection. In: *Functional nucleic acids for analytical applications*. Eds Yingfu L., Yi L. N.Y.: Springer, pp. 47–108.
8. Bhindi R., Fahmy R.G., Lowe H.C., Chesterman C.N., Dass C.R., Cairns M.J., Saravolac E.G., Sun L.Q., Khachigian L.M. 2007. Brothers in arms: DNA Enzymes, short interfering RNA, and emerging wave of small-mole-

- cule nucleic acid-based gene-silencing strategies. *Am. J. Pathol.* **171**, 1079–1088.
9. Spurgers K.B., Sharkey C.M., Warfield K.L., Bavari S. 2008. Oligonucleotide antiviral therapeutics: antisense and RNA interference for highly pathogenic RNA viruses. *Antivir. Res.* **78**, 26–36.
 10. Sanghvi Y.S. 2011. A status update of modified oligonucleotides for chemotherapeutic applications. *Curr. Protoc. Nucl. Acid Chem.* **46**, 4.1.1–4.1.22.
 11. Wilson D.S., Szostak J.W. 1999. *In vitro* selection of functional nucleic acids. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 611–647.
 12. Joyce G.F. 2004. Directed evolution of nucleic acids enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 791–836.
 13. Joyce G.F. 2001. RNA cleavage by the 10-23 DNA enzyme. *Methods Enzymol.* **341**, 503–517.
 14. Feldman A.R., Sen D. 2001. A new and efficient DNA enzyme for the sequence-specific cleavage of RNA. *J. Mol. Biol.* **313**, 283–294.
 15. Silverman S.K. 2005. *In vitro* selection, characterization, and application of deoxyribozymes that cleave RNA. *Nucl. Acids Res.* **33**, 6151–6163.
 16. Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* **41**, 95–98.
 17. Баррет Т., Инглис С. 1988. Выращивание, очистка и титрование вирусов гриппа. *Вирусология. Методы*. Под ред. Мейхи Б. М.: Мир, стр. 169–173.
 18. Cairns M.J., King A., Sun L.Q. 2003. Optimization of the 10-23 DNAzyme-substrate pairing interactions enhanced RNA cleavage activity at purine-cytosine target sites. *Nucl. Acids Res.* **31**, 2883–2889.
 19. Santoro S.W., Joyce G.F. 1997. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 4262–4266.
 20. Cairns M.J., Sun L.Q. 2004. Target-site selection for the 10–23 DNAzyme. *Methods Mol. Biol.* **252**, 267–277.
 21. Toyoda T., Imamura Y., Takaku H., Kashiwagi T., Hara K., Iwahashi J., Ohtsu Y., Tsumura N., Kato H., Hamada N. 2000. Inhibition of influenza virus replication in cultured cells by RNA-cleaving DNA enzyme. *FEBS Lett.* **481**, 113–116.
 22. Takahashi H., Hamazaki H., Habu Y., Hayashi M., Abe T., Miyano-Kurosaki N., Takaku H. 2004. A new modified DNA enzyme that targets influenza virus A mRNA inhibits viral infection in cultured cells. *FEBS Lett.* **560**, 69–74.
 23. Heiny A.T., Miotto O., Srinivasan K.N., Khan A.M., Zhang G.L., Brusci V., Tan T.W., August J.T. 2007. Evolutionarily conserved protein sequences of influenza A viruses, avian and human, as vaccine targets. *PLoS One.* **2**, e1190.
 24. Ye Q., Krug R.M., Tao Y.J. 2006. The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature.* **444**, 1078–1082.
 25. Tompkins S.M., Lo C.-Y., Tumpey T.M., Epstein S.L. 2004. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 8682–8686.
 26. Ozawa M., Fujii K., Muramoto Y., Yamada S., Yamayoshi S., Takada A., Goto H., Horimoto T., Kawaoka Y. 2007. Contributions of two nuclear localization signals of influenza A virus nucleoprotein to viral replication. *J. Virol.* **81**, 30–41.
 27. Torrence P.F. 2007. Combating the threat of pandemic influenza: drug discovery approaches. Medical, Wiley-Interscience, p. 308.
 28. Saravolac E.G., Wong J.P. 2007. Recent Patents on development of nucleic acid-based antiviral drugs against seasonal and pandemic influenza virus infections. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* **2**, 140–147.
 29. Wong J.P., Christopher M.E., Salazar A.M., Sun L.Q., Viswanathan S., Wang M., Saravolac E.G., Cairns M.J. 2010. Broad-spectrum and virus-specific nucleic acid-based antivirals against influenza. *Front. Biosci.* **2**, 791–800.