



Бишани Али

**Влияние химических модификаций и липидных средств
доставки на биологическую активность
иммуностимулирующей РНК in vitro и in vivo**

1.5.3 — молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата
биологических наук

Новосибирск — 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»

Научный руководитель:

Черноловская Елена Леонидовна, д.б.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, главный научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот.

Официальные оппоненты:

Рыкова Елена Юрьевна, д.б.н. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики СО РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции экспрессии генов.

Коваль Ольга Александровна, д.б.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии.

Сорокина Ирина Васильевна, д.б.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории фармакологических исследований.

Защита состоится « » 2024 г. в часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте <http://www.niboch.nsc.ru/>

С авторефератом можно ознакомиться на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан « » 2024 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,

к.х.н. Пестряков П. Е

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Терапевтические нуклеиновые кислоты (ТНК) - это различные молекулы ДНК или РНК, как природные, так и химически модифицированные, которые могут регулировать экспрессию генов, направлять синтез белков и мобилизовать иммунную систему для противовирусной и противоопухолевой защиты. ТНК распознаются рецепторами клетки, известными как паттерн-распознающие рецепторы (PRR). Возможность активации этих рецепторов зависит от природы, длины, структуры, местоположения и последовательности нуклеиновых кислот. Такое распознавание активирует сигнальные пути, которые могут вызвать апоптоз, блокировать пролиферацию и стимулировать выделение интерферонов или противовоспалительных цитокинов в зависимости от типа клетки и лиганда. Иммуностимулирующие ТНК могут непосредственно ингибировать рост опухоли и вызывать апоптоз, либо косвенно активировать иммунную систему для уничтожения опухоли.

Эффективность ТНК во многом зависит от их доставки к целевым клеткам. Для этого используются транспортные лиганды или включение ТНК в комплексы с катионными липидами, липосомами, полимерами или наночастицами. Многочисленные исследования были направлены на оптимизацию липидных формул для доставки антисенс-олигонуклеотидов, siРНК, мРНК и терапевтических вакцин при различных режимах введения. Однако систематическое изучение доставки иммуностимулирующих ТНК и влияние систем доставки на их эффективность пока не проводилось.

РНК по своей природе нестабильна из-за эндо- и экзорибонуклеаз, которые могут расщеплять молекулу РНК в клетках и жидкостях организма, таких как сыворотка крови. Для защиты РНК используют системы доставки, такие как липидные наночастицы, и химические модификации рибозо-фосфатного остова. Этот метод успешно применяется для siРНК и используется в одобренных для клинического применения РНК-препаратах, увеличивая устойчивость к ферментативной деградации при сохранении биологической активности. Влияние химических модификаций на иммуностимулирующие РНК изучено мало, поскольку исследования в основном направлены на блокирование их иммуностимулирующих свойств.

Ранее ЛБНК ИХБФМ СО РАН была обнаружена короткая дцРНК длиной 19 п.н. с 3'-три-нуклеотидными выступами (исРНК), которая демонстрирует сильное антипролиферативное действие против опухолевых клеток и иммуностимулирующую активность через активацию продукции цитокинов (интерферонов I типа). Эта исРНК не имеет значительного сходства с мРНК человека или мыши и не изменяет экспрессию генов через РНК-интерференцию. Исследования *in vitro* и *in vivo* показали её иммуностимулирующие, интерферон-индуцирующие, антипролиферативные, противоопухолевые и противовирусные свойства.

Изучение влияния исРНК на патологические процессы, сопровождающиеся активацией врожденного иммунитета, включая воспаление и фиброз, необходимо для определения профиля безопасности препарата для потенциального клинического применения. Это является критическим пробелом в современной литературе по иммуностимулирующим РНК. Решение этих проблем важно для продвижения использования иммуностимулирующих нуклеиновых кислот.

Целью данной работы являлось исследовать влияние химических модификаций и липидных средств доставки на биологическую активность иммуностимулирующей РНК *in vitro* и *in vivo*.

В ходе исследования были **поставлены следующие задачи**:

1. Оценить влияние введения комплексов исРНК/липид на развитие фиброза, индуцированного блеомицином или липополисахаридом у мышей.
2. Исследовать влияние состава липидной системы доставки на основе 2X3-DOPE на интерферон-индуцирующее действие исРНК на первичной культуре адгерентных мононуклеаров периферической крови человека и на мышцах *in vivo*.
3. Определить влияние состава липидной системы доставки на основе 2X3-DOPE на эффективность антипролиферативного действия исРНК в культурах опухолевых клеток B16 и RLS40 и противоопухолевого действия на опухоли, образованные этими клетками *in vivo*.
4. Исследовать влияние химических модификаций 2'-фтор-, 2'-О-метил, фосфотиоат, холестерин, концевой амин в составе исРНК на эффективность ее интерферон-индуцирующего действия *in vivo*.
5. Установить влияние химических модификаций 2'-фтор-, 2'-О-метил, фосфотиоат, холестерин, концевой амин в составе исРНК на эффективность антипролиферативного действия исРНК в культуре опухолевых клеток B16.

Научная новизна работы. В работе впервые изучено влияние исРНК на развитие такого патологического состояния, как фиброз и показано, что профилактическое введение исРНК в комплексе с липосомами может предотвращать развитие фибротических изменений, вызванных ЛПС. Впервые изучено влияние системы доставки на биологическую активность исРНК и показано, что состав катионных липосом принципиально важен для интерферогенного, антипролиферативного и противоопухолевого действия исРНК. Впервые изучены исРНК, содержащие химические модификации рибозы, фосфата, а также 3' и 5' концов. Впервые показано, что модификации по-разному влияют на интерферон индуцирующую и антипролиферативную функции исРНК. Определена переносимость этих модификаций в зависимости от их положения и выбраны лидерные дуплексы с улучшенными свойствами.

Теоретическая и практическая значимость работы. В работе изучено, как исРНК воздействует на патологические состояния в организме, что необходимо для доказательства безопасности исРНК и позволяет квалифицировать ее как безопасный и эффективный прототип препарата для иммунотерапии. Исследованные в данной работе липосомы могут быть использованы для доставки широкого спектра терапевтических нуклеиновых кислот для различных целей, полученные данные позволяют выбирать липосомы, которые могут усиливать или ингибировать специфические функции. Полученные в настоящей работе данные о влиянии введения химических модификаций в составе исРНК, не только могут помочь улучшить эффективность и специфичность действия исРНК, но и блокировать нецелевую иммунную активацию под действием препаратов на основе siРНК и mРНК вакцин.

Методология и методы исследования. В работе использовали методы иммуоферментного анализа, профилирования цитокинов с помощью флуоцитометрии, методы работы с клеточными культурами и лабораторными животными. Также

использовали биохимические методы для оценки пролиферации, гистологический анализ и морфометрирование.

Положения, выносимые на защиту:

1. Введение исРНК в комплексе 2X3-DOPE перед индукцией фиброза легких липополисахаридом снижает воспаление и фибротические изменения, а её двукратное введение после индукции не влияет на развитие патологии, подтверждая безопасность препарата.
2. Увеличение длины ПЭГ в липоконъюгатах, входящих в состав липосом используемых для доставки исРНК, увеличивает секрецию ИФН- α под влиянием исРНК.
3. Эффективность антипролиферативного и противоопухолевого действия исРНК в комплексе с липосомами на меланому В16 коррелирует с эффективностью трансфекции исРНК в опухолевые клетки и не зависит от способности исРНК индуцировать интерферон.
4. Химические модификации в составе исРНК, такие как 2'-фтор, 2'-О-метил, фосфотиоат, холестерин и концевой амин, по-разному влияют на интерферон-индуцирующие и антипролиферативные свойства исРНК, что указывает на то, что эти функции опосредуются разными клеточными сигнальными путями.

Личный вклад соискателя. Представленные в работе экспериментальные данные были получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследования, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов. Планирование, анализ и обсуждение результатов работы проведено под руководством д.б.н. Е.Л. Черноловской. Синтез олигорибонуклеотидов и их химически модифицированных аналогов был проведён к.х.н. М.И. Мещаниновой (Лаборатория химии РНК, ИХБФМ СО РАН). Гистологический анализ проведён к.м.н. А.В. Сеньковой (Лаборатория биохимии нуклеиновых кислот, ИХБФМ СО РАН). Синтез катионных липосом проведён группой под руководством д.х.н., М. А. Маслова (Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова) характеристика размера и заряда липосом была проведена Д.В. Гладких (Лаборатория биохимии нуклеиновых кислот, ИХБФМ СО РАН).

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты работ представлены на 5-ти международных конференциях: всероссийская конференция Синтетическая биология и биофармацевтика (Новосибирск 2022), BioTop-2023. Достижения молодых ученых ИХБФМ СО РАН (Новосибирск 2023), Конгресс молодых ученых 2023 (Сочи, 2023), ХимБиоSeasons (Калининград, 2024), Форум «Ломоносов-2024» (Москва, 2024).

По материалам диссертационной работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus.

Объём и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Текст изложен на 134 страницах, иллюстрирован 24 рисунками, включает 10 таблиц, список литературы содержит 421 библиографических источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Влияние исРНК на развитие фиброза легких, индуцированного BLM и LPS, у мышей

Для доставки исРНК в клетки-мишени использовались катионные липосомы (2X3-DOPE), состоящие из поликатионного амфифила 2X3 и липида-хелпера DOPE. Эти липосомы эффективно доставляли нуклеиновые кислоты в клетках *in vitro* и *in vivo*. Для оценки антифибротического эффекта *in vivo* липоплексы исРНК/2X3-DOPE вводили мышам внутривенно по профилактической и терапевтической схемам. Профилактическая схема включала однократное введение исРНК за 24 часа до индукции фиброза, а терапевтическая – два введения исРНК через 2 и 7 дней после индукции. Фиброз легких инициировали однократным интраназальным введением BLM или LPS. Контрольные группы включали мышей с фиброзом без лечения и мышей, получавших только 2X3-DOPE. Морфологические изменения в легких оценивали через 28 дней после индукции.

Исследование изменений массы тела в течение 28-дневного периода после индукции воспаления легких с использованием BLM показало минимальные колебания в относительной массе тела после инъекций. Небольшое снижение массы наблюдалось через 5 дней после индукции в группах контроля, исРНК П.с, 2X3-DOPE П.с и 2X3-DOPE Т.с, но эти колебания не превышали 5%. Мыши из группы исРНК Т.с не теряли вес после индукции BLM, а затем демонстрировали прирост веса, сравнимый с приростом у здоровой группы. Различия в уровнях IL6 в бронхоальвеолярной жидкости у мышей в конце эксперимента не были значимыми. Уровни TNF- α в конце эксперимента не превышали 40 пг/мл и не различались значимо между экспериментальными группами.

Все мыши в группах, получавших LPS, показали резкое снижение массы тела на 3–5-й день с частичным восстановлением к 7–9-му дню. Различий в тенденции к восстановлению веса между экспериментальными и контрольной группами не было. Различия в уровнях IL6 в бронхоальвеолярной жидкости мышей с фиброзом, вызванным LPS, не были значимыми, хотя наблюдалась тенденция к снижению при использовании исРНК в профилактическом режиме. Уровни TNF- α практически вернулись к норме и не отличались между группами.

Гистологическое исследование легких подтвердило наличие соединительнотканых волокон в нормальной структуре легких (Рис. 1А). На 28-й день после введения BLM и LPS воспаление в легких сопровождалось инфильтрацией лимфоцитами и макрофагами, фиброзные изменения представлены избыточным отложением компонентов внеклеточного матрикса и расширением волокон соединительной ткани преимущественно вокруг сосудов и бронхов (Рис. 1Б).

Введение исРНК по профилактической схеме мышам, получавших BLM, уменьшала остаточное воспаление в легких в 1.4 раза по сравнению с контролем и в 1.5 раза по сравнению с 2X3-DOPE, а также снижала фиброзные изменения в 1.3 и 1.4 раза соответственно (Рис. 1А). Однако различия не были статистически значимыми. Введение исРНК по терапевтической схеме не влияло на воспаление или фиброз в легких (Рис. 1Б).

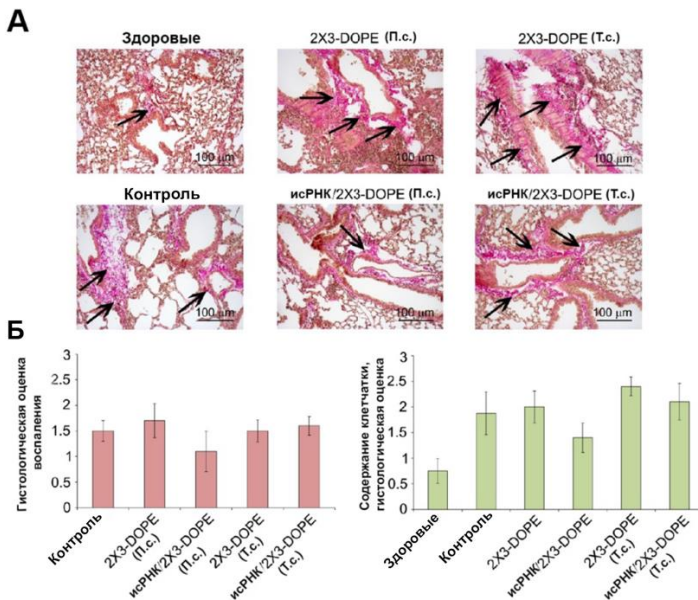


Рисунок 2. Влияние исРНК на воспалительные и фибротические изменения легочной ткани мышей с BLM-индуцированным фиброзом легких. (А) Репрезентативные гистологические изображения срезов легких здоровых мышей и мышей, индуцированных BLM, без лечения и после введения исРНК/2X3-DOPE через 4 недели после индукции. Окраска по Ван-Гизону, исходное увеличение $\times 200$. Черные стрелки указывают на разрастание волокон в легочной ткани. (Б) Интенсивность воспалительно-фиброзных изменений в легких мышей контрольной и опытной групп, оцененная полуколичественным методом, где 0 – отсутствие патологических изменений, 1 – слабое воспаление и фиброз, 2 – умеренное воспаление и фиброз, 3 – тяжелое воспаление и фиброз. Количество исследованных образцов составляло пять для каждой экспериментальной группы.

Введение исРНК по профилактической схеме мышам, получавших LPS, уменьшало воспаление в легких в 2 и 1.8 раза по сравнению с контролем и 2X3-DOPE соответственно, что не было статистически значимым (Рис 2А). Фиброзные изменения в легких были значительно снижены после введения исРНК за 24 ч до LPS в 2 и 2.2 раза по сравнению с контролем и 2X3-DOPE (Рис. 2Б). Введение исРНК по терапевтической схеме не влияло на воспаление или фиброз, но не усугубляло эти процессы и могло быть использовано для активации врожденного иммунитета.

Наши данные показали, что профилактическое лечение исРНК было более эффективно при фиброзе, вызванном LPS, чем при фиброзе, вызванном BLM. Различие может быть связано с разной динамикой патологических процессов. Хотя в конечном итоге параметры фиброза и воспаления у мышей, подвергнутых воздействию BLM или LPS, были почти одинаковыми, BLM сначала вызывает повреждение клеток и апоптоз, что приводит к высвобождению DAMPs и воспалению. LPS, как компонент бактериальной стенки (PAMPs), сразу вызывает синтез сигнальных молекул и воспаление. Возможно, пик цитокинов при воздействии BLM наступает позже и длится дольше, чем действие исРНК,

что подтверждается данными Kimura и др., показывающими более высокие уровни цитокинов после воздействия LPS, чем после воздействия BLM.

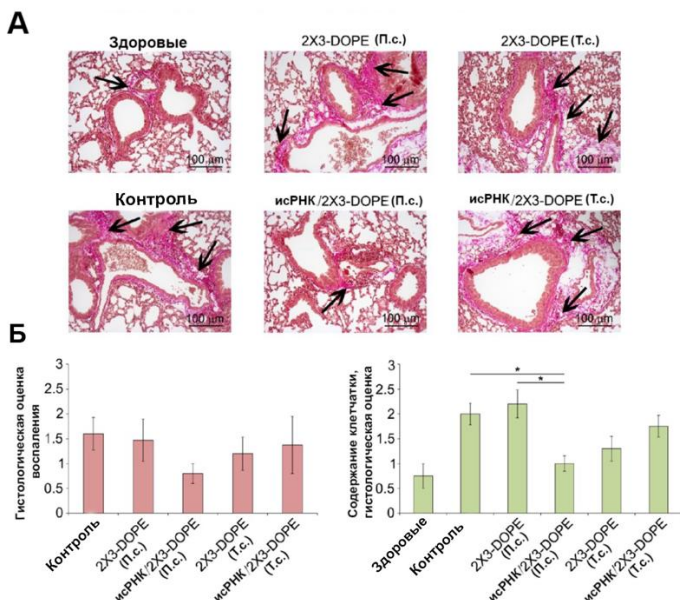


Рисунок 3. Влияние исРНК на воспалительные и фибротические изменения легочной ткани мышей с LPS -индуцированным фиброзом легких. (А) Репрезентативные гистологические изображения срезов легких здоровых мышей и мышей, индуцированных LPS, без лечения и после введения исРНК/2X3-DOPE через 4 недели после индукции. Окраска по Ван-Гизону, исходное увеличение $\times 200$. Черные стрелки указывают на накопление коллагеновых волокон в легочной ткани. (Б) Интенсивность воспалительно-фиброзных изменений в легких мышей контрольной и опытной групп, оцененная полуколичественным методом, где 0 – отсутствие патологических изменений, 1 – слабое воспаление и фиброз, 2 – умеренное воспаление и фиброз, 3 – тяжелое воспаление и фиброз. Количество исследованных образцов составляло пять для каждой экспериментальной группы.

Таким образом, сравнение эффектов исРНК в профилактической и терапевтической схемах при фиброзе, вызванном BLM и LPS, показало, что исРНК можно использовать при воспалительных состояниях и риске фиброза без ухудшения ситуации. Противовоспалительный эффект исРНК подтверждает ее безопасность при инфекциях и опухолях, а также преимущества в снижении вреда от цитостатиков. Профилактическое применение исРНК может предотвратить развитие легочного фиброза, но для оптимизации доз и липидных формул нужны дальнейшие исследования.

2. Влияние состава катионных липосом на эффективность доставки ими в клетки иммуностимулирующей РНК

В этой части исследования мы изучили влияние различных систем доставки на цитокин-индуцирующую, антипролиферативную и противоопухолевую активность

исРНК. Системы доставки были предоставлены проф. М. А. Масловым и коллегами (МИТХТ, Москва). Липидные системы были сконструированы на основе липосом 2X3-DOPE, которые эффективно доставляют нуклеиновые кислоты. Поверхность липосом модифицировали полиэтиленгликолем (PEG) и липоконъюгатом с фолатом (F12) для стабилизации и накопления в целевых клетках. Для этого в состав липосом вводили липоконъюгаты, содержащие PEG, отличающиеся по молекулярной массе (800, 1500 и 2000 Да) и структуре (Рис. 3). Серия Р содержала PEG, присоединенный к 1,2-ди-О-дигетрадецил-гас-глицеролу в качестве якоря, а серия diР была представлена PEG-цепью разной длины, содержащей на обоих концах аналогичные якорные группы. Липоконъюгаты серии diР, включенные в состав липосом, закрепляются на поверхности липосом обеими якорными группами и принимают форму петли, что позволяет образовывать более плотную, но тонкую защитную оболочку.

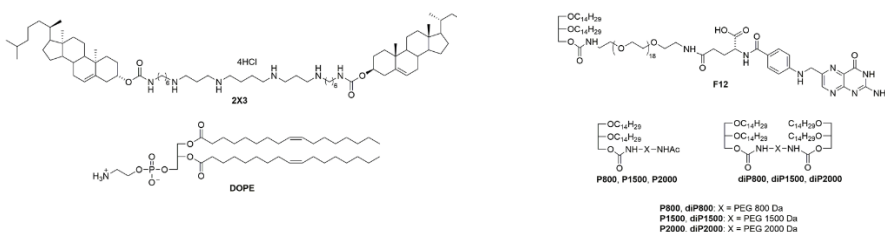


Рисунок 3. Структуры липидов, использованных для приготовления липосом.

Характеристики липосом и липоплексов с исРНК показали, что размеры липосом не превышают 130 нм, а добавление липоконъюгатов уменьшает их размеры. Комплексы исРНК/липосомы сохраняют приемлемый размер для доставки.

2.1. Активация продукции цитокинов исРНК/липосомами в РВМС человека

Иммуностимулирующее воздействие липосом и комплексов исРНК/липосом было исследовано в культурах РВМС человека. Уровни IFN- α , IL-6 и TNF- α для оценки терапевтического потенциала и возможной токсичности определяли с помощью ИФА.

Результаты показывают, что через 6 часов после трансфекции значительных изменений в уровне IFN- α не наблюдалось, затем, через 16 часов, уровни значительно повышаются (Рис. 4А), после чего снова снижаются до своих исходных значений через 24 часа. Комплекс исРНК/P1500 показал максимальный подъем уровня IFN- α через 16 часов (872.93 пг/мл), тогда как липосомы P1500 не влияли на уровень IFN- α (Рис. 4А). Уровень TNF- α незначительно увеличивался через 16 часов под действием липосом 2X3-DOPE, комплексов исРНК/diP800 (2 и 4%), а так же P1500. Липосомы diP800 и P1500 сами по себе не вызывали такого эффекта (Рис. 4В). Умеренный подъем уровня IL-6 наблюдался через 6 ч после трансфекции; более высокие уровни были отмечены для комплексов исРНК с diP800 и F12. Комплексы P1500 и исРНК/P1500 незначительно повышали уровень IL-6 (Рис. 4С).

С учетом наблюдаемых результатов исРНК/P1500 оказался наиболее благоприятной формулой, поскольку не вызывал явной активации выделения про-воспалительных цитокинов, обеспечивая специфическую и эффективную продукцию IFN- α . Учитывая положительное воздействие липоконъюгата с длинной цепью PEG на эффективность действия доставляемой исРНК, мы добавили P2000, а также diP1500 и diP2000, к набору изучаемых липосом.

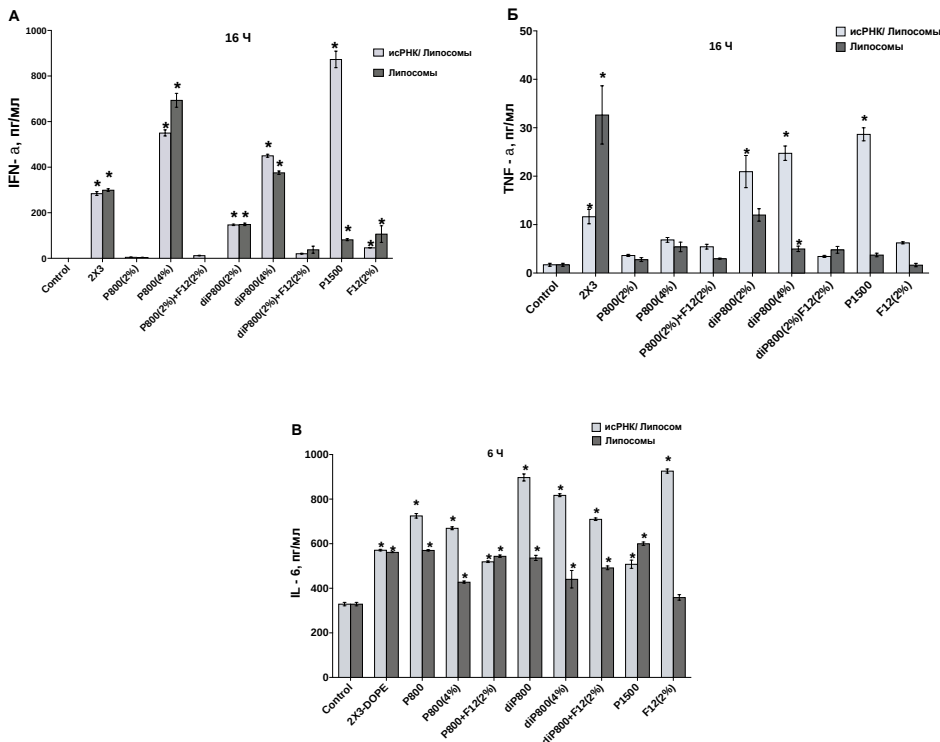


Рисунок 4. Уровни цитокинов в первичной культуре клеток PBMC человека после трансфекции клеток комплексами исРНК/липосомы. Уровни IFN- α (А) и TNF- α (Б) через 16 ч после трансфекции и уровни IL-6 (В) через 6 ч после трансфекции были измерены с помощью ELISA. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартного отклонения (SD). Статистически значимые различия между образцами, обработанными комплексами исРНК/липосомы, и образцами, обработанными пустыми липосомами, обозначены звездочкой (* $p < 0.001$, ** $p < 0.005$); двухфакторный ANOVA, тест множественного сравнения Даннетта.

2.2. Активация продукции цитокинов, индуцированная исРНК/липосомами у мышей

Для исследования влияния липосомных композиций на иммуностимулирующую активность исРНК у мышей, дипоплексы, содержащие исРНК и различные липосомы, вводили внутривенно, и через 6 часов измеряли уровень цитокинов и интерферонов в сыворотке крови. Основными активируемыми цитокинами были MCP-1, интерфероны α и γ , отмечена также умеренная активация интерферона β , IL-6, IL-1 α и TNF α и слабая активация IL-10 и IL-27 (Рис. 5).

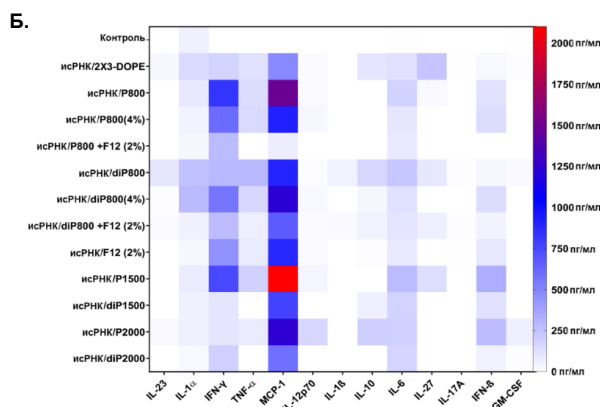
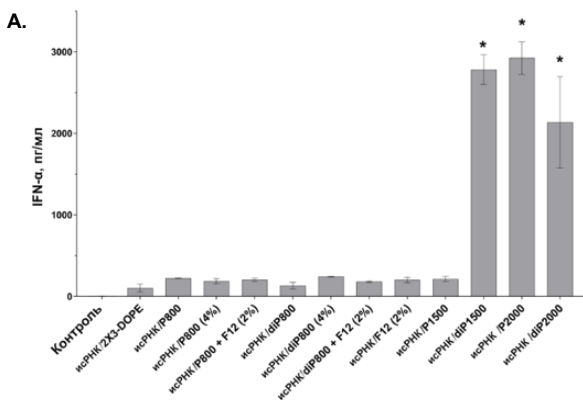


Рисунок 5. Уровни цитокинов в сыворотке крови мышей СВА (n=3) через 6 ч после в/в введения комплексов исРНК/липосомы. А. Уровни IFN-α в сыворотке, измеренные методом ELISA. Данные представлены в виде среднего ± стандартного отклонения (SD). Статистически значимые различия между экспериментальными группами и контрольной группой обозначены звездочкой (* $p < 0.001$); обычный двухфакторный ANOVA, множественный сравнительный анализ Даннетта. Б. Профилирование с использованием набора LEGEND plex™ Mouse Inflammation Panel (13-plex).

Липopleксы с diP1500, P2000 и diP2000 вызвали значительное повышение уровня IFN-α, особенно с P2000 (Рис. 5А). Наиболее высокие уровни IFN-γ были обнаружены после индукции комплексами исРНК с P800 и P1500 (800 пг/мл), а повышенные уровни IFN-β наблюдались у мышей, получавших комплексы, содержащие P1500 или P2000 (300 пг/мл). Незначительная активация провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF-α (250 пг/мл) была отмечена в группах, получавших комплексы с P1500 и diP800. Полученные данные показывают, что базовая система (2X3-DOPE) вызывает умеренное увеличение уровня цитокинов. Анализ данных показывает, что удлинение цепи PEG в составе липосомы оказывает значительное воздействие на иммунный ответ, который вызывает исРНК, доставляемая рассматриваемыми липосомами: липopleксы с diP1500, P2000 и diP2000 вызывают заметное увеличение уровней IFN-α и γ без значительного повышения уровней провоспалительных цитокинов. Сравнение липосом серии P (одна якорная группа на PEG-липоконъюгате) с аналогичными липосомами из серии diP (две якорные группы) показывает, что более прочное прикрепление PEG и уменьшение размера защитной оболочки ослабляют иммуностимулирующий эффект комплексов исРНК/липосомы и снижают активацию интерферонов и выделение MCP-1. Включение липоконъюгата F12 или увеличение содержания липоконъюгатов не оказывало положительного эффекта.

Наконец, сравнение всех протестированных формул с точки зрения положительных (производство интерферонов и МСР-1) и отрицательных (противовоспалительная активность) свойств позволяет выбрать Р2000 для дальнейших *in vivo* экспериментов.

2.3. Антипролиферативная активность комплексов исРНК/липосомы *in vitro*

Для исследования антипролиферативных эффектов исРНК/Р2000 и исРНК/2Х3-DOPE на опухолевые клетки были выбраны клеточные линии меланомы В16 и устойчивой к цитостатикам лимфосаркомы RLS40. Они обладают туморогенностью в сингенных мышах и могут быть использованы для оценки противоопухолевой активности *in vivo*.

В течение наблюдения клетки RLS40 экспоненциально росли и не проявляли значимой реакции на обработку исРНК/липосомами или только липосомами. Количество живых клеток в группах, обработанных исРНК/липосомами, было равно количеству в группе с липосомами и иногда превышало контрольную группу (Рис. 6А). Иная картина наблюдалась для клеток меланомы В16: количество живых клеток, обработанных исРНК/2Х3-DOPE, значительно уменьшилось по сравнению с контрольной группой и группой с липосомами уже на следующий день после трансфекции. Пустые липосомы Р2000 незначительно подавляли рост клеток в первые три дня, но затем клетки восстанавливали скорость роста. Комплексы исРНК/Р2000 практически не влияли на скорость пролиферации клеток (Рис. 6Б). Такое различие может быть связано с характеристиками самих клеток, такими как наличие рецепторов и компонентов сигнальных путей, а также с эффективностью накопления исРНК в клетках.

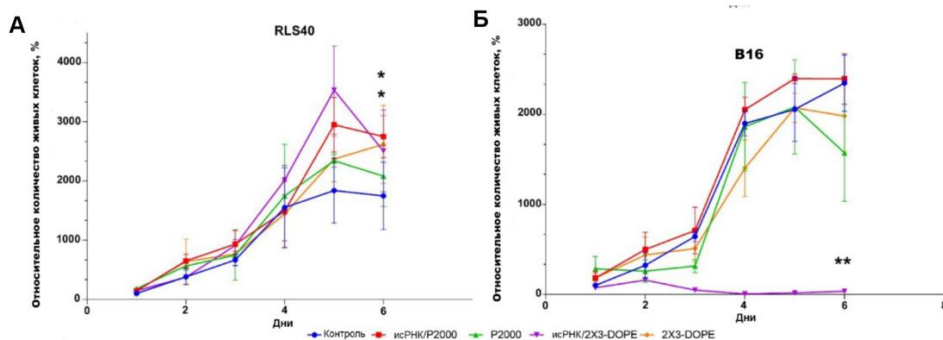


Рисунок 6. Антипролиферативная активность комплексов исРНК/липосомы в клетках меланомы В16 и лимфосаркомы RLS40. А. Динамика роста клеток лимфосаркомы RLS40. Б. Динамика роста клеток меланомы В16. Относительное количество живых клеток оценивали с помощью WST-1, количество клеток в контрольной группе на второй день было принято за 100%. Статистически значимые различия между экспериментальными группами (исРНК/Р2000 и Р2000 в RLS40, исРНК/2Х3-DOPE в В16) и контрольной группой обозначены звездочкой (* $p < 0.05$ для Р2000 и исРНК/Р2000, ** $p < 0.005$ для исРНК/2Х3-DOPE); двухфакторная ANOVA, тест множественных сравнений Даннетта.

Результаты показали, что накопление исРНК в клетках меланомы В16 происходило в 2 раза эффективнее, чем в клетках лимфосаркомы RLS40, хотя уровни накопления комплексов исРНК/2Х3-DOPE в клетках RLS40 также были значительны. В обеих клеточных линиях накопление комплексов исРНК с липосомами 2Х3-DOPE было эффективнее, чем с липосомами Р2000.

Мы использовали активацию маркера иммуностимуляции мРНК *Pkr* для оценки иммунного ответа в клеточных линиях различного происхождения. Экспрессия *Pkr* мРНК в клетках RLS40 после трансфекции исРНК не изменялась. В клетках меланомы B16, обработанных исРНК/2X3-DOPE или 2X3-DOPE, наблюдалось 7-кратное увеличение уровней экспрессии *Pkr* мРНК. Комплекс исРНК/P2000 вызвал 6-кратное увеличение, а пустые липосомы P2000 4-кратное. ИсРНК без липосом не влияла на экспрессию маркера. Таким образом, RLS40 относится к "нереагирующим" клеточным линиям скорее из-за особенностей их тканевого происхождения и профиля транскриптома, а не из-за невозможности проникновения исРНК в эти клетки.

2.4. Противоопухолевая активность комплексов исРНК/липосомы на мышинных моделях

При переходе от *in vitro* к *in vivo* такие факторы, как биораспределение препарата и скорость выведения из кровотока, могут влиять на эффективность противоопухолевого действия исРНК. Противоопухолевая активность может зависеть от прямого действия исРНК на опухолевые клетки и активации иммунной системы. Для оценки эффекта комплексов исРНК/липосомы *in vivo* использовали сингенные мышинные модели: меланому B16 у мышей C57BL/6 и лимфосаркому RLS40 у мышей CBA. Комплексы или пустые липосомы вводили внутривенно на 10, 13 и 16 дни после имплантации опухоли. Через день измеряли рост опухоли, в конце эксперимента собирали органы для гистологического исследования (Рис. 7).

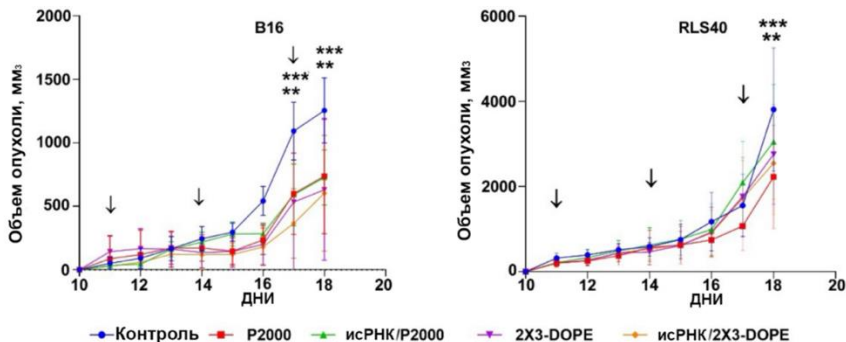


Рисунок 7. Противоопухолевая активность исРНК в комплексе с липосомами на моделях мышей с лимфосаркомой RLS40 и меланомой B16. Динамика роста опухоли (n = 5 мышей в группе). Стрелки указывают день, когда мышам сделаны инъекции. Статистически значимые различия между экспериментальными группами и контрольной группой обозначены звездочкой (* $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой, ** $p < 0.0005$ для мышей, получавших P2000 и исРНК/P2000, по сравнению с контрольной группой, *** $p < 0.0001$ для 2X3-DOPE и исРНК/2X3-DOPE по сравнению с контрольной группой); двусторонний анализ ANOVA, тест множественного сравнения Даннетта.

Анализ динамики роста опухоли показал, что для лимфосаркомы RLS40 эффект был незначительным (Рис. 7). Масса опухолей RLS не различалась во всех группах (Рис. 7). Напротив, на модели меланомы B16 трехкратные инъекции вызывали задержку роста опухоли и уменьшали ее объем под действием как исРНК/липосом, так и самих липосом. Наиболее выраженный эффект наблюдался после введения комплекса исРНК/2X3-DOPE, который вызывал уменьшение общего объема опухоли в 2 раза по сравнению с контролем

(Рис. 7). Опухоли у мышей, получивших исРНК/2Х3-DOPE, были статистически значимо меньше, чем в контрольной группе. В группе исРНК/Р2000 тенденция к снижению объема опухоли была, но различия незначимы (Рис. 7).

Гистологический анализ печени мышей с меланомой В16 показал высокую печеночную токсичность опухоли. Лечение исРНК/2Х3-DOPE и Р2000 уменьшало деструктивные изменения в печени в 2 раза. Введение исРНК/липосом или пустых липосом оказывало гепатопротекторное действие. Гистологический анализ селезенки показал, что инъекции исРНК/липосом или липосом вызывали иммунный ответ, увеличивая объемную плотность белой пульпы и лимфоидных фолликулов.

Хотя мыши СВА реагировали на исРНК/липосомы секретацией высоких уровней интерферонов I типа, этого было недостаточно для ограничения роста опухоли RLS40. Эффективность антипролиферативного воздействия исРНК на опухолевые клетки имеет первостепенное значение для торможения роста опухоли, что сопровождается снижением печеночной токсичности и иммуностимулирующим эффектом.

3. Влияние химических модификаций на интерферон-индуцирующее и антипролиферативное действие исРНК

Целью данной части исследований было определение влияния химических модификаций (2'-F, 2'-OMe, PS, холестерин, amino), расположенных в разных позициях исРНК, на сохранение ее способности активировать систему врожденного иммунитета.

Группам мышей СВА (n=3) вводили внутривенно модифицированную исРНК в комплексе с 2Х3-DOPE для выяснения влияния различных модификаций исРНК на уровни IFN- α . После шестичасового интервала были собраны образцы крови и получены сыворотки для анализа ELISA. Структурные изменения в 2'-положении рибозного фрагмента в основной цепи исРНК оказывали заметное влияние на синтез IFN- α в крови мышей при введении таких дуплексов. Немодифицированная исРНК N/N вызывала значительное повышение уровня IFN- α до 1627 ± 117 пг/мл. Семь модификаций 2'-F в F1/F1 вызывали выраженное снижение эффекта: было обнаружено лишь незначительное повышение IFN- α до 218 ± 16 пг/мл (Рис. 8). Напротив, снижение количества модификаций 2'-F до 4 в F2/F2 приводило к более мощной активации, вызывая значительный скачок уровня IFN- α до 2022 ± 41 пг/мл, что превосходило уровень, индуцированный немодифицированной исРНК. Включение 2'-OMe модификаций в тех же позициях (М/М) полностью лишало дуплекс интерферон-индуцирующей активности. Для изучения влияния терминальных модификаций были выбраны дуплексы с паттернами N и F2.

Введение холестерина на 5'-концы обеих цепей в составе немодифицированного дуплекса исРНК (Ch-N/Ch-N) полностью блокировало интерферон-индуцирующую активность. Введение холестерина в любую из цепей (дуплексы Ch-N/N и N/Ch-N) приводило примерно к двукратному снижению секретируемых уровней IFN- α по сравнению с уровнями, индуцированными немодифицированным N/N, как показано на Рисунке 8.

Последующее исследование показало, что после введения холестерина в структуру F2/F2 модификации 5'-конца обеих цепей (Ch-F2/Ch-F2) не смогли вызвать значительного увеличения уровней IFN- α (193 ± 11 пг/мл), тогда как модификация 3'-конца обеих цепей (F2-Ch/F2-Ch) приводила к менее интенсивному, чем в случае F2/F2, но значительному повышению уровня до 1009 ± 145 пг/мл. В случае исРНК, в которых группа холестерина была присоединена только к одной цепи, было продемонстрировано, что присоединение

Ch к 5'- или 3'-концу первой цепи (Ch-F2/F2 и F2-Ch/F2) вызывало умеренное повышение уровня ИФН-α до 563±98 и 654±189 пг/мл соответственно. Модификации холестерином второй цепи (F2/Ch-F2 и F2/F2-Ch) лучше переносятся и приводят к существенному увеличению секреции (приблизительно 1108±145 пг/мл для F2/Ch-F2 и 14080±423 пг/мл для F2/F2-Ch), как показано на Рисунке 8. Введение аминогруппы (-NH2) на 3'-концы обеих цепей дуплекса вместе с модификацией F2 (F2-NH2/F2-NH2) вызывало заметное повышение уровня IFN-α (1320±96 пг/мл) (Рис. 8).

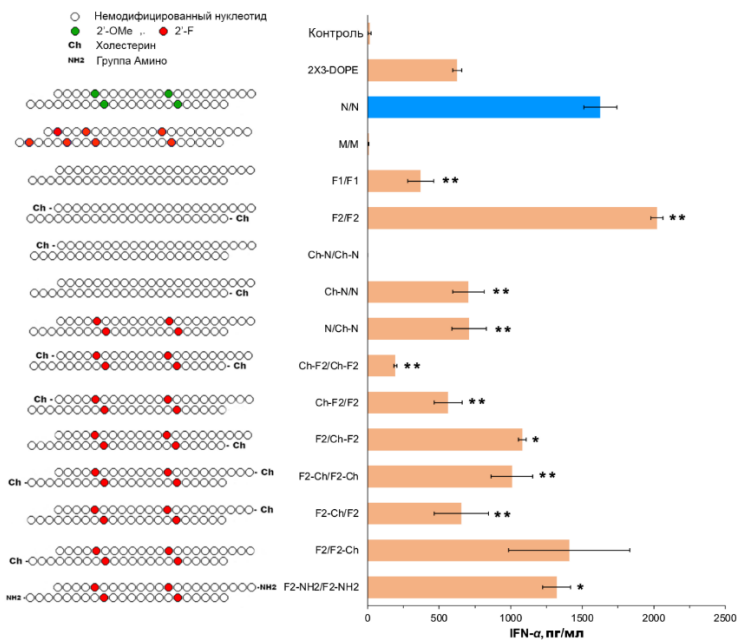


Рисунок 8. Влияние концевых и 2'- модификаций исРНК на продукцию ИФН-α у мышей СВА ($n = 3$) через 6 ч после внутривенного введения комплексов исРНК/липосомы. Уровни ИФН-α в сыворотке крови измеряли с помощью ELISA. Данные представляют собой среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, рассчитанное на основе трех независимых экспериментов, измеренных в двух повторях. Статистически значимые различия между экспериментальными группами и группой N/N отмечены звездочками (* $p < 0.005$; ** $p < 0.001$); обычный двусторонний дисперсионный анализ, тест множественных сравнений Даннета.

На следующем этапе исследования мы расширили набор дуплексов, чтобы изучить влияние PS связей в составе F2/F2 на интерферон-индуцирующую активность соответствующих исРНК. Введение двух PS групп на обоих концах обеих цепей (F2_S/F2_S) или только в одной цепи (F2_S/F2 и F2/F2_S), а также двух PS модификаций на 5'-концах обеих цепей (F2_S5/F2_S5) полностью блокировало синтез ИФН-α (Рис. 9). Модификация вблизи 3'-конца обеих цепей (F2_S3/F2_S3) вызывала умеренный интерфероновый ответ, около 707 пг/мл, что в два раза меньше, чем для F2/F2. Гетеродуплексы, содержащие модификацию PS только на 3'-конце второй цепи (F2/F2_S3), показывали более высокие уровни ИФН-α (993±92 пг/мл) по сравнению с аналогичными

модификациями в первой цепи (F2_S3/F2, 533±91 пг/мл). Введение PS в середине цепей в "зоне толерантности к нуклеотидным заменам" (F2_SM/F2_SM) приводило к небольшому повышению уровня IFN-α (432±87 пг/мл), но менее эффективно, чем варианты F2_S3. Добавление PS модификаций на 5'-концы исРНК вместе с F2 выявило интересные наблюдения (Рис. 9).

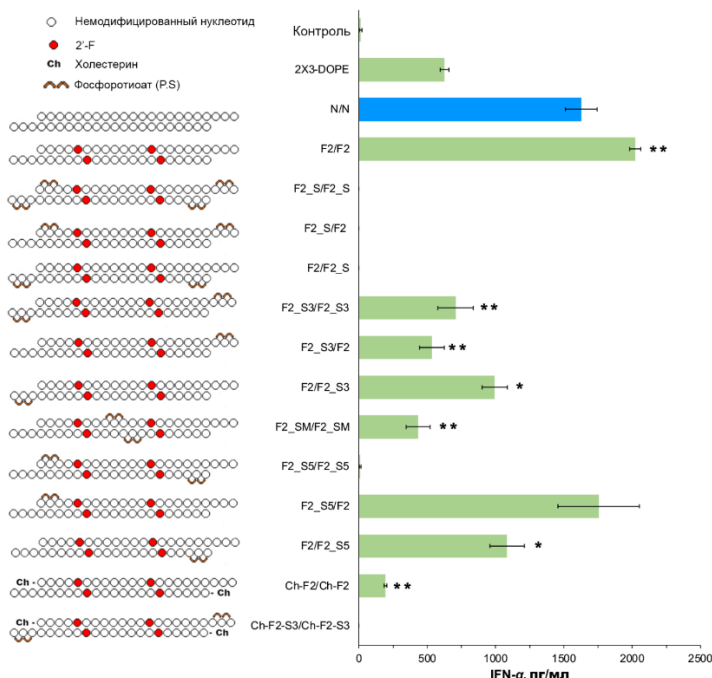


Рисунок 9. Влияние модификаций PS в исРНК на продукцию IFN-α у мышей СВА ($n = 3$) через 6 ч после внутривенного введения комплексов исРНК/липосомы. Уровни IFN-α в сыворотке измеряли с помощью ELISA. Данные представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение (SD), рассчитанное на основе трех независимых экспериментов, измеренных в двух экземплярах. Статистически значимые различия между экспериментальными группами и группой N/N отмечены звездочками (* $p < 0,005$; ** $p < 0,001$); обычный двусторонний дисперсионный анализ, тест множественных сравнений Даннета.

Хотя введение модификаций PS в обе цепи (F2_S5/F2_S5) блокировало синтез IFN-α, модификации отдельных цепей не предотвращали индукцию повышенных уровней IFN-α. Примечательно, что модификация только первой цепи (F2_S5/F2) вызывает значительное (до 1755±238 пг/мл) повышение уровня IFN-α. Аналогичным образом, 5'-концевые модификации PS во второй цепи (F2/F2_S5) обеспечивают более низкий, но все же значимый уровень IFN-α (1100 пг/мл). На основании этих результатов можно заключить, что модификация F2 сама по себе (F2/F2) или в сочетании с PS на 5'-конце первой цепи (F2_S5/F2) оказывается эффективной, играя ключевую роль в усилении интерферон-индуцирующей активности исРНК. Что касается концевых модификаций, интеграция

холестерина во вторую цепь наряду с присутствием F2 (F2/F2-Ch) или включение -NH₂ на 3'-концах обеих цепей демонстрирует потенциал для повышения уровня IFN- α .

Для изучения влияния химических модификаций на антипролиферативную эффективность исРНК клетки меланомы B16 мышей высевали с плотностью 4.5×10^3 клеток на лунку 96-луночного планшета. ИсРНК трансфицировали в комплексе с 2X3-DOPE в трех концентрациях (25, 50 и 100 нМ). Культуры поддерживали в течение 5 дней, ежедневно контролируя для избежания перероста. Для оценки количества живых клеток использовался анализ ССК-8, а значения IC₅₀ использовались для отражения влияния химических модификаций на скорость роста клеток.

Немодифицированная исРНК (N/N), как было установлено ранее, вызывала ингибирование роста и пролиферации клеток с оптимальной эффективностью, наблюдаемой при концентрации 100 нМ (IC₅₀ 68 нМ). 2'-F-содержащие дуплексы F1/F1 (7 модификаций) и F2/F2 (4 модификации) не оказывали выраженного влияния на пролиферацию клеток, даже при максимальной использованной концентрации и не было достигнуто 50% ингибирования роста клеток (IC₅₀ > 100). В противоположность влиянию на интерферон-индуцирующую активность, 2'-ОМе-содержащий дуплекс (М/М) вызывал заметное ингибирование с эффективностью, сравнимой с эффективностью немодифицированного дуплекса (IC₅₀ 67.2 нМ) (Рис. 10).

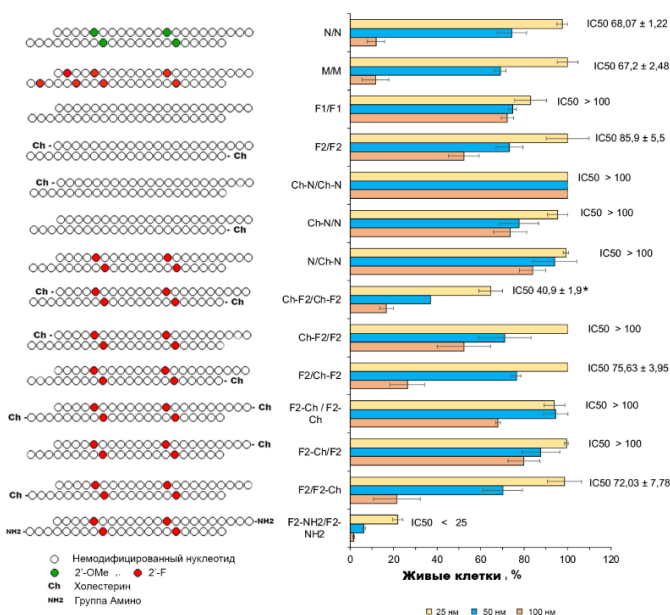


Рисунок 10. Влияние концевых и 2'-рибозных модификаций исРНК на антипролиферативную активность исРНК в клетках меланомы B16. Относительную жизнеспособность клеток оценивали с помощью анализа ССК-8. Данные представлены как средние значения $\pm$ стандартные отклонения (SD), полученные в результате независимых экспериментов. Статистически значимые различия между значениями IC₅₀ экспериментальной группы и группы N/N отмечены звездочками (*p < 0,05).

Статистический анализ проводился с использованием обычного двухфакторного дисперсионного анализа с последующим тестом множественных сравнений Даннетта.

Введение холестерина на 5'-концы дуплексов N/N приводило к существенному ингибированию, особенно если холестерин присоединялся к обеим цепям. Модификация холестерином 5'-конца совершенно по-другому влияет на дуплексы с паттерном F2: сохранение активности для Ch-F2/F2, умеренная активация для F2/Ch-F2 и значительная активация антипролиферативного эффекта для дуплекса с холестерином. на обеих цепях Ch-F2/Ch-F2 (IC₅₀ 40.9 нМ), что превышает активность немодифицированного и 2'-ОМе-модифицированного дуплексов. Модификация холестерином 3'-концов обеих цепей с паттерном F2 ингибирует его антипролиферативную активность, которая снижается в ряду F2/F2-Ch (IC₅₀ 72 нМ)> F2-Ch/F2-Ch (IC₅₀>100 нМ)> F2- Ch/F2 (IC₅₀>100 нМ). Наиболее эффективной модификацией оказалось введение аминогруппы на 3'-концах обеих цепей в сочетании с паттерном F2 (F2-NH₂/F2-NH₂), вызывающее сильное ингибирование пролиферации даже при низких концентрациях (IC₅₀ <25 нМ) (Рис. 10).

Включение 2 PS групп на обоих концах обеих цепей (F2_S/F2_S) вызывало резкое ингибирование антипролиферативной активности. И наоборот, введение этой модификации только в первую цепь (F2_S/F2) приводило к умеренному снижению активности (IC₅₀ 75.3 нМ), более выраженный антипролиферативный эффект наблюдался при введении модификаций PS во вторую цепь (F2/F2_S, IC₅₀ 61.6 нМ) (Рис. 11). Введение PS на 3'-концах дуплекса, как в обе цепи (F2_S3/F2_S3) так и на каждой цепи отдельно (F2_S3/F2, F2/F2_S3), полностью блокировало антипролиферативное действие исРНК. И наоборот, введение той же модификации на 5'-конце приводило к повышению активности, особенно при модификации обеих цепей (F2_S5/F2_S5), такой дуплекс вызывал значительное ингибирование пролиферации даже при самой низкой концентрации со значением IC₅₀ ниже 25 нМ. Когда модификацию применяли только к первой цепи (F2_S5/F2), ингибирование наблюдалось при самой высокой концентрации (IC₅₀ 71.5 нМ); более выраженный эффект был отмечен при введении PS по 5'-концу второй цепи (F2/F2_S5, IC₅₀ 61.9 нМ), как показано на Рисунке 11. Аналогично, введение 2 PS в среднюю часть обеих цепей давало значение IC₅₀ 72.7 нМ, что сопоставимо с немодифицированным дуплексом. Комбинация паттерна F2 с 2 PS на 3'-концах в дополнение к 5'-холестерину на обоих концах не вызывала значительного ингибирования роста клеток в используемых концентрациях и увеличивала значение IC₅₀ с 40.9 до 95.8 нМ (Рис. 11). Таким образом, введение модификации 2'-F, в отличие от 2'-ОМе, не привело к усилению ее антипролиферативной эффективности. Однако заметное улучшение функциональности наблюдалось при его сочетании с концевыми модификациями, такими как включение холестеринового фрагмента на 5'-концах или аминогруппы на 3'-концах обеих цепей. Более того, включение PS на 5'-конце заметно усиливало антипролиферативную активность. Примечательно, что введение химических модификаций исключительно во вторую цепь приводило к более выраженному антипролиферативному эффекту по сравнению с модификациями первой цепи.

Важным результатом настоящего исследования является разделение между интерферон-индуцирующей и антипролиферативной активностью, проявляемой химически модифицированной исРНК, что отражает различное поведение *in vivo* и *in vitro*. Полученные данные позволяют предположить, что эти функции осуществляются независимо за счет активации разных сигнальных путей после узнавания исРНК разными PRR, поэтому чувствительность разных участков дуплекса к модификациям для этих активностей различна

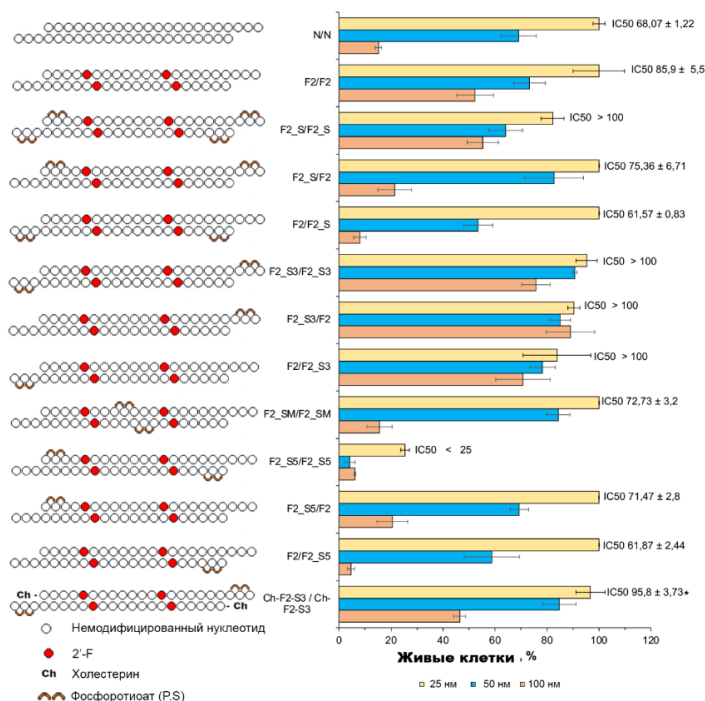


Рисунок 11. Влияние модификаций PS в исРНК на антипролиферативную активность исРНК в клетках меланомы B16. Относительную жизнеспособность клеток оценивали с помощью анализа ССК-8. Данные представлены как средние значения ± стандартные отклонения (SD), полученные в результате независимых экспериментов. Статистически значимые различия между значениями IC50 экспериментальной группы и группы N/N отмечены звездочками (* $p < 0,05$). Статистический анализ проводился с использованием обычного двухфакторного дисперсионного анализа с последующим тестом множественных сравнений Даннетта.

Выявление влияния различных химических модификаций и их локализации на иммунные реакции, вызываемые РНК-терапией, приобретает первостепенное значение. Здесь мы показали, что химические модификации в составе исРНК по-разному влияют на ее отдельные функции, такие как интерферон-индуцирующий и антипролиферативный эффекты. Переносимость модификаций зависит не только от типа модификации, но также от ее местоположения и окружающего контекста модификаций. Проведенное исследование позволило выявить лидерные паттерны модификаций, усиливающих свойства исРНК: F2/F2 и F2_S/F2 для интерферон-индуцирующей активности, а также F2_S5/F2_S5, F2-NH2/F2-NH2 и Ch-F2. /Ch-F2 для антипролиферативного действия. Эти модификации позволяют улучшить фармакокинетические и фармакодинамические свойства, а также повысить специфичность действия исРНК для получения желаемого эффекта.

Заключение

Использование иммуностимулирующих нуклеиновых кислот (ИНК) становится весьма многообещающей стратегией в области иммунотерапии не только для борьбы с опухолями, но также для борьбы с вирусными инфекциями и иммуносупрессией. Их способность модулировать иммунные ответы и активировать врожденный иммунитет зависит от взаимодействия с внутриклеточными рецепторами, тем самым запуская каскады, приводящие к синтезу интерферонов и цитокинов. ИНА представляют собой превосходную альтернативу обычным фармацевтическим препаратам интерферонов, которым свойственны такие проблемы, как пирогенность, вариабельная эффективность и необходимость частого введения высоких доз. Более того, масштабируемость производства ИНК, примером которых является исРНК, подчеркивает ее потенциал для применения. Универсальность липосомальных носителей для доставки ИНК может быть использована для обеспечения транспорта других терапевтических нуклеиновых кислот и, возможно, других терапевтических агентов, тем самым расширяя возможности их потенциального использования.

В рамках данного исследования мы сравнили влияние исРНК, используемой в профилактическом или терапевтическом режиме, на развитие фиброза у мышей, индуцированного BLM- и LPS, и показали, что исРНК можно использовать при патологических состояниях, сопровождающихся развитием воспаления и риском формирования фиброза без неблагоприятных побочных эффектов. Профилактический режим применения исРНК полезен для предотвращения развития фиброза легких.

В результате исследования влияния различных систем доставки на цитокининдуцирующую, антипролиферативную, и противоопухолевую активность исРНК обнаружено, что значительная активация и продукция MCP-1 и INF- α , β и γ у мышей СВА происходит под действием комплексов исРНК с липосомами, содержащими липоконъюгаты с длинными цепями ПЭГ, при этом активация MCP-1 и INF- γ , но не INF- α или β , наблюдались под действием липоплексов исРНК, содержащих липоконъюгаты с короткими цепями ПЭГ. Комплексы исРНК с непегелированными липосомами оказывали выраженное антипролиферативное действие на клетки меланомы B16 *in vitro*, а также противоопухолевое и гепатопротекторное действие *in vivo*, тогда как комплексы, содержащие липоконъюгаты с длинноцепочечными ПЭГ, были неактивны. Обнаружено, что противоопухолевая активность исРНК коррелировала с эффективностью ее накопления в клетках и не зависела от активации продукции цитокинов и интерферона. Таким образом, структура системы доставки играет жизненно важную роль в определении ответа на исРНК и позволяет выбрать систему доставки в зависимости от желаемого эффекта.

Полученные данные показывают, что химические модификации в составе исРНК по-разному влияют на ее отдельные функции, такие как интерферон-индуцирующий и антипролиферативный эффекты. Эффект модификаций зависит не только от типа модификации, но также от ее местоположения и окружающего контекста модификаций. Проведенное исследование позволило выявить лидерные паттерны модификаций, усиливающих свойства исРНК. Эти модификации могут позволить улучшить

фармакокинетические и фармакодинамические свойства, а также повысить специфичность действия исРНК для получения желаемого эффекта.

Обсуждаемые здесь достижения позиционируют исРНК и систему ее доставки как кандидатов для перехода к доклиническим испытаниям в качестве терапевтического средства для лечения вирусных и опухолевых заболеваний. Тем не менее, дальнейшие исследования по-прежнему необходимы для оценки их эффективности в сочетании с существующими лекарствами и методами лечения, чтобы выяснить, может ли исРНК функционировать как самостоятельная терапия или более эффективно дополнит другие методы лечения.

Выводы

1. Введение исРНК в комплексе с липидным средством доставки 2X3-DOPE мышам перед индукцией фиброза легких с помощью липополисахарида (профилактическая схема) снижает выраженность воспаления и фибротических изменений в ткани легкого. Двух-кратное введение аналогичного препарата после индукции фиброза липополисахаридом или блеомицином (терапевтическая схема) не усиливает развитие патологии, что указывает на безопасность применения данного препарата в профилактических и лечебных целях.
2. Состав липидных средств доставки на основе 2X3-DOPE по-разному влияет на эффективность интерферон-индуцирующего и антипролиферативного действия исРНК: увеличение длины ПЭГ в составе липоконъюгатов в липосомах значительно повышает эффективность индукции IFN- α под действием исРНК; базовая система доставки 2X3-DOPE, не содержащая дополнительных липоконъюгатов, наиболее эффективно потенцирует антипролиферативное действие исРНК на клетки меланомы B16 и противоопухолевое действие на образованные этими клетками опухоли у мышей, что положительно коррелирует с эффективностью накопления исРНК в клетках и ее способностью активировать экспрессию маркера *Pkr* и не зависит от активации продукции цитокинов и интерферона.
3. Влияние химических модификаций, таких как 2'-фтор-, 2'-О-метил, фосфотиоат, холестерин, концевой амин в составе исРНК, зависящее от типа модификации, места расположения в составе цепи и от выбранной цепи, по-разному изменяет интерферон-индуцирующее и антипролиферативное действие исРНК. Идентифицированы соединения-лидеры, обладающие улучшенными интерферон-индуцирующими (F2/F2 и F2_S/F2) и антипролиферативными (F2_S5/F2_S5, F2-NH2/F2-NH2 и Ch-F2/Ch-F2) свойствами.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. Bishani A., Chernolovskaya E.L. Activation of Innate Immunity by Therapeutic Nucleic Acids: 24 // International Journal of Molecular Sciences. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021. Vol. 22, № 24. P. 13360.
2. Bishani A. et al. Influence of the Composition of Cationic Liposomes on the Performance of Cargo Immunostimulatory RNA // Pharmaceutics. 2023. Vol. 15, № 9. P. 2184.
3. А. В. Сенькова, И. А. Савин, Е. Л. Черноловская, А. С. Давыдова, М. И. Мещанинова, А. Бишани, М. А. Воробьева, М. А. Зенкова. Липополисахарид-индуцированное острое повреждение легких: анализ особенностей развития и возможность подавлен подавления аптамером к TNF- α . // ACTA NATURAE. 2024, ТОМ 16, № 2 (61), С. 22-32.
4. Bishani A. et al. The Impact of Chemical Modifications on the Interferon-Inducing and Antiproliferative Activity of Short Double-Stranded Immunostimulating RNA: 13 // Molecules. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2024. Vol. 29, № 13. P. 3225.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФ №19-74-30011