

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ**

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

На правах рукописи

Бишани Али

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

1.5.3 – Молекулярная биология

**Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель
д.б.н., Черноловская Е.Л.**

Новосибирск – 2024

Оглавление

Оглавление	2
Список сокращений	4
Введение	5
Актуальность работы	5
Цель и задачи исследования.....	6
Глава 1. Обзор литературы	9
1.1 Терапевтические нуклеиновые кислоты.....	9
1.2 Распознавание нуклеиновых кислот и иммуностимуляция.....	10
1.2.1 Лиганды и рецепторы	10
1.2.2 Зависимая от последовательности иммуностимуляция	14
1.2.3 Независимая от последовательности иммуностимуляция	18
1.2.4 Сигнальные пути	20
1.3 Возможные сферы применения иммуностимулирующих нуклеиновых кислот	23
1.3.1 Иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты для лечения рака	23
1.3.2 Вакцины и адъюванты на основе нуклеиновых кислот	25
1.2 Системы доставки терапевтических РНК	27
1.2.1 Вирусные векторы	29
1.2.2 Невирусные векторы доставки для нуклеиновых кислот	30
1.3 Химические модификации терапевтических нуклеиновых кислот	38
Глава 2. Экспериментальная часть.....	42
2.1. Материалы	42
2.1.1. Реактивы и препараты.....	42
2.1.2. Оборудование	42
2.1.3. Олигонуклеотиды	43
2.1.4. Липосомы	44
2.1.5. Лабораторные животные	45
2.1.6. Клеточные культуры	45
2.2. Методы	46
2.2.1. Приготовление комплексов исРНК/липосомы	46
2.2.2. Индуцирование фиброза лёгких с помощью БЛМ и ЛПС у мышей	46
2.2.3. Измерения массы тела.....	47
2.2.4. Культура клеток РВМС и трансфекция исРНК	47
2.2.5. Анализ уровней цитокинов в БАЛЖ мышей и культуральной среде	47
2.2.6. Анализ уровней IFN-α в крови мышей	48
2.2.7. Профилирование цитокинов.....	48
2.2.8. Противоопухолевое действие исРНК in vivo	48
2.2.9. Гистология.....	49
2.2.10. Антипролиферативная активность in vitro	49
2.2.11. Накопление исРНК в клетках	50
2.2.12. ОТ-qПЦР	50
2.2.12. Статистический анализ	50
Главы 3. Результаты и обсуждение.....	52
3.1. Влияние исРНК на прогрессирование фиброза индуцированного блеомицином или LPS на мышинных моделях	52

3.1.1 Эффект исРНК на развитие пульмонального фиброза, индуцированного BLM и LPS, у мышей	54
3.2. Влияние состава катионных липосом на эффективность доставки ими в клетки иммуностимулирующей РНК	64
3.2.1 Активация продукции цитокинов исРНК/липосомами в РВМС человека	67
3.2.2. Активация продукции цитокинов, индуцированная исРНК/липосомами у мышей	69
3.2.3. Антипролиферативная активность комплексов исРНК/липосомы <i>in vitro</i>	73
3.2.4. Противоопухолевая активность комплексов исРНК/липосомы на мышечных моделях	77
3.3. Влияние химических модификаций на интерферон-индуцирующее и антипролиферативное действие исРНК	86
3.3.1. Дуплексы исРНК и дизайн эксперимента	87
3.3.2. Оценка влияния химических модификаций в составе исРНК <i>in vivo</i>	89
3.3.3. Оценка влияния химических модификаций на антипролиферативную активность исРНК <i>in vitro</i>	93
Заключение	102
Выводы	104
Список литературы	105

Список сокращений

исРНК	иммуностимулирующая РНК
siРНК	малая интерферирующая РНК
АСО	антисмысловой олигонуклеотид
кДНК	комплементарная ДНК
пДНК	плазмидная ДНК
ТНК	терапевтические нуклеиновые кислоты
LPS	липополисахарид
BLM	блеомицин
PBS	фосфатно-солевой буфер
BFS	фетальная бычья сыворотка
PEG	полиэтиленгликоль
IFNs	интерфероны
IL-6	интерлейкин 6
TNF- α	фактор некроза опухоли альфа
MCP-1	белок-1 хемоаттрактант моноцитов
БАЛЖ	бронхоальвеолярная лаважная жидкость
PBMCs	моноклеарные клетки периферической крови
ЛНЧ	липонаночастицы
PRRs	рецепторы опознавания паттерна
PAMPs	молекулярные паттерны, ассоциированные с патогеном
DAMPs	молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением
IRFs	интерферон-регулирующие факторы
TLRs	Толл-подобные рецепторы
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene I receptor
MDA5	белок 5, ассоциированный с дифференцировкой меланомы
NF- κ B	ядерный фактор κ B
IKK β	ингибитор бета-субъединицы киназы ядерного фактора каппа- β
MyD88	белок первичного ответа миелоидной дифференцировки 88
PS	фосфотиоат
Ch-	остаток холестерина
2'-OMe	2'-О-метил
2'F	2'-фтор

Введение

Актуальность работы

Терапевтические нуклеиновые кислоты (ТНК) - это различные молекулы ДНК или РНК, природные и химически модифицированные, способные не только регулировать экспрессию целевых генов или направлять синтез необходимого белка, но и мобилизовать иммунную систему организма для противовирусной и противоопухолевой защиты [1]. ТНК распознаются различными рецепторами в клетке, известными как паттерн-распознающие рецепторы (PRR) [2]. Возможность нуклеиновых кислот активировать эти рецепторы зависит от их природы, длины, структуры, местоположения и последовательности [2,3]. Распознавание такими рецепторами приводит к активации многочисленных сигнальных путей, которые могут индуцировать апоптоз, блокировать пролиферацию и активировать выделение интерферонов и/или противовоспалительных цитокинов в зависимости от природы лиганда, активированного рецептора и типа клетки [2,4]. Иммуностимулирующие ТНК могут воздействовать на опухоль непосредственно, ингибируя пролиферацию и индуцируя дифференцировку или апоптоз, или косвенно, активируя иммунную систему для устранения опухоли.

Действие ТНК в значительной степени зависит от эффективности их доставки к целевым клеткам. Для этой цели используют присоединение к ТНК различных транспортных лигандов [5] или включение их в состав комплексов с катионными липидами, липосомами, полимерами или наночастицами [6]. Многочисленные исследования были посвящены оптимизации липидных формул для доставки антисенс-олигонуклеотидов, siРНК, мРНК и терапевтических вакцин при разных режимах введения [7]. Однако доставка иммуностимулирующих ТНК и влияние систем доставки на эффективность как иммуностимулирующего, так и антипролиферативного и противоопухолевого действия пока не были систематически изучены.

РНК по своей природе нестабильна из-за эндо/экзорибонуклеаз, присутствующих в клетках и жидкостях организма, таких как сыворотка крови [8], которые могут расщеплять молекулу РНК [9]. Чтобы защитить РНК, активно используют системы доставки, способные защитить переносимую ТНК от деградации, такие как липидные наночастицы [10]. Другой подход к повышению устойчивости РНК к нуклеазам основан на химической модификации ее рибозо-фосфатного остова [11]. Этот подход был успешно применен для siРНК и используется в препаратах на основе РНК, одобренных для клинического применения [12]. Его основной задачей было повышение устойчивости к ферментативной деградации при сохранении биологической активности [13]. К сожалению, о влиянии химических

модификаций на свойства иммуностимулирующих РНК известно мало: большинство исследований направлено на блокирование иммуностимулирующих свойств терапевтических РНК, таких как siРНК и мРНК-вакцины [14].

Ранее ЛБНК ИХБФМ СО РАН была обнаружена короткая дцРНК длиной 19 п.н. с 3'-три-нуклеотидными выступами (позже названная иммуностимулирующая РНК или исРНК), которая продемонстрировала сильное антипролиферативное действие против опухолевых клеток и иммуностимулирующую активность за счет активации продукции цитокинов (интерферонов I типа) [15]. Поскольку эта исРНК не имеет значительного сходства с мРНК человека или мыши и на один нуклеотид длиннее, чем канонические siРНК, она не может изменить характер экспрессии генов посредством РНК-интерференции. Проведённые исследования *in vitro* и *in vivo* продемонстрировали иммуностимулирующие, интерферон-индуцирующие, антипролиферативные, противоопухолевые и противовирусные свойства этой исРНК [16].

Выяснение влияния исРНК на патологические процессы, сопровождающиеся активацией системы врожденного иммунитета, включая острое и хроническое воспаление, приводящее к развитию такого грозного осложнения как фиброз [17], является необходимым этапом определения профиля безопасности препарата для потенциального клинического применения, что на данный момент для иммуностимулирующих РНК является критическим пробелом в современной литературе. Решение этих проблем представляет собой решающий шаг в продвижении использования иммуностимулирующих нуклеиновых кислот.

Цель и задачи исследования

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 моноклеаров 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 при наличии 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 инновационность работы. В работе изучено, как исРНК взаимодействуют с патологическими состояниями 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 состав исРНК, не только могут помочь улучшить эффективность и специфичность действия исРНК, но и блокировать нецелевую иммунную активацию под действием препаратов на основе siРНК и мРНК вакцин.

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 IFN- α .

3. Эффективность антипролиферативного и противоопухолевого действия исРНК в комплексе с липосомами на меланому B16 коррелирует с эффективностью трансфекции исРНК в опухолевые клетки и не зависит от способности исРНК индуцировать IFN- α .

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.

Апробация работы и публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 печатные работы. Результаты работ представлены на 5 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).

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 проведены 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).

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

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Терапевтические нуклеиновые кислоты

Иммунотерапия — это терапевтический подход к лечению заболеваний путем воздействия на иммунную систему организма для усиления, либо подавления ее функций. За последние десятилетия иммунотерапия привлекла внимание исследователей [18,19], при этом особый интерес представляют разработки в области лечения рака и инфекционных заболеваний [3–5]. Ряд иммунотерапевтических подходов к лечению рака, включая специфическую [23] и неспецифическую [24] иммунотерапию, были испытаны в клинических испытаниях и некоторые из препаратов уже введены в клиническую практику [25]. Основные иммунотерапевтические подходы включают использование моноклональных антител, ингибиторов иммунных контрольных точек и цитокиновую терапию [26–28]. Препараты на основе моноклональных антител успешно зарекомендовали себя в лечении опухолевых заболеваний: в 2021 году, спустя 35 лет после того, как FDA одобрило первое моноклональное антитело, был одобрен 100-й продукт на основе моноклональных антител [29]. При лечении заболеваний, молекулярные мишени которых неизвестны, активация неспецифического иммунитета может обеспечить противоопухолевое, антиметастатическое и противовирусное действие. Тем не менее, каждый из этих методов по-прежнему имеет свои побочные эффекты, которые затрудняют успешное прохождение клинических испытаний и получение разрешения для использования в клинической практике. Допустимые побочные эффекты одобренных препаратов часто усложняют лечение и требуют сопутствующей медикаментозной поддержки и последующей реабилитации [30,31]. Эти проблемы, возникающие при использовании иммунотерапии, привлекли внимание исследователей к изучению активаторов иммунитета с природными механизмами действия, в частности, к иммуностимулирующим нуклеиновым кислотам.

Имуностимулирующие нуклеиновые кислоты используются в иммунотерапии, они индуцируют синтез и выделение цитокинов и интерферонов [16]. Появление экзогенных нуклеиновых кислот в клетке или на ее поверхности обычно являются признаком вторжения вирусов и бактерий и инициируют врожденный иммунный ответ, который поможет клетке устранить угрозу и предупредит об опасности соседние клетки [32]. Это привело к идее использования синтетических нуклеиновых кислот для манипулирования иммунным ответом: поли(I:C) - аналог дцРНК и CpG-олигонуклеотиды широко используются в течение последних десятилетий для изучения врожденного ответа *in vivo* и *in vitro* [33,34]. В ходе

экспериментов с различными короткими двухцепочечными РНК-последовательностями в качестве индукторов РНК интерференции, было замечено, что различные последовательности вызывают иммунный ответ в разной степени [35], что также помогло исследователям отобрать последовательности, вызывающие самый сильный ответ, и использовать их для проверки их иммуномодулирующей активности [15].

Свободные нуклеиновые кислоты не могут эффективно проникать в клетки сами по себе и нестабильны внутри клетки из-за деградации нуклеазами [36], поэтому для этих приложений требуются использования средств доставки. Для этой цели были разработаны различные типы транспортных систем, такие как наночастицы и катионные липосомы [37–39], однако они пока не идеальны и такие проблемы как токсичность липоплексов [40] и сложность нахождения специфических биомаркеров для повышения специфичности системы доставки еще требуют своего решения [41]. Вопросы доставки терапевтических нуклеиновых кислот к целевым клеткам рассмотрены в многочисленных специализированных обзорах [42–45].

Иммунотерапия (включая иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты) является двуручным мечом и имеет свои преимущества и недостатки. Основное преимущество заключается в том, что иммунотерапия эффективно действует в случае некоторых злокачественных опухолей, устойчивых к химиотерапии и радиотерапии, расширяя таким образом выбор методов лечения и позволяя выбрать наиболее эффективную стратегию лечения для конкретного заболевания [46]. Более того, ее можно использовать совместно с традиционными химиотерапевтическими методами лечения опухолевых заболеваний для увеличения эффективности терапии [47]. Можно ожидать снижения вероятности рецидива опухолевого заболевания после иммунотерапии из-за формирования клеток памяти, которые осуществляют функцию иммунного надзора, распознают опухолевые клетки, если они начинают снова расти, и уничтожают их [48]. Однако эти преимущества сопровождаются риском, связанным с чрезмерной активацией иммунной системы, которая может атаковать другие органы или даже вызвать аутоиммунные заболевания [49]. Следует также помнить, что эффективность иммунотерапии сильно зависит от характеристик и состояния иммунной системы конкретного пациента и может снизиться в случае врожденных, приобретенных или вызванных заболеванием состояний иммунодефицита.

1.2 Распознавание нуклеиновых кислот и иммуностимуляция

1.2.1 Лиганды и рецепторы

Клетки млекопитающих обнаруживают наличие инфекционных агентов и их локализацию с помощью паттерн-распознающих рецепторов (PRRs) [50,51]. Эти рецепторы

являются лиганд-специфическими сенсорами и способны распознавать как паттерны, ассоциированные с патогенами (PAMPs) [52], так и паттерны, ассоциированные с повреждениями (DAMPs) [53,54]; они координируют ранние защитные реакции организма на инфекцию или повреждение. Экзогенные нуклеиновые кислоты представляют собой один из классов PAMPs, и их молекулярные особенности, такие как длина, двойная или одноцепочечная структура, присутствие модифицированных нуклеотидов и мотивы последовательности, играют ключевую роль в иммунном распознавании [32,55–57]. Эти свойства, их необычные комбинации или аномальная локализация нуклеиновых кислот позволяют различать экзогенные нуклеиновые кислоты от эндогенных [57].

DAMPs это эндогенные сигналы опасности, высвобождаемые поврежденными или умирающими клетками, а так же при клеточном стрессе во внеклеточное или внутриклеточное пространство, способствующие воспалению для очистки ткани от повреждённых структур и органелл для ее последующего восстановления [58,59] Наиболее изученными DAMPs являются моно- и полисахариды (гликаны) [60], белок группы с высокой подвижностью 1 (HMGB1) [61], нуклеиновые кислоты [62] и свободный АТФ [63].

Существует несколько типов PRR, обнаруживающих нуклеиновые кислоты у млекопитающих, которые расположены в различных клеточных отделах: на плазматической мембране, в эндосомах и в цитоплазме [64], что позволяет сенсорам обнаруживать как PAMPs, так и DAMPs нуклеиновые кислоты. Первый тип представляет собой эндосомальное подсемейство TLR (TLR3, 7, 8 и 9) [65]. Другой тип включает цитозольные РНК-связывающие белки, такие как Индуцируемый ретиноевой кислотой ген I (Retinoic acid-inducible gene I, RIG-I), Белок, ассоциированный с дифференцировкой меланомы 5 (Melanoma Differentiation-Associated protein 5, MDA5) и Белок Лаборатории генетики и физиологии 2 (Laboratory of Genetics and Physiology Protein 2, LGP2) [66]. Еще один тип недавно описанных сенсоров включает цитоплазматические ДНК-сенсоры, такие как ДНК-зависимый активатор факторов, отвечающих на интерферон (DNA-dependent activator of IRFs, DAI) [67].

Расположение в эндосомах и лизосомах определяет специализацию рецепторов TLR, предназначенных для распознавания экзогенных нуклеиновых кислот, которые проходят эндоцитоз после уничтожения возбудителя инфекции или лизиса инфицированной клетки [34]. Каждый из эндосомальных TLR способен распознавать определенный тип нуклеиновых кислот: двунитевая РНК активирует TLR3 [68], чужеродная одноцепочечная РНК активирует TLR7 и TLR8 [69], а CpG-ДНК - TLR9 [70]. TLR3 экспрессируется в миелоидных дендритных клетках [71] и, следовательно, объединяет врожденную и

адаптивную иммунные системы, тогда как другие эндосомальные TLR экспрессируются в широком спектре иммунных клеток, включая пДс [72], макрофаги, моноциты и лимфоцит [73].

Длинная двуцепочечная РНК распознается TLR3 из-за наличия двух пространственно-удаленных сиквенс-неспецифических сайтов связывания [74, р. 3]. Исследования *in vitro* показали, что минимальная длина дцРНК, необходимая для активации TLR3, составляет около 40 пар нуклеотидов [75].

TLR7 и TLR8 являются гомологичными рецепторами для оцРНК [76,77]. Оба рецептора имеют два связывающих участка в своем домене, богатом лейцином, однако специфичность участков в составе рецепторов различается: первый участок связывает нуклеозиды с предпочтением гуанозина и уридина в составе TLR7 и TLR8, соответственно [78,79]. Второй участок связывания в составе TLR8 взаимодействует с динуклеотидом UG, а в составе TLR7 предпочитает минимальные тримеры с U, находящимся во второй позиции [80].

TLR9 — это сенсор ДНК, который связывается с молекулами содержащими неметилированные мотивы CpG (цитозин-фосфат-гуанин-дезоксинуклеотид) [81]. Он экспрессируется в клетках врожденного иммунитета, включая макрофаги и ДК [57]. Когда CpG-DNA связывается со внеклеточным доменом TLR9, они образуют симметричный димерный комплекс, в котором CpG-DNA взаимодействует как с одним, так и с другим протомером в димере TLR9 [82, р. 9]. Дальнейшее изучение доказало, что TLR9 содержит сайт связывания, который связывается с цитозином во второй позиции ДНК, начиная с 5'-конца, способствуя активации TLR9 [83].

Цитозольные РНК-связывающие белки или Рецепторы типа RIG-I (RIG-I-like receptors, RLR) включают в себя три члена: RIG-I, MDA5 и LGP2. RLR принадлежат к суперсемейству геликаз SF2, они в основном находятся в цитоплазме, но некоторое количество RIG-I располагается в ядре [84]. Как RIG-I, так и MDA5 являются сигнальными белками, в то время как LGP2 играет регуляторную роль [85]. Эти различные функции обусловлены структурными отличиями. RIG-I и MDA5 имеют схожую структуру с геликазным доменом в средней части и карбокситерминальным доменом (CTD) [86]. Оба этих домена способны обнаруживать и связывать РНК, более того, они оба обладают доменами активации и рекрутирования каспаз (CARD), которые участвуют в передаче сигнала и активируют экспрессию генов IFN I типа [87]. LGP2 не имеет CARD и инициирует передачу сигнала, регулируя активность RIG-I и MDA5 [88]. Регуляторный карбокситерминальный домен LGP2 связывается с белком связывания двуцепочечной РНК

РАСТ и этот комплекс ингибирует ответ, зависящий от RIG-I, и активирует ответ, зависящий от MDA5. Это взаимодействие позволяет координировать врожденный иммунный ответ клеточной системе РНК интерференции [89].

Присутствие функциональных RIG-I и MDA5 необходимо для иммунного ответа против вирусных инфекций [90–92]. Из-за их предпочтения к связыванию с РНК было показано, что RIG-I и MDA5 могут распознавать разные сегменты одной и той же вирусной геномной РНК [93]. Хотя эти белки обладают структурным сходством и действуют через общие сигнальные пути, они активируются различными видами РНК. RIG-I предпочитает связываться с короткой двунитевой РНК, с три-фосфатом на 5'-конце [94,95]. В других исследованиях предполагалось, что двунитевая РНК с монофосфатом на 5'-конце не способна активировать RIG-I, и для успешного связывания и активации RIG-I требуется по крайней мере ди-фосфат на 5'-конце двуцепочечной РНК [96]. Более того, RIG-I может различать между дцРНК с ди-фосфатом и дцРНК с три-фосфатом на 5'-концах [97]. Эти энергетические различия в связывании с моно-, ди- или трифосфатом позволяют RIG-I различать между РНК хозяина и вирусной РНК [86,98]. Напротив, MDA5 активируется длинной двуцепочечной РНК, и это было подтверждено активацией MDA5 поли(I:C) (синтетическим имитатором длинной двунитевой РНК) [99]. MDA5 связывается с двунитевой РНК через фосфодиэстерный остов, что делает это связывание неспецифичным к последовательности; при взаимодействии с дцРНК MDA5 образует кольцевую структуру вокруг нее [100]. Различные сенсоры нуклеиновых кислот активируют различные сигнальные пути при обнаружении чужеродных нуклеиновых кислот, таким образом, нацеливание на конкретные рецепторы играет решающую роль в определении иммунного ответа при разработке иммуномодулирующих препаратов с использованием терапевтических нуклеиновых кислот.

В зависимости от того какой рецептор активируется под действием нуклеиновой кислоты или другого специфического лиганда, вызванный ими иммунный ответ, приведет к индукции, преимущественно, противовоспалительных или противовоспалительных цитокинов [16,101]. В случае разработки лекарств на основе ииммуностимулирующих РНК, нацеливание на TLR 3/7/8 и RLR, такие как MDA5 и RIG-I, чтобы индуцировать интерфероны I типа, может быть продуктивной стратегией, поскольку эти сенсоры предпочтительно связываются с разными молекулами РНК. Однако, активация данных рецепторов может увеличивать синтез противовоспалительных цитокинов, поэтому чрезмерная стимуляция этих рецепторов может вызвать побочные эффекты, такие как хроническое воспаление [102]. Для определения возможности терапевтического применения препаратов на основе иммуностимулирующих РНК необходимо оценить

влияние профиля противовоспалительных или противовоспалительных цитокинов на терапевтический эффект, а также на безопасность применения.

1.2.2 Зависимая от последовательности иммуностимуляция

Усилия исследователей по лекарствам на основе нуклеиновых кислот (антисенс-олигонуклеотиды, siРНК, рибозимы, мРНК и плазмиды) выявили способность определенных нуклеиновых кислот оказывать иммуностимулирующее воздействие, аналогичное реакции на инфекционный агент [15,27]. Эти эффекты (ингибирование роста клеток, глобальные изменения экспрессии генов, токсические эффекты) впервые были обнаружены при изучении антисенс-олигонуклеотидов, которые содержат определенные мотивы последовательности [89].

Было обнаружено, что иммуностимуляцию вызывает наличие неметилованных мотивов CpG, которые более представлены в бактериальной ДНК и редки у млекопитающих [103,104] и поэтому рассматриваются иммунной системой позвоночных как сигнал опасности. Эти мотивы последовательности распознаются TLR9 и индуцируют врожденный иммунный ответ [105,106]. Более того, CpG олигодезоксинуклеотиды (ОДН) могут активировать клетки адаптивной иммунной системы, и, благодаря своей иммуностимулирующей активности, они широко изучаются в доклинических и клинических исследованиях в качестве терапевтических агентов против онкологических и инфекционных заболеваний [107–109].

В частности, олигонуклеотид, содержащий мотивы CpG, успешно применялся в иммунотерапии против рака мочевого пузыря человека [110] (Таблица 1): обработка культуры опухолевых клеток различными концентрациями CpG ОДН снижала жизнеспособность клеток рака мочевого пузыря человека (UM-UC-3 и T24) путем индукции апоптоза и способствовала жизнеспособности нормальных человеческих немалигнанных уроэпителиальных клеток (SV-HUC-1). Команда Ци и др. использовала два различных CpG ОДН с повторами CG (1826-CpG и KSK CpG) (Таблица 1) и изучила их влияние на лимфомные клетки A20. Было замечено, что оба этих ОДН индуцировали апоптоз и цитотоксичность в раковых клетках, но KSK CpG оказывал более эффективное действие [111].

CpG ОДН с фосфодиэстерным остовом не стабильны внутри клеток и подвержены разрушению нуклеазами, что снижает эффективность их действия [104]. При использовании ОДН с фосфоротиоатным остовом, разница была очевидна: ОДН были более устойчивы и их эффект длился дольше [112, р. 9,113]. Другая стратегия, используемая для стабилизации CpG-ОДН без изменения структуры остова, включает создание

последовательностей, богатых гуанином, для индукции образования G-квадруплексных (G4) структур [113–115]. Было установлено, что последовательность GTCGTT распознается человеческими клетками как CpG мотив [116]. В исследовании Хоши и др. была разработана последовательность, содержащая этот мотив, с чередующейся последовательностью полигуанозина для образования структуры G-квадруплекса. Исследование свойств последовательностей, включающих 0, 2, 4 и 8 гуаниновых нуклеотидов показало, что последовательность G4-CpG (таблица 1) обладает повышенной устойчивостью к разрушению нуклеазами и внутриклеточным поглощением, и вызывает 7-кратное увеличение секреции IL-6 по сравнению с другими последовательностями. Более того, она лучше формировала структуру G-четверик по сравнению с другими последовательностями [113], что указывает на возможное влияние третичной структуры на иммунное распознавание, хотя эффект более высокой устойчивости к разрушению клеточными нуклеазами не может быть исключен.

Открытие интерференции РНК вызвало огромный интерес к изучению влияния двухцепочечных РНК на экспрессию генов [117]. Изначально считалось, что короткие двухцепочечные РНК (siRNA), имитирующие продукты процессинга двухцепочечных РНК ферментом Дайсер, не имеют иммуностимулирующего эффекта, в отличие от исходных длинных двухцепочечных РНК, однако, по мере накопления экспериментальных данных, стало понятно, что это не так [118–120]. В ходе исследований, касающихся siРНК, было отмечено, что G и U богатые последовательности, являются общим признаком иммуностимулирующих мотивов [121]. Дальнейшие исследования показали, что мотив, богатый GU, является основной структурой, которую распознает TLR8 [122]. В работе Роеск и др. [123] было показано, что siРНК с 5'-трифосфатом эффективно подавляет экспрессию генов и одновременно активирует рецептор RIG-I. Другое исследование использовало 5'-ppp siРНК, которая активировала RIG-I-зависимую продукцию интерферонов I типа и ингибировала репликацию вируса гепатита В [124].

Ранее в нашей лаборатории была описана короткая двухцепочечная РНК длиной 22 пары оснований, названная исРНК (иммуностимулирующая РНК), обладающая антипролиферативной активностью на различных опухолевых клетках *in vitro*, а также противоопухолевой и антиметастатической активностью против карциномы и гепатомы *in vivo* [15,125,126]. Было показано, что эта исРНК стимулирует производство интерферонов I типа и ингибирует развитие гриппозной инфекции у мышей [127]. Иммуностимулирующий эффект исРНК оказался зависимым от последовательности (Таблица 1): замена оснований А и U на 3' конце одной из цепей достаточна для блокирования иммуностимулирующей активности дуплекса.

Ли и соавт. ввели одноцепочечную РНК, последовательность которой была составлена из последовательностей вирусных геномов (HIV-1 и SARS-CoV), с фосфоротиоатным остовом и содержащую GU богатые мотивы взрослым самцам мышей линии Kunming в хвостовую вену [122]. Результаты показали, что использование одноцепочечной РНК (Таблица 1) вызвало заметное увеличение уровня TNF α в сыворотке крови мышей по сравнению с контрольной группой. Более того, эта же ssRNA120 SARS-CoV вызвала значительный рост уровня противовоспалительных цитокинов в PBMC человека. Замена U на A в иммуностимулирующей последовательности предотвращает стимуляцию продукции IL-6 и TNF α PBMC, тогда как замена G на A блокирует только индукцию IFN α в pDC и не влияет на секрецию IL-6, TNF α и IL-12 [128, р. 8]. Одноцепочечная РНК, в состав которой были добавлены CpG мотив и 6 нуклеотидный поли-(G) на 3'-конце, активировала моноциты, однако рецепторы, ответственные за распознавание этой молекулы, до сих пор не выявлены [129]. Способность гибридов ДНК-РНК, содержащих CpG мотивы эффективно активировать TLR7, TLR8 и TLR9 в организме была продемонстрирована в [130].

Сферические нуклеиновые кислоты (SNAs) представляют собой привлекательный новый агент среди иммуностимулирующих нуклеиновых кислот благодаря ряду полезных свойств [131]. Прежде всего, сферическая форма защищает их от деградации нуклеазами по сравнению с линейными нуклеиновыми кислотами, что увеличивает их время жизни внутри клетки и обеспечивает более длительное биологическое действие [132], кроме того, это облегчает их внутриклеточный захват. SNAs лучше переносимы клетками по сравнению с линейными нуклеиновыми кислотами с теми же последовательностями [133], и их способность активировать врожденную иммунную систему полностью зависит от наличия иммуностимулирующих мотивов в их последовательности, что означает, что они могут служить нескольким целям [134,135]. SNAs могут быть получены как из ДНК, так и из РНК или их комбинаций, путем их организации вокруг ядра наночастицы [136]. SNAs способны проникать в клетку без специальных средств доставки путем эндоцитоза, что обеспечивает эндосомальную локализацию и облегчает их взаимодействие с TLR [137]. Команда Радович-Морено и соавт. разработала 3D-структуру иммуностимулирующих SNAs, используя различные наночастицы в качестве ядра и использовав CpG 1826 (Таблица 1) с фосфодиэфирным и фосфотиоатным остовом. Полученные ими результаты показали, что 3D-структура IS-SNAs снижает скорость роста раковых клеток и увеличивает выживаемость животных с лимфомой [136]. Кроме того, IS-SNAs вызывает более выраженную активацию клеток врожденного иммунитета в живых организмах и усиливает гуморальный и клеточный иммунный ответ на модельные антигены, такие как овальбумин

(OVA) {Citation}. При изучении иммуностимулирующего действия SNAs, состоящей из одноцепочечной РНК вместо ДНК (Таблица 1)[136], показано, что SNAs входят как в антиген-представляющие клетки (APC), так и в не-APC клетки и вызывают заметную последовательно-специфическую активацию TLR7 и TLR8. Конформация нуклеиновых кислот, которая может контролироваться при проектировании структуры, влияет на их активность [134].

Приобретение иммуностимулирующих паттернов может придать соответствующие свойства терапевтическим нуклеиновым кислотам, направленным на активацию или ингибирование экспрессии определенных генов. Многофункциональная молекула, состоящая из синтетически слитых двуцепочечной siРНК и одноцепочечного CpG-олигонуклеотида, агониста TLR9, была использована в работе Кортылевски и соавт. [137]. Этот конъюгат способен активировать TLR9, взаимодействуя с определенными иммунными клеткам (В-клеткам и DC - ключевым компонентам опухолевой микросреды), помимо способности подавлять иммунные чек-пойнты по механизму РНК-интерференции. Добавление трифосфата к 5'-концу siРНК, направленной на район слияния генов S и Р генома вируса гепатита В, увеличило ее иммуностимулирующую способность за счет активации внутриклеточного рецептора RIG-I и усилило противовирусный эффект [124].

Таким образом, идентификация иммуностимулирующих мотивов последовательности и структуры может не только позволить избегать их включения в состав ген-направленных терапевтических нуклеиновых кислот, но и создавать на их основе иммуностимулирующие молекулы с благоприятным спектром активации цитокинов и интерферонов, обеспечивая баланс между иммуностимуляцией и токсичностью.

Таблица 1. Экспериментально изученные иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты.

Обозначение	Последовательность 5'- 3'	Длина н./б.п.	Эффекты	Ссылка
G4-CpG	GGGGTTGTCGTTTTGTCGTTGGG GTTGTCGTTTTGTCGTTGGGGTT GTCGTTTTGTCGTTGGGG	64	образует G-квадруплекс; индуцирует IL-6	[113]
CpG ODN	AACGTTGTCGTCGACGTCGTCGT C	24	снижают жизнеспособность клеток рака мочевого пузыря человека (UM-UC-3 и T24)	[138]
1826-CpG	TCCATGACGTTTCCTGACGTT	20	индуцируют апоптоз в клетках лимфомы A20, но не так эффективно, как KSK-CpG	[124]
KSK-CpG	TCGTCGTTTTCGTCGTCGTTTT	22	снижают мембранный потенциал митохондрий; индуцирует апоптоз в клетках лимфомы A20	[139]

ssRNA40 из генома ВИЧ-1	GCCCGUCUGUUGUGUGACUC	20	вызывает секрецию TNF- α у мышей	[140]
ssRNA120 генома SARS-CoV	GUCUGAGUGUGUUCUUG	17	вызывает секрецию TNF- α у мышей; индуцирует секрецию провоспалительных цитокинов в hPBMCs	[140]
ssRNA83 генома SARS-CoV	GUGCUUGUGUAUUGUGC	17	вызывает секрецию TNF- α у мышей	[140]
ssRNA-DR	GCCCGACAGAAGAGAGACAC	20	активирует TLR 7/8	[141]
короткая двуцепочечная РНК	GUGUCAGGCUUUCAGAUUUUUU / AAAUCUGAAAGCCUGACACUUA	22	антипролиферативное действие на опухолевые клетки	[142]
1826 CpG SNA	TCCATGACGTTTCCTGACGTT	20	снижает скорость роста раковых клеток; активирует иммунные клетки in vivo	[143]

1.2.3 Независимая от последовательности иммуностимуляция

Характеристики нуклеиновых кислот, такие как длина, структура дуплекса и степень фосфорилирования концов, играют решающую роль в определении "друга или врага" паттерн-распознающими рецепторами (Таблица 2). Длинная двуцепочечная РНК, в норме не встречающаяся в клетках млекопитающих, обычно ассоциируется с вирусной инфекцией [142] и представляет собой генетический материал некоторых вирусов или интермедиаты, образующиеся во время вирусной репликации [144]. Способность иммунной системы отвечать на вирусную инфекцию синтезом интерферонов и цитокинов, а также мобилизацией иммунных клеток к месту инфекции, навела исследователей на мысль использовать полирибоинозиную:полирибозитидиновую кислоту (poly(I:C)) как синтетическую двуцепочечную РНК, имитирующую эффекты чужеродной двуцепочечной РНК природного происхождения, в качестве потенциального противоопухолевого и противовирусного препарата [145,146]. Двуцепочечная РНК с мисматчами полиИ:полиЦ12У (Ampligen) использовалась в некоторых странах для лечения синдрома хронической усталости, но до сих пор не получила одобрения ЕС и FDA из-за нежелательных побочных эффектов [147]. В течение нескольких последних десятилетий исследователи широко изучали иммуностимулирующие свойства поли(I:C) и возможность его использования в качестве вакцинного адъюванта [148]. Недавно интерес к этому препарату возобновился в связи с пандемией Covid-19, и AIM ImmunoTech начала исследование Ampligen в качестве потенциального инфузионного препарата для лечения постковидной когнитивной дисфункции [149].

Гетерогенные синтетические дцРНК и дцРНК из природных источников также изучались как активаторы врожденного иммунитета [150]. Длинная дцРНК (472 п.н.) гомологичная последовательности мРНК гена *c-MYC* использовалась для подавления экспрессии интерферон-чувствительного гена *c-MYC* на двух уровнях регуляции: через механизм РНК-интерференции и через активацию неспецифического интерферонового ответа [151]. Было показано, что dsMYC более эффективно подавляет экспрессию *c-MYC*, чем dsEGFP (гомологичная участку 1 нт–448нт мРНК EGFP) и поли (I:C). дцРНК из вирусоподобных частиц киллерного штамма дрожжей ("Ридостин") демонстрировала индуцирование интерферона, активацию фагоцитоза, противоопухолевые и антивирусные эффекты и была одобрена для использования в клинике в Российской Федерации как иммуномодулятор [152].

5'-трифосфатный конец оцРНК, синтезируемой вирусными полимеразам, распознается RIG-I и вызывает его активацию [153]. У эукариот распознавание 5'-трифосфатного конца собственных РНК предотвращается за счёт его капсирования или за счёт посттранскрипционных модификаций [154], которые помогают клетке различать хозяйскую и вирусную РНК. Было обнаружено, что химически синтезированная дцРНК, не имеющая фосфата на 5'-конце, тоже способна вызывать стимуляцию иммунных клеток через RIG-I [154]. Это указывает на то, что дцРНК может индуцировать синтез интерферонов через RIG-I сигнальный путь даже в отсутствие фосфатной группы, однако, разница заключается в количестве секретируемых интерферонов: было замечено, что присутствие концевых фосфатов усиливает эффективность распознавание RIG-I и его активации [155].

Длина нуклеиновых кислот определяет, какой рецептор она активирует [156, р. 5]: длинная двуцепочечная РНК активирует сигнальный путь MDA5 [157], в то время как короткая двухцепочечная РНК является лигандом для сигнального пути RIG-I [158]. Экспериментально было доказано, что укорачивание поли(I:C), который является лигандом MDA5, превращает его в лиганд RIG-I [155]. Еще один пример - клетка инфицированная Реовирусом, геном которого содержит фрагменты двуцепочечной РНК разной длины [159]. Длинная двухцепочечная РНК индуцировала IFN через путь MDA5, в то время как короткая двухцепочечная РНК вызывала синтез IFN через путь RIG-I [66]. Это означает, что как RIG-I, так и MDA5 могут дискриминировать по длине двуцепочечную РНК для выбора сигнального пути [158]. Специфическая структура лигандов RIG-I может быть обнаружена в некоторых структурах siРНК, таких как тупые концы или 5'-трифосфаты в составе siРНК, полученных с помощью *in vitro* транскрипции [119]. LGP2 также способен участвовать в

распознавании одноцепочечной и двухцепочечной РНК и связываться с RIG-I или MDR5, тем самым активируя соответствующий сигнальный путь [160], такое взаимодействие расширяет спектр распознаваемых паттернов нуклеиновых кислот и варианты ответа на них [161].

Кольцевые РНК (circRNAs) присутствуют в эукариотических клетках и вирусных геномах. Вирусные circRNA непосредственно активируют рецептор распознавания РНК RIG-I, в то же время, модификация РНК N6-метиладенозина (m6A) в составе circRNA эукариот предотвращает активацию врожденного иммунитета [162].

Поскольку все клетки содержат собственную ДНК в достаточном количестве, обнаружение чужой ДНК основано на особенностях ее локализации: рецепторы и белки, расположенные в цитоплазме, такие как DAI [163,164], AIM2 (Absent in melanoma 2) [165,166], DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) [167,168] и ряд других [169], действуют как независимые от последовательности сенсоры.

Таблица 2. Лиганды PRR.

PRR	Располо- жение	Лиганды	Сигнальный путь	Ссылка
TLR 3	эндосомы	длинная дсРНК (минимальная длина 40-50 п.н.); поли (I:C)	TRIF-зависимый	[170]
TLR 7	эндосомы	оцРНК с предпочтением 3-меров с U, расположенным во втором положении	MyD88-зависимый	[171]
TLR 8	эндосомы	оцРНК с предпочтением динуклеотидов UG	MyD88-зависимый	[170]
TLR 9	эндосомы	неметилированная CpG ДНК; сферические нуклеиновые кислоты, содержащие мотивы CpG	MyD88-зависимый	[172]
RIG-I	Цитозоль	короткие дцРНК и оцРНК с 5'-трифосфатом; круговая РНК	MAVS-зависимый	[94]
MDA5	Цитозоль	длинная дцРНК; поли (I:C)	MAVS-зависимый	[173]

1.2.4 Сигнальные пути

Внутриклеточные TLR активируют основные пути, через TIR-домен-содержащий адаптер, индуцирующий интерферон- β (TIR domain-containing adaptor-inducing interferon- β , TRIF) и Белок первичного ответа миелоидной дифференцировки 88 (Myeloid differentiation primary response 88, MYD88) [174–176] (Рис. 1). TLR3 использует путь TRIF, который ассоциируется с синтезом IFN I типа и цитокинов [177,178]. После активации TLR3

взаимодействие между TRIF и фактором, ассоциированным с рецептором TNF (TNF receptor-associated factor. TRAF3) приводит к активации фактора регуляции интерферона 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3) посредством фосфорилирования через путь TRAF3-TBK1-IKK ϵ . Активированный IRF3 формирует димер и перемещается из цитоплазмы в ядро, где стимулирует экспрессию IFN-I [179,180]. TRIF также может взаимодействовать с TRAF6, который рекрутирует рецептор, взаимодействующий с протеинкиназой 1 (RIPK1). RIPK1 в последствии активирует ядерный фактор каппа-легкой-цепи-усилителя активации В-клеток (NF- κ B) и митоген-активируемые протеинкиназы (MAPK) через TAK1 и индуцирует синтез противовоспалительных цитокины [181].

Сигнал TLR 7/8/9 проходит через путь, зависящий от MyD88, что приводит в основном к продукции противовоспалительных цитокинов [174,182,183]. MyD88 привлекает несколько киназа, ассоциированных с рецепторами интерлейкина (IRAK1, 2 и 4), которые, впоследствии, фосфорилируют и активируют TRAF6, инициируя убиквитинирование и фосфорилирование TAK1 (киназа, активируемая трансформирующим ростовым фактором β -1). TAK1 инициирует автофосфорилирование IKK β [184,185], что в итоге приводит к активации NF- κ B, затем к его транслокации в ядро и индукции экспрессии противовоспалительных генов [182,186].

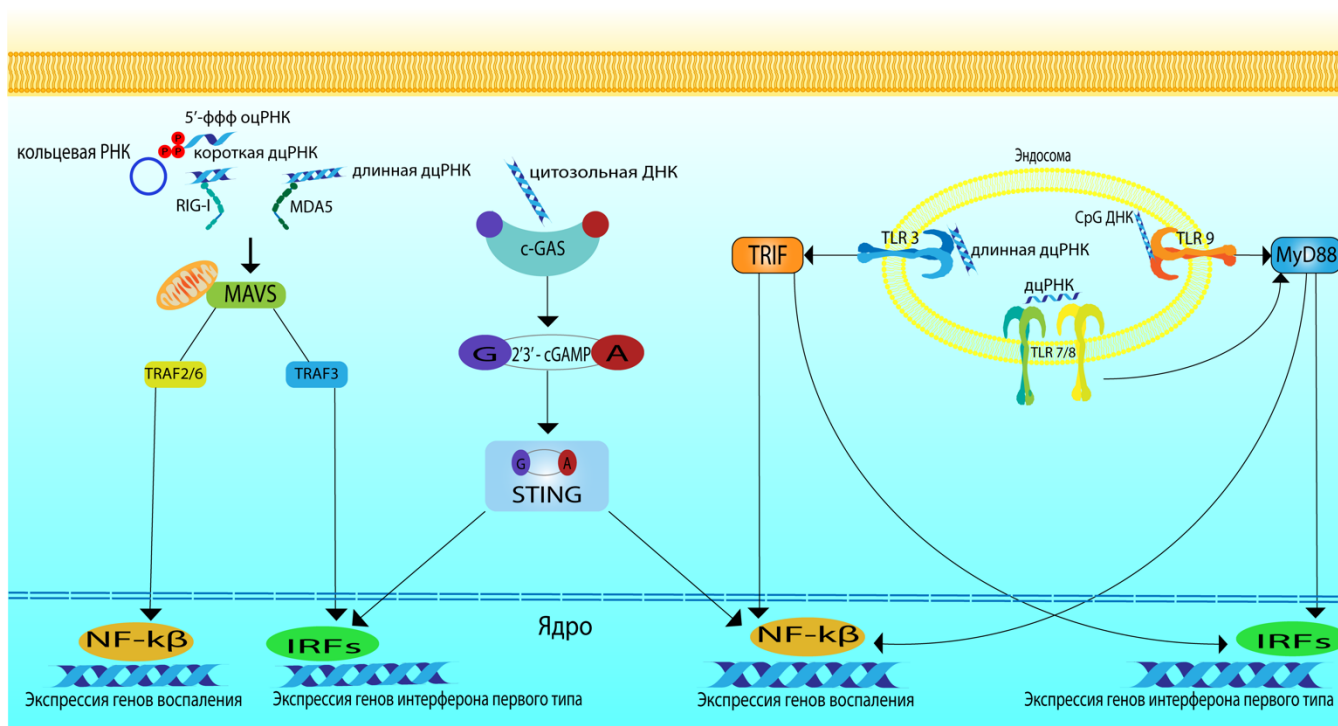


Рисунок 1. Сигнальные пути, активируемые при распознавании нуклеиновых кислот [32]

Активация сигнального пути RLR осуществляется с участием их CARD доменов,

которые становятся доступными для взаимодействия с компонентами сигнального пути в результате конформационных изменений, вызванных связыванием с РНК [187,188]. После активации RIG-I и MDA5 их домены CARD становятся доступными для взаимодействия с доменами CARD MAVS (белок митохондриальной антивирусной сигнализации, также известный как IPS-1, VISA или Cardif), который обычно находится на внешней мембране митохондрий [87,189]. Активированный MAVS передает сигнал к TRAF3, киназе TBK1 и комплексу IKK ϵ , затем происходит фосфорилирование IRF3 и IRF7, которые транслоцируются в ядро для индукции синтеза IFN-I [190]. Секретированные интерфероны связываются с рецепторами IFN I типа на мембране своей клетки, а также на соседних клетках, которые экспрессируют те же рецепторы, что приводит к активации сигнального пути JAK-STAT (Janus киназа/сигнальные трансдукторы и активаторы транскрипции) [191]. В конечном итоге, происходит индукция экспрессии сотен интерферон-стимулированных генов (ISGs), усиливающих ответ IFN. При активации MAVS сигналы также могут передаваться по путям TRAF2/6, RIP1 (белок, взаимодействующий с рецептором-1) и через Каспазу 8/10 к комплексам IKK (включая IKK α , IKK β , IKK γ), что в конечном итоге приводит к фосфорилированию комплексов NF- κ B и I κ B α . Фосфорилированный I κ B α и активированный NF- κ B перемещаются в ядро для стимуляции синтеза противовоспалительных цитокинов и хемокинов воспаления [192].

Важную роль в передаче сигналов от многочисленных цитозольных сенсоров чужеродной ДНК, играет STING (стимулятор белка генов интерферона) [193,194]. Ассоциированный с ЭПР STING связывается с TANK-связывающей киназой 1 (TBK1) и перемещает ее в эндолизосомальные отделы, где TBK1 фосфорилирует IRF3 и NF- κ B. Активация сигнальных путей IRF3 и NF- κ B приводит к индукции цитокинов и синтезу интерферонов типа I [195].

Таким образом, различные нуклеиновые кислоты, активирующие различные сигнальные пути, индуцируют синтез противовоспалительных и провоспалительных цитокинов. Специфичность взаимодействия лиганд-рецептор определяет спектр эффектов, возникающих при активации. В случае терапевтических нуклеиновых кислот предпочтительно выделение противовоспалительных цитокинов и интерферонов типа I, поскольку провоспалительные цитокины, включая TNF- α , могут вызвать токсические эффекты и инициировать острую или хроническую воспалительную реакцию.

1.3 Возможные сферы применения иммуностимулирующих нуклеиновых кислот

1.3.1 Иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты для лечения рака

В последние десятилетия исследователи сосредоточились на использовании терапевтических нуклеиновых кислот для лечения рака путем индукции антиген-специфических адаптивных иммунных ответов через доставку опухолеобразующего антигена с адъювантом к антиген-представляющим клеткам (APC), которые индуцируют опухолеспецифический иммунный ответ [131,196–198]. Поскольку ограниченное число пациентов реагировало на иммунотерапию, были зафиксированы нежелательные побочные эффекты иммунотерапии, такие как токсичность и развитие резистентности к терапии [199,200], было предложено объединить использование иммуностимулирующих нуклеиновых кислот в качестве компонентов неспецифической иммунотерапии со специфической иммунотерапией для того, чтобы улучшить результаты терапии у большого числа пациентов с раком, даже на поздних стадиях [201,202]. Опухолевые клетки разработали многочисленные механизмы для уклонения от иммунного надзора [203,204], поэтому преодоление раком индуцированной иммуносупрессии критически важно для терапии. Подходы, направленные на ингибиторы иммунных контрольных точек [205,206] и общие методы стимуляции, активно исследуются для достижения этой цели. PAMP и другие сигналы опасности, которые активируют врожденные иммунные ответы через специфические рецепторы, включая TLR и цитоплазматические PRR [207], дали идею о имитации PAMP для индукции противоопухолевого иммунного ответа. Нуклеиновые кислоты могут быть использованы для этой цели как лиганды эндоплазматических TLR [208].

CpG ОДН интенсивно изучаются в доклинических и клинических исследованиях в качестве лигандов TLR9 [209] (Таблица 3). Химические модификации CpG-ОДН успешно использовались для улучшения их стабильности. При сигнализации через TLR9 они вызывают индукцию цитокинов и активацию APC [210]. После доклинических исследований результаты побудили исследователей начать клинические испытания в 2000-х годах, где CpG ОДН тестировались как самостоятельно, так и в сочетании с радио- и химиотерапией, но результаты не оправдали ожиданий [211]. В настоящее время CpG-ОДН тестируются совместно с ингибиторами иммунных контрольных точек в фазах I и II клинических исследований для лечения опухолей, таких как метастатическая меланома [211].

Самым изучаемым индуктором иммунитета среди нуклеиновых кислот является поли(I:C) - лиганд TLR3 [212]. Поли(I:C) доказал свою способность инициировать апоптоз

в раковых клетках [213] и вызывать продукцию IFN I типа и секрецию хемокинов иммунными клетками [196]. Помимо иммуностимулирующего эффекта dsRNA, у него также есть антипролиферативный эффект на различные опухолевые клетки [16], и этот эффект также способствует его противоопухолевому действию. Помимо синтетического аналога дцРНК, также изучались различные длинные дцРНК из природных источников как противоопухолевые и противовирусные агенты, но они не продемонстрировали значительных преимуществ перед синтетическим аналогом. Поскольку поли(I:C) чувствителен к разрушению нуклеазами и может быть разрушен вскоре после введения, использование не защищенного поли(I:C) в свободном виде не позволяет достичь терапевтически значимых эффектов [214,215]. Разработана более стабильная форма полирибоинозин:полирибоцитидиловой кислоты-полилизина карбоксиметилцеллюлозы (поли-ICLC, Hiltonol®) [216], которая была испытана в фазах I и II клинических исследований. Поли-ICLC применялся как самостоятельно, так и совместно с радиотерапией и вакцинами от рака [217] (Таблица 4). Недавно короткие 21–22 б.п. siРНК с иммуностимулирующими мотивами [15,38,142,218–221], олигорибонуклеотиды с 5'-концевыми трифосфатами [124,222,223] были предложены для испытания их активности как потенциальные адъюванты в противоопухолевой и противовирусной иммунотерапии, однако до сих пор эти молекулы не дошли до клинических исследований.

Таблица 3. Текущие и завершенные клинические испытания CpG-олигонуклеотидов.

№.	Препарат	Заболевание	Фаза	Статус	НСТ номер
1	CpG-STAT3 siРНК CAS3/SS3 Радиотерапия	Рецидивирующая неходжкинская лимфома	Фаза 1	Рекрутинг	NCT04995 536
2	Anti-OX40 антитело BMS 986178 TLR9 Агонист SD-101	Солидные опухоли	Фаза 1	Действующий	NCT03831 295
3	Пептидная вакцина GM-CSF TLR9 Агонист PF3512676	Меланома III-IV стадии	Фаза 1	Завершенный	NCT00471 471
4	Синтетическая иммуностимулирующая ДНК, конъюгированная с аллергеном амброзии	Сезонный аллергический ринит	Фаза 2	Завершенный	NCT00346 086
5	CpG-ODN высвобождение опухолевого антигена in situ путем интервенционной абляции или шариков с лекарственным покрытием	Рак легких; гепатоцеллюляр-ная карцинома; солидные опухоли	Фаза 1	Рекрутинг	NCT04952 272
6	TLR9 Агонист MGN1703	ВИЧ	Фаза 1 Фаза 2	Завершенный	NCT02443 935
7	TLR9 Агонист GNKG168	Лейкемия	Фаза 1	Прекращено	NCT01035 216
8	CpG-ODN	Глиобластома	Фаза 2	Завершенный	NCT00190 424
9	Na-GST-1/Alhydrogel® CpG 10104	Анкилостомоз	Фаза 1	Завершенный	NCT02143 518

10	1018 ISS (CpG ODN) irinotecan cetuximab	Колоректальный рак	Фаза 1	Прекращено	NCT00403 052
11	1018 ISS (CpG ODN) Вакцина против гепатита В (рекомбинантная)	Гепатит В	Фаза 1	Завершенный	NCT00426 712
12	IMO-2055 (CpG ODN)	Карцинома почек	Фаза 2	Завершенный	NCT00729 053

1.3.2 Вакцины и адъюванты на основе нуклеиновых кислот

Одним из наиболее перспективных подходов использования терапевтических нуклеиновых кислот (ТНК) являются конструирование вакцин на их основе. В классических вакцинах антиген представлен в виде белка или пептида, доставленного с адъювантами, которые усиливают иммунный ответ [224,225]. Однако поглощение вакцины регуляторными иммунными клетками, что может вызвать иммунную толерантность к опухоли [226], ограниченная презентация антигена главным комплексом совместимости тканей-I, приводящая к слабому ответу Т киллеров ограничивают эффективность их применения [196]. Вакцины на основе нуклеиновых кислот, в составе липидных наночастиц [227] или векторных платформ [228], дали многообещающие результаты и могут рассматриваться как альтернатива для традиционных подходов к вакцинации [229]. Использование вакцин на основе нуклеиновых кислот позволяет сократить время, необходимое для их разработки и оперативно реагировать на новые вызовы. Адъюванты — это компоненты вакцины, усиливающие иммуногенность антигена и увеличивающие силу и продолжительность иммунного ответа путем активации системы врожденного иммунитета [230]. Доказана роль ее активации врожденной иммунной системы через PRR в действии адъювантов как отдельных компонентов вакцины, так и в составе самой вакцины [231]. Поэтому иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты, являющиеся агонистами PRR, активно исследуются как адъюванты вакцин (Таблицы 3, 4). Наиболее часто используемыми агонистами для этой цели являются CpG-олигонуклеотиды (агонисты TRL9), дцРНК и ее синтетические аналоги поли(I:C) (агонисты TLR3), а также недавно обнаруженные кольцевые РНК, которые показали себя как агонисты RIG-I [162].

Незащищенные нуклеиновые кислоты нестабильны в крови, биологических жидкостях и внутри клеток из-за деградации нуклеазами, и для их доставки в эндосомы, где находятся TLR рецепторы, распознающие нуклеиновые кислоты, они должны быть защищены, например, инкапсулированы в состав липоплексов [232]. Другим подходом для обеспечения сохранности адъюванта и его доставки в целевые клетки является экспрессия его непосредственно в клетке с помощью вирусного вектора [233]. Этот подход, в частности, реализуется в векторной платформе, разработанной Vaxart (Таблица 4), хотя следует

отметить, что до сих пор препараты, созданные с использованием этой технологии, не вышли за пределы второй фазы клинических испытаний. Тем не менее, возможность использования нуклеиновых кислот в качестве адъювантов выглядит многообещающей, особенно в свете их нетоксичности и безопасности, что выглядит многообещающе по сравнению с адъювантами на основе солей алюминия.

Таблица 4. Текущие и завершённые клинические испытания по изучению дсРНК в качестве адъюванта.

№.	Препарат	Заболевание	Фаза	статусы	НСТ номер
1	ND1.1 (Вирусная векторная вакцина, кодирующая белок-гемагглютинин птичьего гриппа H5N1 и адъювант дсРНК)	Птичий грипп	Фаза 1	Завершённый	NCT01335347
2	VXA-A1.1 (Вакцина против сезонного гриппа А на основе аденовирусного вектора и адъювант дсРНК)	Грипп	Фаза 1 Фаза 1 Фаза 2	Завершённый Завершённый Завершённый	NCT01688297 NCT03121339 NCT02918006
3	VXA-G1.1-NN (норовирусная вакцина на основе аденовирусного вектора (VXA-G1.1-NN), экспрессирующая G1.1 VP1 и адъювант дсРНК)	Норовирусный гастроэнтерит	Фаза 1 Фаза 1 (высокая доза)	Завершённый Завершённый	NCT03125473 NCT02868073
4	VXA-RSV-f (вакцина на основе белка RSV F на основе аденовирусного вектора и адъювант дсРНК)	Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ)	Фаза 1	Завершённый	NCT02830932
5	VXA-CoV2-1 (вакцина на основе аденовирусного вектора, экспрессирующая антиген SARS-CoV-2 и адъювант дсРНК)	COVID-19	Фаза 1 Фаза 2 Фаза 2 (с изотретиноном) Фаза 3 (с изотретиноном)	Рекрутинг Рекрутинг Пока не набирает Пока не набирает	NCT04563702 NCT05067933 NCT04577378 NCT04353180
6	Hiltonol (поли ICLC - поли(I:C), стабилизированный полилизин и карбоксиметилцеллюлозой)	Здоровые волонтеры	Фаза 1	Завершённый	NCT01012700
7	белок NY-ESO-1; Поли-ICLC; Монтанид	Меланома	Фаза 1 Фаза 2	Завершённый Действующий	NCT01079741 NCT02334735

Распознавание нуклеиновых кислот иммунной системой для защиты от инфекции внешними агентами обеспечивается сложными, эволюционно консервативными механизмами, в реализации которых участвуют многочисленные сенсоры с различной специфичностью. К таким внешним нуклеиновым кислотам относятся терапевтические нуклеиновые кислоты, введенные в организм извне. В случае специфических терапевтических нуклеиновых кислот, направленных на регулирование экспрессии конкретного целевого гена или редактирование генома, иммуностимуляция рассматривается как нежелательный эффект, который необходимо избегать путем химической модификации и исключения иммуностимулирующих последовательностей из состава таких терапевтических нуклеиновых кислот. С другой стороны, иммуностимуляция может быть эффективно использована для целей иммунотерапии опухолей и вирусных заболеваний, для коррекции состояний иммунодефицита и для повышения эффективности иммунизации в качестве адъюванта. Иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты демонстрируют многообещающие результаты при сочетании с химио- или радиотерапией лечения рака, но на сегодняшний день они не обеспечивают достаточной эффективности при использовании в качестве монотерапии, поэтому эта область требует более глубокого исследования. Что касается других терапевтических нуклеиновых кислот, разработка методов их целевой доставки в клетки *in vivo* является крайне актуальной задачей и для иммуностимулирующих нуклеиновых кислот, поскольку большинство сенсоров, которые их распознают, расположены внутри клеток. Следующий этап как экспериментальных, так и клинических исследований, вероятно, будет сосредоточен на разработке оптимальных систем доставки и новых последовательностей нуклеиновых кислот, которые обеспечивают сбалансированный иммунный ответ и характеризуются благоприятным профилем экспрессии цитокинов. Стратегия комбинирования иммуностимулирующих нуклеиновых кислот с другими нуклеиновыми кислотами и не-нуклеиновыми препаратами с целью получения многофункционального лекарства или препарата может повысить эффективность и специфичность лечения.

1.2 Системы доставки терапевтических РНК

Терапевтические РНК действуют путем блокирования функции РНК или белков, кодирования отсутствующих или дефектных белков [234], модуляции иммунного ответа [235], либо осуществляют редактирование ДНК или РНК. Независимо от механизма их терапевтического действия, большой размер некоторых ТНК, таких как мРНК, их отрицательный заряд и чувствительность к нуклеазам, присутствующим как в крови, так и

в тканях, затрудняют эффективное проникновение ТНК в клетки и ее функционирование [236].

Для преодоления препятствий перед безопасной и эффективной доставкой РНК разработаны как вирусные, так и невирусные системы доставки, которые защищают РНК от расщепления, экранируют отрицательный заряд и обеспечивают эффективное проникновение в клетки-мишени, сокращая воздействие на нецелевые клетки. Вирусные генотерапевтические препараты продемонстрировали успешные клинические результаты [236–238], однако эффективность таких подходов может быть ограничена наличием предсуществующего иммунитета к вирусному вектору [239], вирусно-индуцированной иммуногенностью [240], нежелательной геномной интеграцией [241], ограничениями размера трансгена [242], снижением эффективности повторного применения, сложностями в масштабировании [243] и дорогостоящим производством векторов. Хотя некоторые из этих ограничений удастся успешно преодолеть, это стимулировало поиск альтернативных систем доставки ТНК. Достижения в разработке синтетических материалов, которые инкапсулируют РНК, таких как полимеры, липиды и липидные наночастицы (ЛНЧ) [227], стимулировали интерес к исследованиям невирусных систем доставки, что привело к одобрению FDA предназначенных для подкожного введения конъюгатов N-асетилгалактозамина и siРНК (GalNAc–siРНК), нацеленных на гепатоциты [244–246], основанных на ЛНЧ препаратов siРНК для внутривенного введения, так же нацеленных на гепатоциты [247], а так же разрешенных для чрезвычайного использования EUA и одобренных FDA [248, р. 1] содержащих ЛНЧ мРНК-вакцин от COVID для внутримышечного введения [249]. Эти успехи ТНК препаратов, использующих невирусные системы доставки, указывают на то, что улучшенная доставка в ткани вне печени (также известные как экстрагепатические ткани), а также использование локальных способов доставки могут привести к появлению новых классов лекарств.

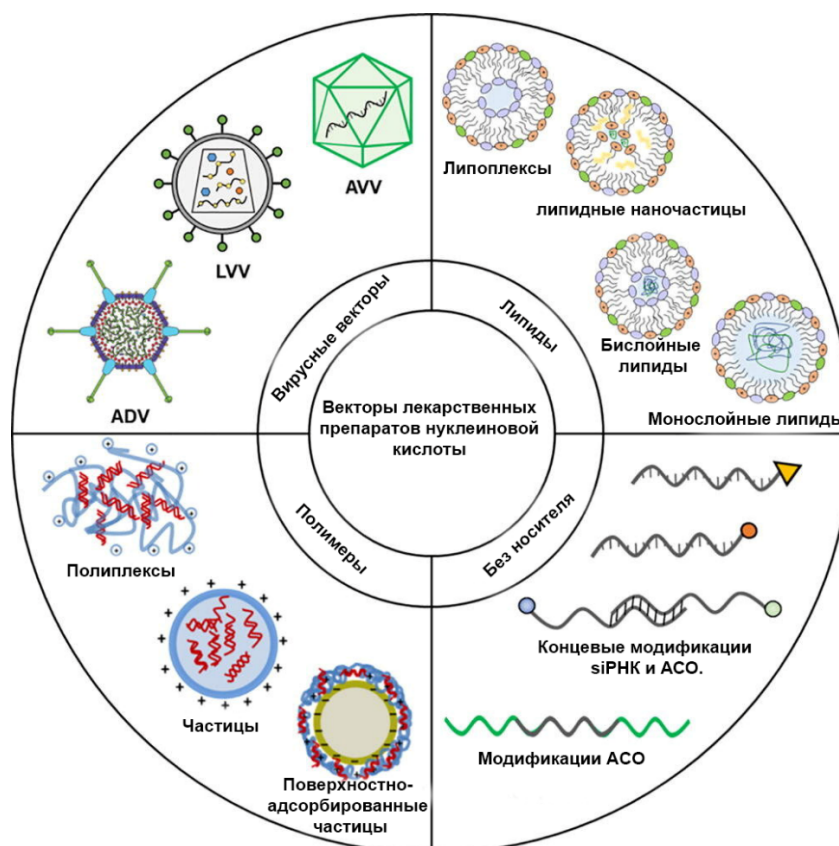


Рисунок 2. Схема адаптирована из *Biosafety and Health* (2022). [250]

1.2.1 Вирусные векторы

Рекомбинантные вирусные векторы, такие как адено-ассоциированные вирусы (AAV), широко используются для доставки терапевтических нуклеиновых кислот как *in vivo*, так и *ex vivo* [251]. Дикий тип AAV — это маленький, безоболочечный парвовирус (~25 нм) с одноцепочечной ДНК размером ~4,7 кб [252]. Рекомбинантные AAV-векторы, используемые в качестве транспортных средств, обычно содержат те же компоненты оболочки и структуру, что и дикий тип AAV, но значительная доля вирусных последовательностей заменены терапевтическими генными кассетами, максимизируя упаковочную способность и уменьшая иммуногенность [253]. Поскольку тропизм AAV имеет широкий диапазон, AAV могут использоваться для целевой трансдукции клеток различных тканей. Связавшись с рецептором на поверхности клетки AAV входят в клетку путем эндоцитоза, высвобождаются в цитозоль при закислении ранней эндосомы и, после перинуклеарного накопления, входят в ядро [254]. Примером такого вектора является Voretigene neparvovec-rzyl (торговая марка Luxturna), который представляет собой AAV серотипа 2 (AAV2), содержащий кДНК, кодирующую ген человека RPE65 для лечения наследственной ретинальной дистрофии LCA типа 2 [255].

Разработчики лекарственных средств постоянно совершенствуют стратегии для улучшения структуры и состава вирусных векторов для эффективной доставки трансгена, смягчения токсичности и предотвращения нежелательных эффектов, связанных с врожденным иммунным ответом [256]. Несмотря на эти достижения, направленные на минимизацию мутагенных и иммуногенных рисков, присущих вирусным векторам, задокументированы случаи смертельных реакций на введение вируса среди пациентов, проходящих экспериментальное лечение мышечной дистрофии Дюшенна и X-связанной миотубулярной миопатии [257,258]. Терапевтические протоколы для этих состояний часто требуют исключительно высоких доз вирусных векторов, иногда повторно введенных, что увеличивает вероятность нежелательных событий. Кроме того, помимо проблем безопасности, использование рекомбинантных вирусных векторов представляет существенные финансовые и логистические проблемы во время масштабирования и массового производства, что приводит к завышенным затратам на продукт и продолжительным срокам внедрения [259].

1.2.2 Невирусные векторы доставки для нуклеиновых кислот

Помимо вирусных векторов, также были разработаны другие методы доставки для успешного переноса нуклеиновых кислот в клетки. К методам доставки относятся физические методы, которые могут улучшить доставку нуклеиновых кислот через физическое воздействие и представляют собой важный инструмент в арсенале доставки нуклеиновых кислот [260]. Кроме того, невирусные векторы позволяют избежать возникновения проблем иммуногенности и цитотоксичности связанные с вирусными векторами [261]. Сниженная патогенность, а также низкая стоимость и простота масштабного производства делают невирусные векторы привлекательными средствами доставки генов [262]. Комбинация физических методов и невирусных векторов так же представляет собой привлекательное направление в разработке новых методов лечения рака и иммунотерапии [263].

1.2.2.1 Векторы на основе липидов

Векторы на основе липидов являются основой в области невирусных систем доставки генов, предлагая универсальное и эффективное средство для транспортировки терапевтических нуклеиновых кислот в клетки [264]. Эти векторы, в состав которых входят катионные липиды [265], обладают уникальной способностью образовывать комплексы с нуклеиновыми кислотами, которые могут защищать генетический материал от деградации и облегчать его вход в клетки [266]. Липидный состав может быть подобран для

оптимизации доставки в определенные типы клеток и улучшения стабильности нуклеиновых кислот в организме [267].

Например, включение полиэтиленгликоля (ПЭГ) в состав липидных наночастиц и липосом может продлить время их циркуляции в кровотоке, а специфические лиганды могут быть добавлены на поверхность липидных частиц для достижения клеточно-специфической доставки [268].

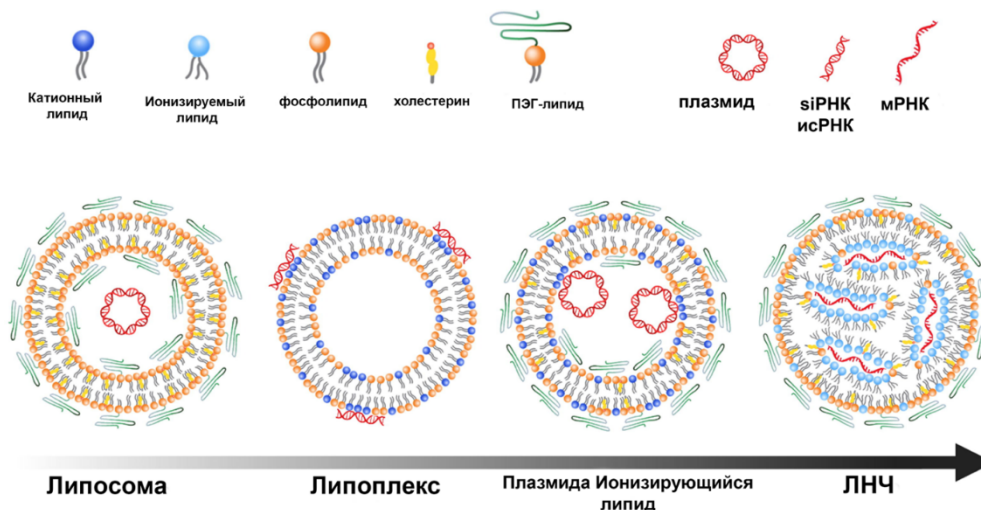


Рисунок 3. Векторы на основе липидов, рисунок адаптирован из Albersten et al., 2022 [269]

Разработка липидных наночастиц (ЛНЧ) начинается с выбора ионизирующегося катионного липида, который необходим для комплексации с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами [270]. Этот липид выбирается за его способность быть положительно заряженным при кислом pH, облегчая инкапсуляцию нуклеиновой кислоты, а затем быть нейтральным при физиологическом pH, уменьшая токсичность и увеличивая время циркуляции [271]. В состав частиц также включаются такие липиды, как фосфолипиды, для обеспечения структурной целостности ЛНЧ [272]. Холестерин часто добавляется для увеличения «текучести» и стабильности мембраны [272]. Наконец, полиэтиленгликоль (ПЭГ)-липиды включаются для создания гидрофильной оболочки вокруг ЛНЧ, что помогает избежать фагоцитоза и апсонизации и продлить время циркуляции в кровотоке [273].

Процесс доставки начинается с захвата ЛНП клетками, обычно через эндоцитоз [274]. Существует различные формы эндоцитоза, включая клатрин-зависимый, кавеолин-зависимый, рафт-зависимый и макропиноцитоз, каждый со своим набором клеточных сигналов и механизмов [275,276]. Выбор пути может влиять на эффективность доставки и судьбу ЛНП внутри клетки [277].

Попав внутрь клетки, ЛНП находятся внутри затем созревают и сливаются с лизосомами, где их содержимое обычно разрушается [278]. Для успешной генной терапии ЛНП должны избежать этой участи и покинуть компартмент до его слияния с лизосомой [279]. Выход из эндосомы — это критический этап и часто он является лимитирующим этапом в процессе доставки [279]. Для этого в состав ЛНП включают компоненты, предназначенные для дестабилизации мембраны эндосомы, облегчая высвобождение ТНК нагрузки в цитоплазму [42]. Это достигается за счет "эффекта протонной губки" некоторых катионных липидов, которые уравнивают рН эндосомы и вызывают приток ионов и воды, что приводит к отеку и разрыву эндосомы [280]. Единого мнения насчет точности описания этого механизма в литературе пока нет, однако сам эффект нельзя отрицать.

После успешного выхода из эндосомы ЛНП высвобождают нуклеиновые кислоты в цитоплазму. Здесь нуклеиновые кислоты свободно взаимодействуют с клеточными системами, что приводит к желаемому терапевтическому эффекту. Для терапии с помощью мРНК она транслируется рибосомами давая целевые белки, в то время как для применений генного редактирования нуклеиновые кислоты транспортируются в ядро, где они могут оказывать свое воздействие [281]. Для иммуностимулирующих нуклеиновых кислот они могут связываться как с эндосомальными, так и с цитозольными рецепторами [32].

Несмотря на успехи в конструировании ЛНЧ, существуют сложности в обеспечении эффективного клеточного захвата и высвобождения. Размер, заряд и состав ЛНЧ могут влиять на их взаимодействие с клеточной мембраной и их последующую интернализацию [282,283]. Кроме того, внутриклеточная транспортировка ЛНЧ является сложной и может приводить к их деградации или выведения из клетки путем экзоцитоза до высвобождения нуклеиновых кислот [284]. Исследователи продолжают оптимизировать конструкцию ЛНЧ для преодоления этих барьеров, улучшая доставку средств генной терапии пациентам.

Побочные эффекты ЛНЧ могут развиваться из-за различных компонентов липидного состава [6]. Катионные липиды, которые обычно используются для комплексообразования с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами, могут быть токсичными для клеток из-за их положительного заряда, который может нарушать клеточную мембрану и вызывать гибель клеток [285]. Кроме того, липиды-хелперы и холестерин, включенные в состав ЛНП, также могут способствовать токсичности, если их состав и количество тщательно не сбалансировано [275].

Еще одним аспектом токсичности является иммуногенность ЛНЧ. Включение полиэтиленгликоля (PEG) в липидную формулу, предназначенного для продления времени циркуляции и снижения иммунности [37,273,286], может парадоксально привести к

образованию антител против самого PEG, что приводит к ускоренному очищению крови от последующих доз и потенциальными реакциям гиперчувствительности [287].

В живом организме токсичность липидных наночастиц (ЛНЧ) может проявляться в виде воспаления, активации иммунной системы или побочных эффектов вне целевых органов [288]. Размер, заряд и состав ЛНЧ могут влиять на их распределение в организме и взаимодействие с различными типами клеток и органами. Если ЛНЧ накапливаются в нецелевых тканях, они могут вызывать местную токсичность и непредусмотренные разработчиками биологические эффекты [6,275]. Для смягчения этих токсических эффектов исследователи тщательно разрабатывают ЛНЧ с балансом липидов, чтобы достичь оптимальной инкапсуляции и доставки нуклеиновых кислот, минимизируя побочные реакции. Дозировка и способ введения также являются критическими факторами, которые оптимизируются для снижения токсичности [289]. Продолжающиеся исследования сосредоточены на разработке новых липидов и альтернативных систем доставки, которые могут обеспечить безопасные и более специфичные варианты генной терапии [275].

Липидные наночастицы привлекли в последнее время особое внимание благодаря их использованию в вакцинах на основе мРНК против COVID-19 [271]. Примеры липидов, одобренных FDA и используемых в ЛНЧ, включают SM-102, используемый в вакцине от COVID-19 компании Moderna [290], а также ALC-0315 и ALC-0159, используемые в вакцине от COVID-19 компании Pfizer-BioNTech [291]. Эти липиды были тщательно протестированы на безопасность и эффективность и показали свою эффективность в доставке мРНК, минимизируя побочные реакции. Технология ЛНЧ не только доказала свою ключевую роль в разработке вакцин, но также выглядит многообещающей для широкого спектра терапевтических применений, включая лечение генетических заболеваний, рака и инфекционных заболеваний.

1.2.2.2 Полимерные векторы

Полимерные векторы являются достойной альтернативой липидным системам [292]. Процесс конструирования этих векторов сложен и нацелен на увеличение эффективности доставки, минимизируя токсичность. Он начинается с выбора подходящих синтетических или природных полимеров, таких как полимерные мицеллы, хитозан, полиэтиленмин (PEI) и другие [293].

Полимерные мицеллы представляют собой инновационный класс полимерных векторов, которые привлекли значительное внимание в качестве средств для доставки нуклеиновых кислот [294]. Они формируются самоорганизацией амфифильных блок-сополимеров в водных растворах, образуя структуру ядра-оболочки [295]. Гидрофобное

ядро этих мицелл может инкапсулировать нуклеиновые кислоты, защищая их от ферментативного расщепления, в то время как гидрофильная оболочка придает стабильность и растворимость в биологических жидкостях [296].

Конструкция полимерных мицелл позволяет вводить в их состав различные функциональные группы, которые могут усилить их взаимодействие с целевыми клетками и облегчить выход из эндосом - важный шаг, необходимый для успешной доставки генов. Кроме того, поверхность полимерных мицелл может быть модифицирована с помощью транспортных лигандов для обеспечения клеточно-специфической доставки, тем самым увеличивая терапевтическую эффективность и снижая потенциальные побочные эффекты [297].

Одним из ключевых преимуществ полимерных мицелл является их способность преодолевать как внеклеточные, так и внутриклеточные барьеры, что необходимо для эффективной доставки нуклеиновых кислот в желаемое место действия [298]. Это включает навигацию через кровоток, уклонение от иммунной системы и высвобождение нуклеиновых кислот в целевые клетки [297]. Кроме того, полимерные мицеллы могут быть сконструированы для реагирования на конкретные стимулы, такие как pH или температура, для высвобождения своего груза в месте действия, повышая точность доставки нуклеиновых кислот. Это делает их универсальным и мощным вектором для применения в генной терапии, с потенциалом для лечения широкого спектра заболеваний [299].

Полиэтиленимин (PEI) - высокоуниверсальный и эффективный полимер, используемый в невирусных системах доставки генов [300]. Он особенно ценится за высокую плотность аминогрупп, которые могут быть протонированы [301]. Эти протонируемые амины позволяют PEI конденсировать нуклеиновые кислоты в компактные структуры, облегчая их защиту от деградации и улучшая клеточное поглощение через эндоцитоз [302]. Эффект протонной губки является ключевой особенностью PEI, где высокая буферная способность полимера приводит к осмотическому отеку в эндосомах, вызывая их разрыв и высвобождение нуклеиновых кислот в цитоплазму [303].

Синтез PEI векторов включает полимеризацию азиридина, которая может быть контролируемой для получения как линейного, так и разветвленного PEI, каждый с уникальными свойствами [304]. Линейный PEI имеет более низкую цитотоксичность, в то время как разветвленный PEI обладает более высокой эффективностью трансфекции из-за большего числа доступных аминогрупп для связывания нуклеиновых кислот [305]. Молекулярный вес PEI также играет ключевую роль в его функционировании; PEI с более низким молекулярным весом менее токсичен, но может обеспечивать более низкую

эффективность трансфекции, тогда как PEI с более высоким молекулярным весом более эффективен, но также более токсичен [306]. Модификации поверхности PEI могут улучшить его биосовместимость и способность к адресной доставке [307].

Хитозан — это биополимер, получаемый из хитина, который содержится в экзоскелете ракообразных и насекомых [308]. Он является перспективным вектором для доставки нуклеиновых кислот благодаря своим уникальным свойствам [309]. Хитозан биосовместим, биodeградируем, нетоксичен и имеет низкую иммуногенность, что делает его отличным кандидатом для биомедицинских применений [310,311].

Процесс доставки нуклеиновых кислот с использованием хитозана включает в себя образование наночастиц путем ионного гелеобразования [309]. Хитозан обладает положительным зарядом из-за своих аминогрупп, что позволяет ему электростатически взаимодействовать с отрицательно заряженным фосфатным остовом нуклеиновых кислот [312]. Это взаимодействие приводит к конденсации нуклеиновых кислот и образованию стабильных комплексов, известных как поликомплексы, которые защищают нуклеиновые кислоты от ферментативного расщепления [310]. Более того, физико-химические свойства хитозана, такие как его молекулярный вес и степень деацетилирования, могут быть изменены для оптимизации его способности к связыванию и эффективности трансфекции [313]. pH среды также играет ключевую роль, поскольку хитозан более положительно заряжен в кислых условиях, что усиливает его взаимодействие с нуклеиновыми кислотами [314].

Векторы на основе хитозана могут быть дополнительно функционализированы с помощью специфических лигандов, таких как пептиды или антитела, для достижения клеточно-специфичной доставки. Этот целенаправленный подход может значительно улучшить терапевтические результаты, обеспечивая накопление в целевых клетках или тканях с минимальными побочными эффектами [310].

Полимерные векторы, такие как PEI, хитозан и полимерные мицеллы, сталкиваются с несколькими общими проблемами при доставке нуклеиновых кислот. Стабильность является первостепенным требованием к системам доставки, поскольку эти векторы должны защищать нуклеиновые кислоты от ферментативной деградации и обеспечивать их целостность до тех пор, пока они не достигнут целевых клеток [299]. Поглощение клетками определяется размером и свойствами поверхности векторов, которые могут влиять на их способность проникать через клеточные мембраны [315]. Направленное воздействие на конкретные клетки без воздействия на другие требует функционализации векторов, что является не простой задачей как в плане выбора подходящего лиганда, так и в плане его

присоединения к полимеру [316]. Обеспечение выхода комплексов из эндосом критично для высвобождения нуклеиновых кислот в цитоплазму, однако достижение этого эффекта без сопутствующей цитотоксичности является пока нерешенной задачей [267]. Эти проблемы подчеркивают необходимость продолжения исследований и инноваций в области разработки средств доставки для ТНК терапии.

1.2.2.3 Векторы на основе пептидов

Векторы на основе пептидов представляют собой многообещающий инструмент для доставки терапевтических нуклеиновых кислот, таких как siРНК, мРНК и плазмидная ДНК (pDNA), в клетки [317].

Примеры векторов на основе пептидов включают в себя пептиды, проникающие в клетки (CPP), которые представляют собой короткие пептиды, способствующие транспорту ТНК через клеточные мембраны, такие как пептид Tat из ВИЧ-1 и пенетрантин [318]. Пептидные наночастицы образуются в результате самоорганизации пептидов и могут инкапсулировать НК для доставки. Примером служит использование модифицированного гистидином аргинин-богатого CPP для образования стабильных комплексов с pDNA [319].

Конструирование векторов на основе пептидов обычно включает выбор последовательности, способной эффективно транслоцироваться через клеточные мембраны и защищать ТНК от деградации [320]. Химический синтез пептидов на твердой фазе, где аминокислоты добавляются последовательно к растущей цепи хорошо отработан [321]. Наночастицы, содержащие синтезированные пептиды в комплексе с ТНК, могут быть получены путем ковалентного присоединения или не ковалентных взаимодействий [322].

Векторы на основе пептидов входят в клетки через различные механизмы, такие как эндоцитоз [278] или прямая транслокация, при которой вектор преодолевает клеточную мембрану напрямую, возможно, через образование временных пор [323].

Токсичность векторов на основе пептидов обычно низка по сравнению с вирусными векторами, хотя некоторые пептиды могут быть токсичны при высоких концентрациях или если они взаимодействуют с клетками или тканями вне целевого объекта. Биоинформатические инструменты, такие как ToxIBTL и ToxinPred, были разработаны для предсказания токсичности пептида [324].

Несмотря на их потенциал, с векторами на основе пептидов связано несколько проблем, таких как их нестабильность в биологических жидкостях из-за активности протеаз. Более того, обеспечение эффективной доставки в клетки-мишени и успешное

высвобождение ТНК по-прежнему остается проблемой, как и обеспечение направленного действия вектора на конкретные типы клеток или тканей [317].

1.2.2.4 Неорганические векторы

Неорганические векторы представляют собой класс невирусных векторов, используемых для доставки нуклеиновых кислот и предлагающих альтернативу органическим или вирусным векторам [325]. Они особенно отличаются своей устойчивостью, способностью защищать нуклеиновые кислоты от деградации и потенциалом для целевой доставки. Среди основных типов наиболее изученных неорганических векторов следует отметить золотые наночастицы (AuNPs), которые широко исследуются для доставки генов из-за их биосовместимости и легкости функционализации [326]. Кремнеземные наночастицы известны своей пористой структурой, которая позволяет им нести высокую загрузку нуклеиновыми кислотами [327]. Магнитные наночастицы могут быть использованы для целевой доставки генов под воздействием внешнего магнитного поля [328]. И, наконец, квантовые точки, которые являются полупроводниковыми наночастицами, могут быть использованы для отслеживания доставки нуклеиновых кислот [329]. Неорганические векторы обладают таким преимуществом, как устойчивость, потому что неорганические векторы более стабильны, чем органические векторы, и менее вероятно разрушаются в биологических средах [330]. Другим преимуществом является контролируемое высвобождение полезной нагрузки в определенных местах или в ответ на определенные стимулы [331]. Возможность направленной доставки может быть реализована с помощью лигандов, направленных на определенные типы клеток или тканей [331]. Некоторые неорганические материалы могут проявлять токсичность, что является значительной проблемой для клинических применений. Кроме того, важным аспектом является способность организма выводить эти материалы после того, как они доставили свою полезную нагрузку. Обеспечение стабильности производства, гарантирующее однородный размер, форму и поверхностные свойства, является важным для воспроизводимости и безопасности [332]. Неорганические векторы изучаются для различных терапевтических применений, включая лечение рака, доставку вакцин и генное редактирование. Их уникальные свойства делают их подходящими для сложных задач доставки, которые другие векторы не в состоянии выполнить [261,332].

1.3 Химические модификации терапевтических нуклеиновых кислот

Терапевтические нуклеиновые кислоты, такие как антисенс-олигонуклеотиды, siРНК, иммуностимулирующие РНК и аптамеры, показали большой потенциал в лечении и диагностике [333]. Однако их применение часто ограничивается такими факторами, как деградация нуклеазами, быстрое почечное выведение и недостаточная эффективность связывания [16,333]. Для преодоления этих проблем применяются различные химические модификации для улучшения их стабильности, аффинности связывания и общей терапевтической эффективности [334].

Некоторые из ключевых химических модификаций, применяемых к терапевтическим нуклеиновым кислотам, включают модификации азотистых оснований, которые могут усилить аффинность и специфичность связывания нуклеиновых кислот с их мишенями [335]. Наиболее часто модификации включают введение галогенов, алкильных групп или других функциональных групп в азотистые основания [336].

Модификации оснований в терапевтических нуклеиновых кислотах используются для предотвращения развития под их действием иммунного ответа, что является критическим параметром при разработке средств терапии [333,337,338].

Один из подходов заключается в использовании модифицированных нуклеотидов, которые менее вероятно будут распознаны PRR. Например, включение псевдоуридина вместо уридина может снизить активацию толл-подобного рецептора 7 типа (TLR7) [12], сенсора одноцепочечной РНК. Аналогично, замена цитозина на 5-метилцитозин может уменьшить ответ от TLR9, который обычно распознает неметирированные мотивы CpG, распространенные в бактериальной и вирусной ДНК [32,339]. Тщательный выбор модификаций азотистых оснований в составе терапевтических мРНК является ключевым для баланса терапевтической эффективности с минимизацией нежелательной активации иммунитета [335,340].

Модификации 2'-F и 2'-ОМе широко используются в качестве модифицирующих групп для защиты 2'-позиции рибозы [341]. Модификация 2'-F остатка рибозы в siРНК является хорошо изученным подходом для увеличения ее стабильности и эффективности [342]. Электроотрицательный атом фтора может имитировать стерические и электронные свойства гидроксильной группы, предотвращая действие рибонуклеаз и сохраняя биологическую активность ТНК [343]. Однако количество таких модификаций в siРНК ограничено: чтобы исключить побочные эффекты, которые могут быть связаны с накоплением модифицированных молекул в ядре клетки [344], их используют только в критически необходимых позициях, где другие модификации оказывают неблагоприятное

воздействие на функцию [345]. Другой вариант модификации включает в себя введение групп 2'-ОМе. Эта модификация встречается в природных РНК, таких как эпигенетическая модификация рибосомной РНК [346]. Эти модификации стратегически направлены на подавление иммунного ответа и повышение устойчивости к эндорибонуклеазам, сохраняя при этом функцию индуктора РНК интерференции [347]. Интересно, что олигорибонуклеотиды, содержащие остатки 2'-О-метиладенозина, обладают способностью активно блокировать выделение IFN- α , индуцированное другими иммуностимулирующими РНК [348]. Такая модификация не мешает связыванию с PRR, но предотвращает его активацию и, таким образом, блокирует рецептор от взаимодействия с другими агонистами.

Фосфотиоатная модификация (PS) является широко используемой модификацией для увеличения стабильности не только siРНК, но и АСО [349]. Эта химическая модификация включает замещение одного из атомов кислорода в фосфатной группе РНК на атом серы. Введение связей PS в siРНК может значительно увеличить ее устойчивость к деградации нуклеазами *in vivo*, что является общей проблемой для РНК-содержащих терапевтических средств [350]. Модификации PS, при использовании в больших количествах, могут вызывать токсические побочные эффекты из-за взаимодействия с белками сыворотки; [351] однако siРНК с ограниченным количеством модификаций PS (по две на каждом конце) демонстрируют благоприятный профиль безопасности [234].

Защита 3' и/или 5' концов инвертированными тимидинами или введением апуринического сайта, может предотвратить деградацию экзонуклеазами [340]. Наконец, конъюгация с другими молекулами, такими как холестерин, липиды или другие специфические или просто липофильные лиганды, может облегчить клеточное поглощение, улучшить распределение в тканях, дополнительно модулируя иммунный ответ [340,352]. Конъюгация холестерина с терапевтическими РНК, такими как siРНК, является стратегией, используемой для продления ее циркуляции в кровотоке, тем самым улучшая доставку в клетки-мишени и повышая эффективность терапии на основе siРНК [353,354]. Холестерин является липофильной молекулой и может быть конъюгирован с siРНК для улучшения ее фармакокинетических свойств благодаря образованию комплексов холестерина с сывороточными липопротеинами [32]. Эти комплексы предотвращают быстрый почечный клиренс siРНК и продлевают ее циркуляцию в кровотоке [32]. Кроме того, липофильная природа холестерина способствует взаимодействию siРНК с липидными мембранами, облегчая их внутриклеточный захват [355,356]. Следовательно, холестерин-модифицированные siРНК проявляют улучшенные профили биораспределения в

организме, обеспечивая более эффективное направленное воздействие на ткани и клетки [32].

Эти достижения в химии нуклеиновых кислот прокладывают путь для создания более эффективных и безопасных терапевтических нуклеиновых кислот, способных точно контролировать иммунный ответ для лечения различных заболеваний без нежелательных побочных эффектов в виде острого воспаления или аутоиммунных реакций.

Заключение

ТНК представляют собой новый перспективный класс лекарственных средств, отличающийся низкой токсичностью и высокой специфичностью действия, которая обеспечивается их способностью специфически распознавать молекулы-мишени и специфически взаимодействовать со специфическими белками, имеющими разные функции. Способность НК активировать иммунную систему может рассматриваться как нежелательное побочное действие в случае ТНК, направленных на ген-специфический эффект, однако она может использоваться целенаправленно использоваться для достижения терапевтических эффектов при лечении опухолевых и инфекционных заболеваний, а также для преодоления иммунодефицитных состояний и в качестве адъюванта. Преимуществом использования ИНК является то, что механизм их действия заключается в активации собственной защитной системы организма и не требует идентификации специфических молекулярных мишеней, для каждого конкретного заболевания, что позволяет применять их при широком круге патологий. Новые стратегии, сочетающие иммуностимулирующие НК с традиционными препаратами в сочетании с комбинированной терапией, показывают обнадеживающие результаты, несмотря на их ограниченную эффективность и побочные эффекты. Проводятся доклинические и клинические эксперименты по изучению определенных нуклеиновых кислот, таких как поли(I:C) и CpG-ODN. Хотя модифицированные версии этих соединений демонстрируют улучшенные качества, необходимы дополнительные исследования, чтобы перенести эти достижения из лабораторных исследований в фармацевтические препараты для клинического использования.

Основные проблемы, которые требуют решения для создания на основе ИНК лекарственных препаратов, являются общими для всех ТНК: это проблема доставки к клетки-мишени, обеспечение стабильности к ферментативной деградации, а также вопросы специфичности и безопасности применения. Все больше публикаций сообщают об использовании различных иммуностимулирующих нуклеиновых кислот в иммунотерапии

и накопленные данные показывают, что использование разных систем доставки приводит к разным ответам.

Важным направлением текущих исследований является влияние химических изменений на неспецифические иммуностимулирующие возможности терапевтических РНК, таких как вакцинные мРНК и миРНК. Эти исследования направлены на улучшение специфичности действия, снижение токсичности препаратов на основе нуклеиновых кислот и минимизацию непреднамеренной активации врожденного иммунитета и связанных с ней неспецифических последствий. Несмотря на то, что иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты интенсивно исследуются как возможные терапевтические агенты, противоположная задача — поддержание иммуностимулирующей активности иммуностимулирующих РНК и ДНК — вообще остается вне поля зрения исследователей.

Согласно растущему массиву данных, немодифицированные дуплексы siРНК могут активировать врожденный иммунный ответ млекопитающих и вызывать высвобождение интерферонов и воспалительных цитокинов. Популяции иммунных клеток, активируемые сигнальными каскадами Toll-подобных рецепторов, являются основными медиаторами этого процесса. Тем не менее, эти дуплексы изменяют глобальный профиль экспрессии генов даже в неиммунных клетках, влияя на транскрипцию, трансляцию, пролиферацию и другие клеточные процессы. Комплексный анализ подчеркивает важность структурных характеристик и специфичности последовательности в контроле иммуногенности siРНК и других ТНК, одновременно подчеркивая необходимость оценки возможности возникновения побочных эффектов и определения их влияния на развитие патологии.

Таким образом, решение задач, поставленных в настоящей работе, являются важным и необходимым этапом создания на основе исРНК прототипа лекарственного препарата нового типа с улучшенными свойствами.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1. Материалы

2.1.1. Реактивы и препараты

В исследовании были использованы: Ficoll Paque Plus (плотность 1.077 г/мл; GE Healthcare, Иллинойс, США), среда RPMI 1640 (Thermofisher, Массачусетс, США), бычья эмбриональная сыворотка (FBS) (HyClone, GE Healthcare, Иллинойс, США), наборы ИФА для человеческого IFN- α , TNF- α и IL-6 (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия), среда DMEM (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США), 1% раствор антибиотиков-антимикотиков (MP Biomedicals, Калифорния, США), среда IMDM (Sigma-Aldrich, Миссури, США), водорастворимый тетразолий WST-1 (Roche, Базель, Швейцария), TrypLE (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США), фосфатный буферный раствор (PBS), TRIzol (Invitrogen, США), M-MuLV-RN ревертаза для синтеза cDNA (Biolabmix, Новосибирск, Россия), мастер-микс HS-qPCR ($\times 2$) (Biolabmix, Новосибирск, Россия), набор антител Mouse interferon alpha 2 matched antibody pair kit (ab215409, Abcam, Кембридж, Великобритания), панель воспаления LEGENDplexTM Mouse (13-plex) (Biolegend, Сан-Диего, Калифорния, США), среда OptiMEM (Invitrogen, Массачусетс, США), 10% формалин нейтральный буферированный (BioVitrum, Москва, Россия), парадоксин HISTOMIX (BioVitrum, Москва, Россия), блеомицин (B5507, Sigma-Aldrich, США), липополисахарид (055:B5, Sigma-Aldrich, США). Иммуноферментный анализ (ELISA) (Mouse IL-6-Interleukin 6- ELISA kit, Elabscience, Китай), иммуноферментный анализ Mouse TNF- α (Biolegend, Сан-Диего, Калифорния, США), набор антител Mouse interferon alpha 2 matched antibody pair kit (Elabscience, Техас, США), набор для подсчета клеток ССК-8 (Nanjing Vazyme Biotech, Нанкин, КНР). Для культивирования и работы с клетками использовали одноразовый пластик фирмы "Costar" и "TPP" (Sigma, Aldrich. США). Для приготовления всех растворов использовали деионизированную воду MilliQ.

2.1.2. Оборудование

В работе были использованы: центрифуги "MiniSpin Plus Eppendorf", "Eppendorf 5810R", "Eppendorf 5415R" (Eppendorf, Германия), амплификатор в режиме реального времени "iCycler iQ5" (Bio-Rad, США), счетчик клеток и анализатор их жизнеспособности "TC20" (Bio-Rad, США), проточный цитофлуориметр "Novocyte" (ACEA Bio-sciences, Inc., США), инвертированные микроскопы "Биолам П2-1" (ЛОМО, Россия) и "Primo Vert", "Axiostar Plus" (Ziess, Германия), камера "Axiocam MRc5" (Ziess, Германия), Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, Великобритания), микротом Microm HM 355S

(Thermo Fisher Scientific, Волтем, МА, США), мультканальный фотометр Multiskan RC (Labsystems, Вантаа, Финляндия), CO₂ инкубатор (Binder, Германия). Для обработки полученных результатов использовали следующее специальное программное обеспечение: Adobe Photoshop CC 2018 (19.1.1), Bio-Rad iQ5 v. 2.0, Graphpad prism 9.5.1 (GraphPad Software, Inc., Калифорния, США) и Microsoft Excel 2019 (Microsoft Corporation, Redmond, США).

2.1.3. Олигонуклеотиды

Олигорибонуклеотиды и их аналоги (таблица 5) были синтезированы фосфорамидным методом на автоматическом синтезаторе ASM-800 (Biosset, Новосибирск, Россия) к.х.н. М. И. Мещаниновой (ЛХРНК ИХБФМ СО РАН). При синтезе использовали реагент серосодержащий II, 2'-О-защищенные TBDMS, 2'-F-, 2'-ОМе-рибофосфорамидиты, полимерные носители CPG с прикрепленным первым нуклеозидом и 3'-РТ-аминомодификатор C6 CPG (Glen Research, Стерлинг, Вирджиния, США). Связанные с холестерином исРНК получали с использованием полимерного носителя, модифицированного холестерином, синтезированным по аналогии с [357]. ИсРНК-конъюгаты, содержащие остаток холестерина с гексаметиленовым связующим на 5'-конце, были получены по аналогии с [358]. После стандартной депротекции целевые продукты были выделены методом препаративного гель-электрофореза в 15% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях, за которым последовала элюция продуктов с помощью 0.3 М NaClO₄. Полученные продукты были очищены на картридже Sep-Pac C18 (Waters, Милфорд, Массачусетс, США) или Amicon Ultra 3K (Millipore, Берлингтон, Массачусетс, США) и осаждены с использованием раствора 2% NaClO₄ в ацетоне. ИсРНК (50 мкМ) сплавляли в буфере 30 мМ HEPES-КОН (pH 7.4), 100 мМ ацетат натрия и 2 мМ ацетат магния. Образование дуплексов осуществляли путем нагрева при 90°C в течение 5 минут, за которым следовало постепенное охлаждение до комнатной температуры. После этого приготовленные исРНК хранили при температуре -20°C до использования.

Таблица 5. Последовательности исРНК и ее модифицированных аналогов

Обозначение	Последовательность ¹	
	Первая цепь	Вторая цепь
N	GUGUCAGGCUUUCAGAUUUUUU'	AAAUCUGAAAGCCUGACACUUU
M	GUGUC m AGGCUUUC m AGAUUUUUU	AAAUCU m GAAAGCCU m GACACUUU
F1	GU f GUC f AGGCUUUC f AGAUUUUUU	AAAUCU f GAAAGCCU f GAC f ACUU f A
F2	GUGUC f AGGCUUUC f AGAUUUUUU	AAAUCU f GAAAGCCU f GACACUUU

F2_S	GsUsGUCfAGGCUUUCfAGAUUUUsUsU	AsAsAUCUfGAAAGCCUfGACACUsUsU
F2_S3	GUGUCfAGGCUUUCfAGAUUUUsUsU	AAAUCUfGAAAGCCUfGACACUsUsU
F2_S5	GsUsGUCfAGGCUUUCfAGAUUUUUU	AsAsAUCUfGAAAGCCUfGACACUUU
F2_SM	GUGUCfAGGCUUsUsUCfAGAUUUUUU	AAAUCUfGAsAsAGCCUfGACACUUU
Ch-F2	Ch-GUGUCfAGGCUUUCfAGAUUUUUU	Ch-AAAUCUfGAAAGCCUfGACACUUU
Ch-F2_S3	Ch-GUGUCfAGGCUUUCfAGAUUUUsUsU	Ch-AAAUCUfGAAAGCCUfGACACUsUsU
F2-NH2	GUGUCfAGGCUUUCfAGAUUUUUU-NH2	AAAUCUfGAAAGCCUfGACACUUU-NH2
F2-Ch	GUGUCfAGGCUUUCfAGAUUUUUU-Ch	AAAUCUfGAAAGCCUfGACACUUU-Ch
Ch-N	Ch-GUGUCAGGCUUUCAGAUUUUUU	Ch-AAAUCUGAAAGCCUGACACUUU

¹Последовательности представлены в направлении 5'-3': **Cm**, **Um** - модифицированные нуклеотиды 2'-О-метила; **Cf**, **Uf** - модифицированные нуклеотиды 2'-фтора; **s** - модификация фосфоротиоата; **Ch** - холестерольный остаток, прикрепленный к 5' или 3' концу первой и второй цепи через гексаметилендиаминовый или сериоловый связующий соединитель, соответственно; **NH2** - гексаметиленамин. Обозначения цепочек содержат указания на состав включенных в них модификаций; N, M, F1 и F2 обозначают, соответственно, немодифицированные, 2'-ОМе и 2'-Ф (шаблоны F1 и F2); модификации 5'-концевых нуклеотидов указаны слева от обозначения (Ch-); модификации 3'-концевых нуклеотидов указаны справа (-Ch, -NH2); модификации фосфатной группы указываются через подчеркивание и указывают на их расположение в 5'- (S5), 3'- (S3) и средней (SM) позициях. Далее дуплексы представлены в виде 1 цепь/2 цепь.

Олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы в лабораториях медицинской химии ИХБФМ СО РАН с помощью стандартного фосфитамидного метода и выделены с помощью обращено-фазовой ВЭЖХ. Последовательность праймеров для указаны в Таблице 6.

Таблица 6. Праймеры, используемые для RT-qPCR.

Ген	Праймер/зонд	Sequence 5'–3'
<i>Pkr</i>	зонд	((5,6)-FAM)-ATATAACACGGAGAAGGCGGAGCAC-BHQ1
	прямой	TGGCTTAGGTGGATTTGGTC
	обратный	GTTGACGTGATTGAGTTCTGC
<i>Tbp</i>	зонд	5'-((5,6)-FAM)-CACTCCTGCCACACCAGCTTCT-BHQ1
	прямой	CACCAATGACTCCTATGACCC
	обратный	CAAGTTTACAGCCAAGATTACG

2.1.4. Липосомы

Использовании в исследовании липосомы предоставлены проф., д.х.н. М. А. Масловым (Институт тонких химических технологий имени Ломоносова, Москва, Россия).

Все липосомы были приготовлены методом гидрирования тонкой пленки липидов [359]. Кратко, раствор поликатионического липида 1.26-бис(холест-5-ен-3 β -илоксикарбониламино)-7.11.16.20-тетразагексакозана тетрагидрохлорида (2X3) [360] в смеси CHCl_3 - CH_3OH (1:2 объемно) добавляли к раствору 1.2-диолеил-сн-глицеро-3-фосфоэтаноламина (DOPE, Avanti Polar Lipids, США) в CHCl_3 в мольном соотношении 1:1 и аккуратно перемешивали. Для получения вариантов липосом, раствор одного из липоконъюгатов (F12) [361], P800, P1500, P2000 [37], diP800, diP1500, diP2000, 2% или 4% мольный) в CHCl_3 - CH_3OH (1:1) добавляли к смеси 2X3-DOPE, и органические растворители удаляли в вакууме. Полученную липидную пленку сушили в течение 4 ч при давлении 0.1 Торр для удаления остаточных органических растворителей и гидратировали в деионизированной воде (MilliQ, США) при 4 °C в течение ночи. Полученную дисперсию обрабатывали ультразвуком в течение 15 мин при 70–75 °C в ультразвуковой ванне (Bandelin Sonorex Digitec DT 52H, Германия), продували аргоном и хранили при 4 °C. В полученных препаратах концентрация катионного липида 2X3 составляла 1 мМ.

2.1.5. Лабораторные животные

В работе использованы 10–14-недельные самки мышей линий СВА и СBL57/6. разведенных в виварии Института химической биологической медицины Сибирского отделения Российской академии наук. Мыши содержались в виварии при естественном свете и получали стандартное лабораторное питание (GOST (Государственный стандарт) Р 5025892) в соответствии с международными рекомендациями, изложенными в Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных исследованиях (1997 год). Все экспериментальные процедуры соблюдали требования, предусмотренные российскими государственными стандартами (Р 51000.3-96 и 51000.4-96) для лабораторной практики в клинических исследованиях. Этическое одобрение для экспериментальных протоколов было получено от Комитета по этике экспериментов на животных при Институте цитологии и генетики СО РАН (протокол № 51 от 23 мая 2019 года).

2.1.6. Клеточные культуры

Клетки меланомы B16 были получены из Национального медицинского исследовательского центра имени Н. Н. Блохина в Москве, Россия. Клетки выращивали в среде Игла с модификацией Дульбекко (DMEM), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS) и 1% раствором антибиотиков-антимикотика. Культуры поддерживали во влажной среде с содержанием 5% CO_2 /95% воздуха при 37°C, с регулярным пассированием

для поддержания экспоненциального роста. Клетки лимфосаркомы мыши RLS40, обладающие фенотипом множественной лекарственной устойчивости и растущие в присутствии 40 нМ винбластина, были получены в Институте Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН [362].

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) были выделены из венозной крови здоровых доноров, полученной в Национальном медицинском исследовательском центре имени Е. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия, с предоставлением информированного согласия.

2.2. Методы

2.2.1. Приготовление комплексов исРНК/липосомы

Для подготовки комплексов исРНК/липосом использовались исРНК и липосомы в соотношении N/P 6/1 в сывороточной безсывороточной среде OptiMEM (Invitrogen, Waltham, MA, США). Раствор исРНК с конечной концентрацией 3.5 мкМ и раствор липосом с конечной концентрацией 150 мкМ смешивали в равных пропорциях и инкубировали при 24 °C в течение 20 минут. Размер частиц и зета-потенциал измеряли с использованием Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, Великобритания). Средний гидродинамический диаметр был получен из распределений числа частиц; измерения повторяли три раза.

2.2.2. Индуцирование фиброза лёгких с помощью БЛМ и ЛПС у мышей

Мыши (n = 5 в каждой группе) были подвергнуты вызову BLM (B5507, Sigma-Aldrich, США) или LPS (055: B5, Sigma-Aldrich, США). BLM вводился однократно в дозе 5 U/kg интраназально (i.n.). LPS вводился один раз в дозе 5 мг/кг интраперитонеально (i.p.) в день 0, в профилактической схеме (П.с) в -1 день внутривенно вводили только исРНК/липосомы или липосомы, в терапевтической схеме (Т.с) - в -1 день и на 2 день после введения LPS/BLM. Все интраназальные введения проводились под наркозом изофлюрана. На 14-й и 28-й день после индукции мыши были усыплены, и лёгочные ткани были собраны для гистологического анализа.

2.2.3. Измерения массы тела

Изменения массы тела после индукции воспаления отслеживали через день на протяжении 28-дневного экспериментального периода для всех экспериментальных групп, а также для контрольной группы и группы здоровых мышей. Собранные данные использовали для построения линий тренда с использованием Microsoft Excel.

2.2.4. Культура клеток PBMC и трансфекция исРНК

Венозную кровь получали от здоровых доноров в Национальном медицинском исследовательском центре имени Е. Мешалкина Минздрава России. Новосибирск. Россия. Периферические мононуклеарные клетки крови человека (PBMC) выделяли с использованием Ficoll Paque Plus (плотность 1.077 г/мл; GE Healthcare. IL. США) в соответствии с инструкциями производителя. Обогащенную популяцию моноцитов выделяли путем адгезии к пластиковой поверхности. После 4-часового инкубирования при 37 °C в атмосфере 5% CO₂/95% воздуха неадгезивные клетки удаляли многократным осторожным промыванием средой. Клетки пересаживали в 24-луночные планшеты (5 × 10⁴ клеток на лунку) в дубликатах и оставляли на 24 часа в среде RPMI 1640 (ThermoFisher. MA. США), дополненной 10% FBS. Затем клетки трансфектировали комплексами исРНК/липосомы, приготовленными как описано выше. конечная концентрация исРНК 100 нМ исРНК составляла 100 нМ. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂/95% воздуха. культуральную среду собирали через 6, 16 и 24 часа после трансфекции и хранили при -80°C.

2.2.5. Анализ уровней цитокинов в БАЛЖ мышей и культуральной среде

Бронхоальвеолярная жидкость (БАЛЖ) была получена к. м. н. А. В. Сеньковой. анализ уровней интерлейкина 6 (IL6) и фактора некроза опухолей альфа (TNFα) выполняли с использованием иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием коммерческих наборов (ELISA Mouse IL-6 и ELISA Mouse TNF-α Elabscience. Китай) в соответствии с руководством производителя. пределы обнаружения составляли от 31.25 до 2000 пг/мл

Уровни IFN-α, TNF-α и IL-6 в культуральной среде клеток PBMC измеряли с помощью наборов ELISA (Vector-Best. Новосибирск. Россия). Анализ проводился в соответствии с протоколами, предоставленными производителем.

Показания поглощения регистрировали при 450 нм с использованием планшетного сканера Multiscan RC (Thermo LabSystems. Хельсинки. Финляндия). Изменения проводили в двух повторах для всех образцов.

2.2.6. Анализ уровней IFN-α в крови мышей

Мышам СВА ($n = 3$) внутривенно вводили 10 μg (750 нмоль) исРНК в комплексе с 47.25 н. моль катионных липосом при соотношении N/P 6/1. либо только липосомы в 200 μl стерильной среды OptiMEM. Кровь собирали через 6 часов из ретроорбитального синуса и использовали для получения сыворотки путем свертывания тромба в течение 30 мин при 37 °C и последующего центрифугирования. Уровни IFN-α измеряли методом ELISA с использованием набора антител Mouse interferon alpha 2 matched antibody pair kit (ab215409. Abcam. Cambridge. Великобритания) в соответствии с инструкциями производителя. Индивидуальные образцы сыворотки измеряли в двух параллелях.

2.2.7. Профилирование цитокинов

Для количественного определения цитокинов и хемокинов использовали мультиплексную панель воспаления Mouse Inflammation LEGENDplex™ (13-плекс) (Biolegend. Сан-Диего. Калифорния. США) в соответствии с инструкциями производителя. Индивидуальные образцы сыворотки, полученные от мышей СВА, обработанных исРНК/липосомами, анализировали в дубликate. Анализ проводили с использованием поточного цитометра NovoCyte 3000 (ACEA Bioscience. Сан-Диего. Калифорния. США). Данные анализировали с использованием онлайн-программного обеспечения Legendplex и указывались в пг/мл.

2.2.8. Противоопухолевое действие исРНК *in vivo*

Противоопухолевое действие комплексов исРНК/липосомы оценивали на опухолях, образованных клетками лимфосаркомы RLS40 и меланомы B16. Опухоли были инициированы у мышей СВА путем внутримышечной имплантации 10^6 клеток RLS40 в 0.1 мл стерильного физиологического раствора в правое бедро. В случае меланомы, опухоли B16 были инициированы у мышей C57BL/6 путем подкожной имплантации 10^5 клеток B16 в 0.1 мл стерильного физиологического раствора.

После трансплантации мышей случайным образом разделили на 5 групп в соответствии с дальнейшим лечением ($n = 5$ мышей в каждой группе): (1) контрольная группа, мыши получали инъекции OptiMEM (200 мкл на животное); (2) и (3) мыши получали инъекции катионных липосом (2X3-DOPE или P2000) в 200 мкл стерильного OptiMEM на животное; (4) и (5) мыши получали инъекции исРНК/липосом (2X3-DOPE или P2000) в 200 мкл стерильного OptiMEM на животное. Комплексы готовили как описано выше (доза - 10 мкг исРНК на мышшь). Всего было сделано три инъекции с интервалом в 3 дня, начиная с 10-го дня после имплантации опухоли (день 0). Объемы опухолей измеряли

каждые 2 дня с помощью штангенциркуля в слепом порядке. Объемы опухолей рассчитывали по формуле $V = \pi/6 \times \text{длина} \times \text{ширина} \times \text{высота}$. На 21-й день животных усыпляли, затем опухоли, печень и селезенку извлекали и фиксировали в 10% нейтральном буферном формалине для последующего гистологического анализа.

2.2.9. Гистология

Для гистологических исследований использовали фиксированные в 10% нейтральном буферном формалине (BioVitrum, Москва, Россия) печени и селезенки мыши, заключенные в парафин HISTOMIX (BioVitrum, Москва, Россия). Парафиновые срезы (5 μm) были приготовлены с помощью микротомы Microm HM 355S (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) и окрашены гематоксилином и эозином. Все изображения получали на микроскопе Axiostar Plus с цифровой камерой AxioCam MRc5 (Zeiss, Оберкочен, Германия) при увеличении $\times 400$ для печени и $\times 100$ для селезенки.

Морфометрический анализ проводили с использованием сетки подсчета, состоящей из 100 точек в области равной $3.2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$. Анализ селезенки включал оценку объемных плотностей (V_v , %) белой и красной пульпы. Анализ печени включал оценку объемных плотностей (V_v , %) нормальных гепатоцитов, дистрофии и некроза, а также числовую плотность (N_v) бинуклеарных гепатоцитов в паренхиме печени из 10 случайных полей в каждом образце, формируя в общей сложности 50 случайных полей для каждой группы мышей.

2.2.10. Антипролиферативная активность *in vitro*

Клетки высаживали в 96-луночные плоскодонные планшеты (3×10^3 /лунку для B16 и 1×10^3 /лунку для RLS40) в среде без антибиотиков за один день до трансфекции. Клетки на шести планшетах (для каждой линии клеток) трансфектировали в трехкратном повторении 100 нМ исРНК в комплексе с при N/P=6/1 или инкубировали с таким же количеством липосомами в отсутствие исРНК. Ежедневно после трансфекции в каждую лунку одного планшета добавляли по 10 мкл раствора WST-1 (Roche, Базель, Швейцария) с концентрацией 0.5 мг/мл, растворенного в PBS, и клетки инкубировали при 37 °C в CO₂ инкубаторе. Оптическую плотность измеряли через 30 мин, 1, 2 ч спектрофотометрически с использованием Multiscan RC (Labsystems, Вантаа, Финляндия) на длинах волн 450 и 620 нм.

В экспериментах с определением концентрационной зависимости, клетки трансфицировали исРНК с различными концентрациями (25, 50 и 100 нМ), в комплексе с 2X3-DOPE липосомами, или только с липосомами. Через пять дней после трансфекции в

каждую лунку планшета было добавлено 10 мкл 0.5 мг/мл раствора из набора для подсчета клеток ССК-8 (Nanjing Vazyme Biotech. Нанкин. КНР). оптическую плотность измеряли после инкубации в течение 2 часов при 37°C в CO₂ инкубаторе.

2.2.11. Накопление исРНК в клетках

За один день до эксперимента клетки В16 или RLS40 в экспоненциальной фазе роста были посеяны на 48-луночные планшеты с плотностью 4.5×10^4 клеток/лунку. После инкубации в течение 24 часов к клеткам добавляли меченую Cy5.5-исРНК или ее комплексы с липосомами. Через 4 часа после добавления Cy5.5-исРНК клетки В16 открепляли с помощью TrypLE (Thermo Fisher Scientific. США). клетки RLS40 собирали центрифугированием и фиксировали 2% формальдегидом в PBS. Клетки анализировали с использованием поточного цитометра NovoCyte (ACEA Biosciences. Калифорния. США) из каждой пробы анализировалось 8000 клеток. Для анализа данных использовался NovoExpress 1.1.0 (ACEA Biosciences. Калифорния. США).

2.2.12. ОТ-qПЦР

Суммарную РНК выделяли из клеток В16 или RLS40 с использованием реагента TRIzol в соответствии с инструкциями производителя. Синтез кДНК проводили с использованием буфера обратной транскрипции и ревертазы M-MuLV-RH (Biolabmix. Новосибирск. Россия) в соответствии с инструкциями производителя. ПЦР проводили с использованием мастер-микса HS-qPCR (×2) (Biolabmix. Новосибирск. Россия) в соответствии с инструкциями производителя. ПЦР в реальном времени проводили с использованием системы CFX96 (Bio-Rad Laboratories Inc. США) в соответствии со следующей схемой: один цикл - 3 мин. 95 °C; 40 циклов - 30 с. 95 °C; 30 с. 58 °C; и 30 с. 72 °C. Все измерения проводились в трехкратном повторе. мРНК гена *Tbp* использовали для нормирования результатов. Последовательности праймеров и проб для *Pkr* и *Tbp* приведены в таблице 6. Относительный уровень экспрессии генов рассчитывали с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX (Bio-Rad Laboratories Inc. США).

2.2.12. Статистический анализ

Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартного отклонения. Статистически значимые различия определяли с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с множественным тестом сравнения Dunnet. Различия считались статистически значимыми при значении $P < 0.05$. В случае *in vivo* экспериментов статистический анализ проводился с использованием непараметрического теста Манна-Уитни для непарных

выборок. Для проведения статистических анализов использовалась программа GraphPad Prism версии 9.5.1 (528) (GraphPad Software. Inc. Калифорния. США).

Главы 3. Результаты и обсуждение

3.1. Влияние исРНК на прогрессирование фиброза, индуцированного блеомицином или LPS на мышинных моделях

Легочный фиброз является хроническим, прогрессирующим заболеванием, включающим большое количество хронических респираторных патологий, сопровождающихся ростом соединительной ткани в различных отделах легких и характеризующихся нарушением архитектуры легких, и дыхательной недостаточностью [363]. Предшествующее воспаление легких, вызванное широким спектром этиологических факторов, включая вирусные и бактериальные инфекции, считается ключевым фактором в возникновении и развитии легочного фиброза [364].

В ответ на повреждение легких или инфекцию макрофаги, первые сторожевые клетки, контактирующие с внешними патогенами, переходят в провоспалительный фенотип M1 и секретируют про- воспалительные цитокины (TNF- α , IL-6 и IL-1) и хемокины (IL-8, CCL7 и CCL2), привлекающие моноциты и нейтрофилы в альвеолярные пространства [365]. В свою очередь, нейтрофилы выделяют многочисленные медиаторы воспаления, активные формы кислорода и протеиназы, разрушающие сурфактант, базальную мембраны и эпителиально-эндотелиальный барьер [366]. Наиболее частый исход острого воспаления – это его успешное разрешение и восстановление измененных тканей. Однако, острое воспаление переходит в хроническое, если этиологический фактор не удастся устранить.

Одним из наиболее опасных последствий хронического воспаления является развитие фиброза, который, по современным представлениям, связан с нарушением регуляции заживления [367]. После повреждения тканей миофибробласты мигрируют к месту повреждения и синтезируют компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ) в ответ на цитокины и хемокины, выделяемые воспалительными и резидентными клетками [368]. После разрешения воспаления и восстановления ткани легких миофибробласты подвергаются устранению путем апоптоза [369]. Однако при хроническом воспалении миофибробласты проявляют устойчивость к индукции апоптоза, вызывая аномальное заживление, гиперпродукцию ВКМ и, как следствие, легочный фиброз [370].

Иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты (ИНК), включая исРНК, могут модулировать фибротический процесс путем стимуляции системы врожденного иммунитета, которая участвует в защите от патогенов и повреждения тканей. Врожденная иммунная система распознает ИНК как сигналы патогенов или опасности и активирует пути, приводящие к экспрессии и секреции интерферонов и цитокинов. Интерфероны

оказывают противовирусное, антипролиферативное и иммуномодулирующее действие [371]. Цитокины регулируют воспаление, рост, дифференцировку и выживание клеток [372]. Некоторые из интерферонов и цитокинов, индуцированных ИНК, включая интерферон гамма (ИФН- γ), интерлейкин 10 (ИЛ-10) и фактор некроза опухоли альфа (TNF- α), обладают антифибротическими свойствами [373].

В ходе исследований, проведенных ранее в нашей лаборатории, исРНК продемонстрировала заметное антипролиферативное действие на раковые клетки, ингибирование роста опухоли, а также иммуностимулирующую и противовирусную активности за счет индукции синтеза цитокинов и интерферонов [38]. Было доказано влияние исРНК на уровни цитокинов, оказывающих как про-воспалительное, так и противовоспалительное действие [16]. Учитывая склонность к повышенному уровню цитокинов во время воспаления, увеличение уровней цитокинов под действием ИНК может вызвать цитокиновый шторм, заканчивающийся аллергическим шоком и представляющий собой угрозу для жизни. С другой стороны, увеличение уровня IFN- α при лечении исРНК открывает перспективные пути для его применения в борьбе с инфекциями и злокачественными новообразованиями [16]. Эти патологии тесно связаны с воспалением и фиброзом, поэтому применение исРНК, влияющего на синтез и секрецию воспалительных медиаторов, а также противовоспалительных и антипролиферативных цитокинов и хемокинов, может оказать как положительное, так и отрицательное воздействие на развитие фибротических изменений в тканях.

исРНК, теоретически, может предотвращать фиброз, активируя врожденную иммунную систему и индуцируя экспрессию антифибротических интерферонов и цитокинов, что может ингибировать фибротический процесс воздействуя на фибробласты и продукцию ими ВКМ. Однако также существуют опасения относительно безопасности применения, которые ограничивают использование ИНК для лечения инфекционных и опухолевых заболеваний, а также для профилактики фиброза, такие как возможное усиление воспаления или токсические эффекты, которые могут усилить развитие фиброза. Поэтому требуется более подробное изучение безопасности ИНК и определение их профилактической и терапевтической значимости.

В настоящее время успешно создан ряд мышинных моделей легочного фиброза. Блеомицин (BLM), противоопухолевый антибиотик, синтезируемый бактериями *Streptomyces verticillus*, и липополисахарид (LPS) – основной компонент наружной мембраны грамотрицательных бактерий являются наиболее часто используемыми индукторами этой патологии [374]. BLM повреждает клетки внося одно- или

двучепочечные разрывы ДНК, приводящие к остановке клеточного цикла и прямому повреждению эпителиальных и эндотелиальных клеток с последующим некрозом или апоптозом, воспалением легких и, как следствие, развитие легочного фиброза [375]. LPS действует как мощный активатор врожденного иммунитета через TLR4-зависимый путь, вызывает местную и системную воспалительную реакцию, что делает эту модель подходит для изучения воспаления легких и связанного с ним фиброза, аналогичного тому, который наблюдается при бактериальных инфекциях [376].

В рамках этого исследования мы оценили влияние применения исРНК в профилактических или терапевтических схемах на развитие фиброза на моделях мышей с фиброзом, индуцированным BLM и LPS.

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

Для доставки исРНК в клетки-мишени мы использовали катионные липосомы (2X3-DOPE), которые состояли из поликатионного амфифила 1,26-бис(холест-5-ен-3-илоксикарбониламино)-7,11,16,20 тетразагексакозана тетрагидрохлорида (2X3) и липида-хелпера диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Эти липосомы проявили способность эффективно доставлять разнообразный набор нуклеиновых кислот как в клеточных моделях (in vitro), так и в живых организмах (in vivo) [377]. Для оценки антифибротического эффекта in vivo предварительно сформированные липоплексы исРНК/2X3-DOPE (в дальнейшем исРНК; см. раздел Материалы и методы) вводили мышам внутривенно по двум разным схемами – профилактической и терапевтической (Рисунок 4).

Профилактическая схема была представлена однократным внутривенным (в/в) введением исРНК за 24 часа до индукции фиброза. Терапевтическая схема включала два в/в введения исРНК через 2 и 7 дней после индукции. Фиброз легких был инициирован однократным интранозальным (и/н) введением BLM в дозе 5 Ед/кг или LPS в дозе 5 мг/кг. В качестве контроля использовались мыши с фиброзом легких без лечения и те, которые получали только 2X3-DOPE. Морфологические изменения в легких оценивали через 28 дней после индукции.

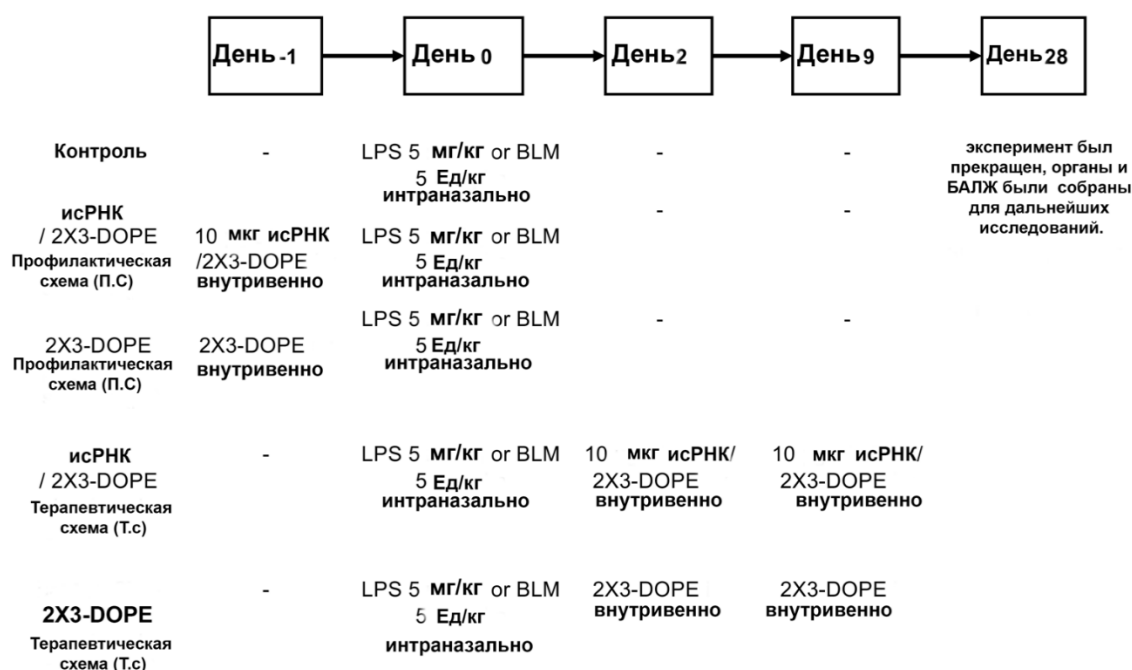


Рисунок 4. Экспериментальная схема. За день до индукции фиброза (день -1) двум различным группам мышей внутривенно вводили по 10 мкг исРНК/2X3-DOPE или 2X3-DOPE (профилактическая схема, П.с.). Затем, в день 0, все экспериментальные группы подвергали индукции фиброза либо липополисахаридом (LPS) в дозе 5 мг/кг интраназально, либо блеомицином (BLM) в дозе 5 Ед/кг интраназально. В терапевтической схеме (Т.с), в дни 2 и 9, две группы мышей получали внутривенно по 10 мкг исРНК/2X3-DOPE или 2X3-DOPE. Эксперимент завершали на 28-й день для оценки прогрессирования фиброза. После завершения проводился гистологический анализ легких и анализ бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ). Измерения массы тела регистрировали через день для всех экспериментальных групп на протяжении всего эксперимента.

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 (Рисунок 5). 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 приростом у здоровой группы. Различия в уровнях IL6 в бронхоальвеолярной жидкости у мышей в конце эксперимента не были значимыми (Рис. 6). Уровни TNF-α в конце эксперимента не превышали 40 пг/мл и не различались значимо между экспериментальными группами (Рис. 7).

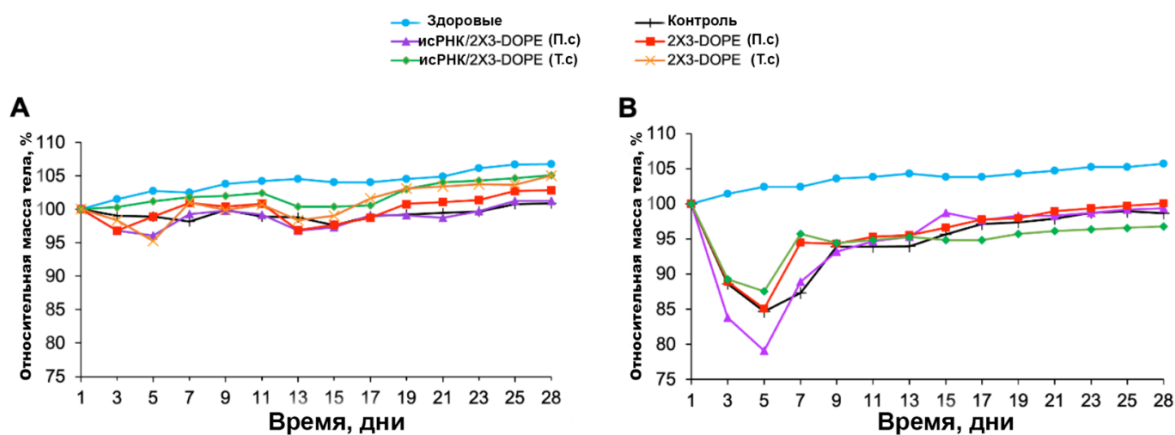


Рисунок 5. Динамика изменения массы тела мышей в течение 28-дневного экспериментального периода после введения BLM (A) и LPS (B). Измерения массы тела проводились через день. Ось у представляет процентное изменение массы тела, рассчитанное как $[(\text{Конечная масса} - \text{Начальная масса}) / \text{Начальная масса}] \times 100$.

Все мыши в группах, получавших LPS, показали резкое снижение относительной массы тела на 3 - 5-й день после введения LPS с частичным восстановлением к 7–9 дню (Рисунок 5B). Однако не было заметно различий в тенденции к восстановлению между экспериментальными группами (как профилактическими, так и терапевтическими) и контрольной группой. Эти результаты указывают на отличие воздействий, вызванных различными агентами. Различия в уровнях IL6 в бронхоальвеолярной жидкости мышей с фиброзом, индуцированным LPS, в конечной точке эксперимента не были значимыми, хотя здесь заметна некоторая тенденция к снижению при использовании исРНК в профилактическом режиме (Рис. 6B). Уровни TNF- α к конечной точке эксперимента практически вернулись к уровням этого цитокина у здоровых животных, не получавших LPS, и не отличались значительно между экспериментальными группами (Рис. 7 B).

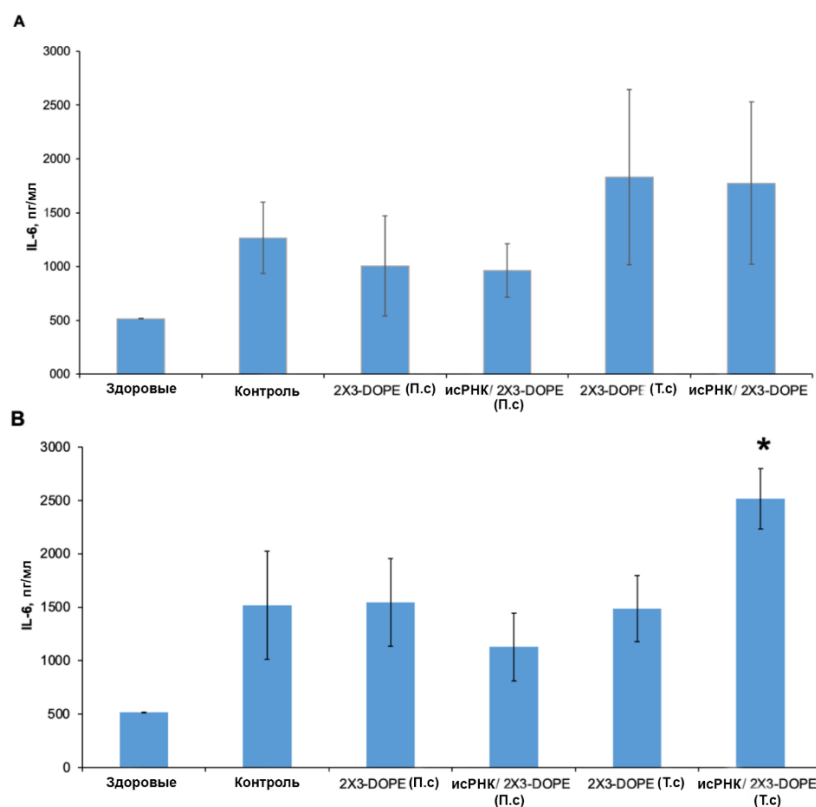


Рисунок 6. Концентрации интерлейкина-6 (IL-6) в БАЛЖ мышей, через 28 дней после индукции BLM (А) и LPS (В). Уровень IL-6 измеряли в дубликатах методом ELISA в образцах, полученных от 4–5 индивидуальных мышей из каждой группы. Представленные значения отображают среднее $\pm$ стандартное отклонение. Статистический анализ проводился с использованием двухстороннего непарного теста Манна-Уитни; звездочка обозначает значимые различия (* $P < 0.05$) между экспериментальной группой и соответствующей контрольной группой.

Гистологическое исследование легких (выполнено к.м.н. А. В. Сеньковой) после окраски по Ван-Гизону подтвердило наличие определенного количества соединительнотканых волокон в нормальной структуре легких (Рис. 8, А). На 28-й день после интраназального введения как BLM, так и LPS воспалительные изменения в легких представлены инфильтрацией легочной ткани лимфоцитами и макрофагами. Последующим исходом воспаления, вызванного в обоих случаях, стало развитие достоверных фиброзных изменений в легочной ткани контрольных мышей, представленных избыточным отложением компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) и расширением волокон соединительной ткани преимущественно вокруг сосудов и бронхов (Рис. 8, В), контроль, черные стрелки).

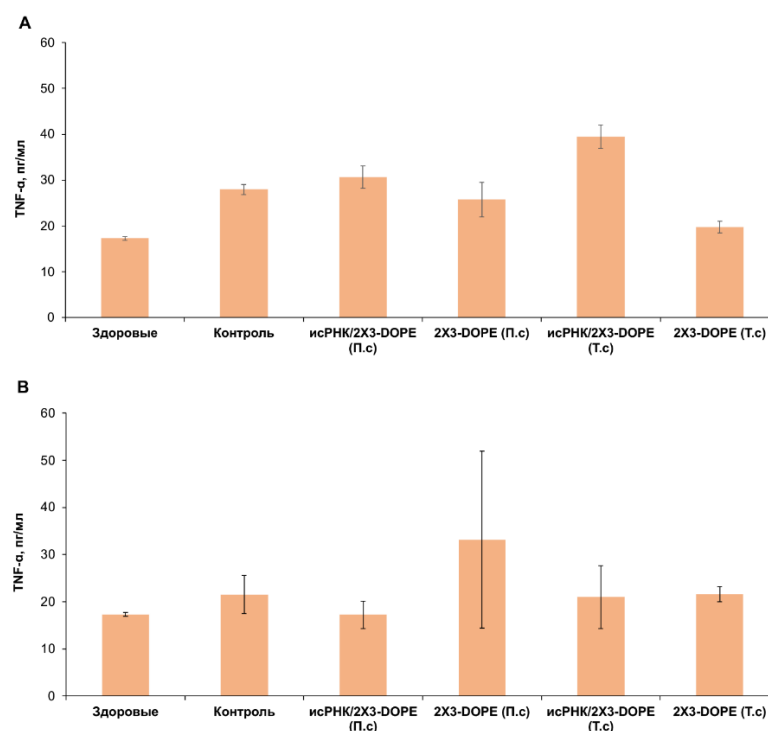


Рисунок 7. Концентрации TNF-α в БАЛЖ мышей, через 28 дней после индукции BLM (А) и LPS (В). Уровень TNF-α измеряли в дубликатах методом ELISA в образцах, полученных от 4–5 индивидуальных мышей из каждой группы. Представленные значения отображают среднее $\pm$ стандартное отклонение.

ИсРНК, введенная в соответствии с профилактической схемой мышам, получавшим BLM, вызвала уменьшение выраженности остаточного воспаления в легких в 1.4 раза по сравнению с контролем и в 1.5 раза по сравнению с 2X3-DOPE, а также снижение интенсивности фиброзных изменений в 1.3 раза по сравнению с контролем и в 1.4 раза по сравнению с 2X3-DOPE (Рис. 8.А). Однако различия не были статистически значимыми и представляли собой лишь положительную тенденцию в отношении патологических изменений в легких, вызванных BLM. Введение исРНК по терапевтической схеме мышам, получавшим BLM, не оказало влияния на воспалительные или фиброзные изменения в легких (Рис. 8В).

ИсРНК, введенная по профилактической схеме мышам, получавшим LPS, вызвала уменьшение воспалительных изменений в легочной ткани в 2 и 1.8 раза по сравнению с контролем и 2X3-DOPE, соответственно, что не было статистически значимым (Рис. 9А). Оценка фиброзных изменений в легких тех же групп показала, что введение исРНК за 24 ч до введения LPS вызвало выраженное, статистически значимое подавление отложения волокон в легочной ткани в 2 и 2.2 раза по сравнению с контролем и 2X3-DOPE, соответственно (Рис. 9В). ИсРНК, применяемая по терапевтической схеме, не влияла ни на воспаление легких, ни на развитие фиброза. Тем не менее, исРНК, используемая по

терапевтической схеме, не усугубляет эти процессы и может быть использован для активации системы врожденного иммунитета для борьбы с инфекционными возбудителями.

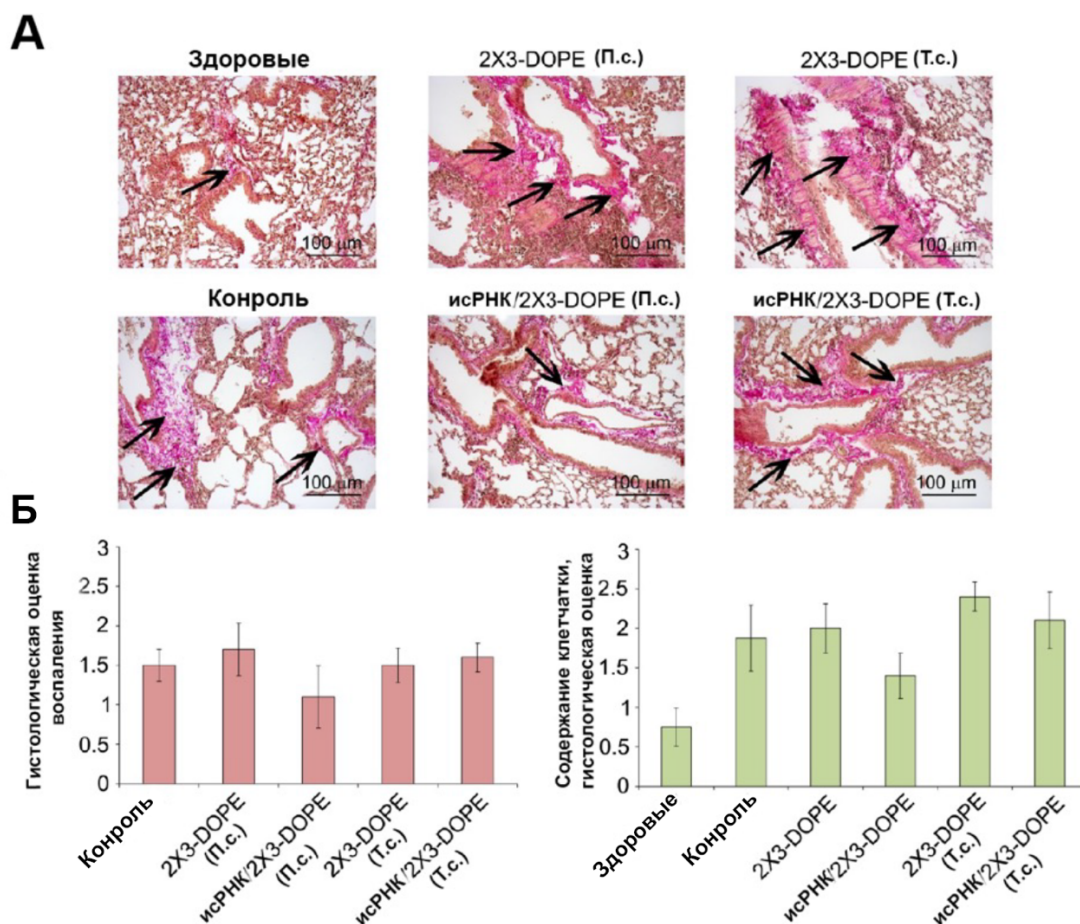


Рисунок 8. Влияние исРНК на воспалительные и фибротические изменения легочной ткани мышей с BLM-индуцированным фиброзом легких. (А) Репрезентативные гистологические изображения срезов легких здоровых мышей и мышей, индуцированных BLM, без лечения и после введения исРНК/2X3-DOPE через 4 недели после индукции. 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.

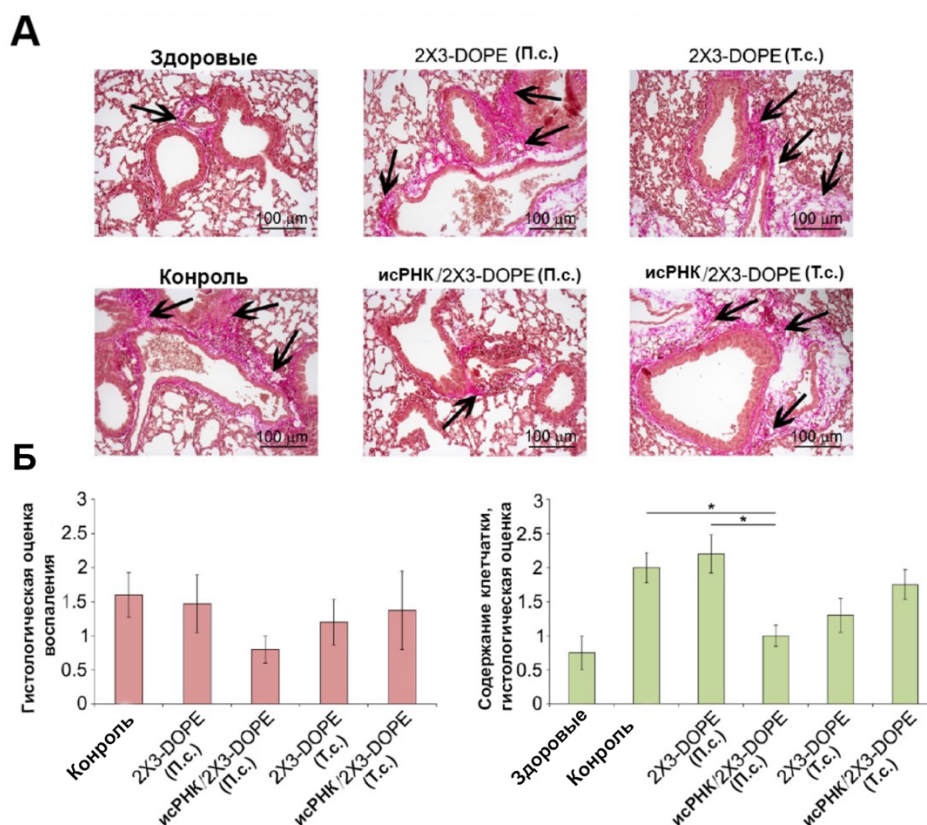


Рисунок 9. Влияние исРНК на воспалительные и фибротические изменения легочной ткани мышей с LPS -индуцированным фиброзом легких. (А) Репрезентативные гистологические изображения срезов легких здоровых мышей и мышей, индуцированных LPS, без лечения и после введения исРНК/2X3-DOPE через 4 недели после 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.

ИНК имеют низкую токсичность и стимулируют врожденный иммунитет организма, воздействуя на естественные механизмы и представляют собой многообещающий класс перспективных препаратов для лечения вирусных и опухолевых заболеваний [3]. Арсенал нуклеиновых кислот, которые напрямую взаимодействуют с компонентами иммунной системы, расширяется благодаря прогрессу в процессах синтеза нуклеиновых кислот и разработке их производных с улучшенными свойствами.

Эффект ИНК зависит от многих факторов, включая их природу, структуру, последовательность, способ доставки и внутриклеточную локализацию. Несмотря на выраженные терапевтически положительные эффекты ИНК, увеличенная секреция ряда

цитокинов может вызывать опасения из-за их потенциально нежелательных эффектов, включая усиление воспаления и индукцию фиброза.

Мы проанализировали цитокины, высвобождаемые в кровь мышей после в/в. введение исРНК в комплексе с катионными липосомами. Установлено, что основными цитокинами, уровни которых значительно повышаются в ответ на исРНК, являются моноцитарный хемоаттрактантный белок 1 (MCP-1) и интерфероны α и γ ; умеренно активируются цитокины IL-6 и IL-10 (Рис. 10), также происходит незначительная активация IL-1 α и TNF- α . Таким образом, среди цитокинов, экспрессия которых стимулируется исРНК, есть как агенты с профибротическим (MCP-1, IL-6, IL-1 α), так и с антифибротическим (интерфероны α и γ , IL-10) или двойным (TNF- α) действием.

Значительная активация экспрессии MCP-1, которая может способствовать развитию фиброза, вызывает наибольшее беспокойство. Было продемонстрировано, что MCP-1 способствует фиброзу почек [378], печени [379] и легких [380] путем рекрутирования моноцитов, участвуя в активации и трансдифференцировке макрофагов. Заметная индукция MCP-1, которая имеет решающее значение как для заживления инфаркта, так и для постинфарктного ремоделирования, наблюдается при инфаркте миокарда [381]. На важные этапы развития фиброза почек может влиять сигналинг IL-6. Было обнаружено, что потеря или ингибирование IL-6 уменьшает фиброз почек [382] и облегчает фиброз легких, вызванный BLM, у мышей [383]. Известно, что в некоторых тканях, включая легкие, семейство цитокинов IL-1 играет важную роль в воспалении и фиброзе [384]. Было продемонстрировано, что у мышей, получавших BLM, наблюдалось увеличение уровня IL-1 α ; и наоборот, у мышей с нокаутом IL-1 α не развивается фиброз легких, индуцированный BLM [385].

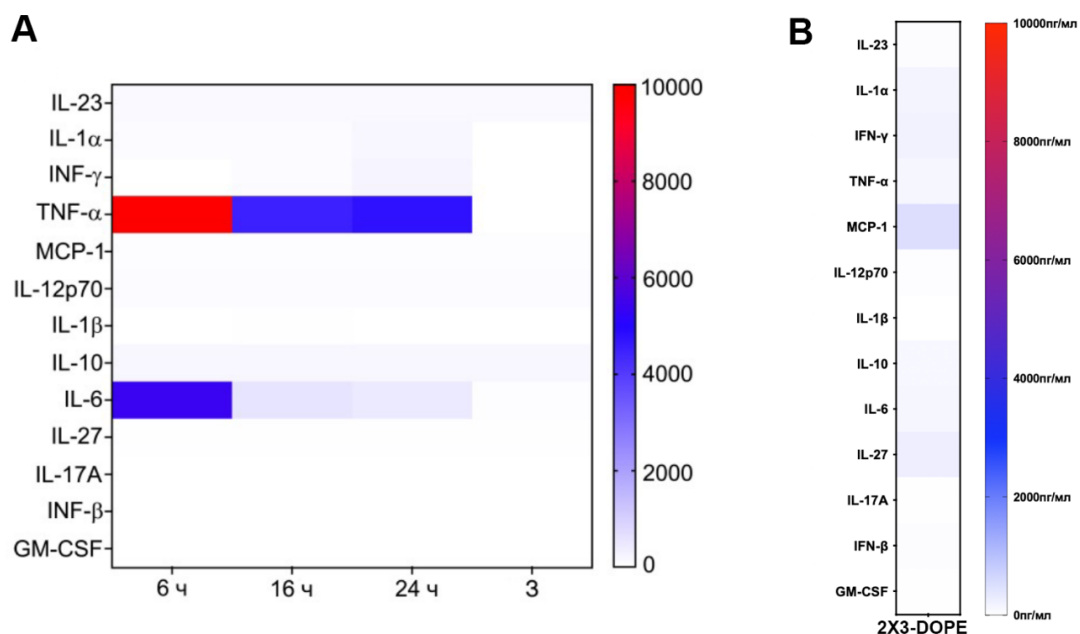


Рисунок 10. Профилирование цитокинов в сыворотке крови мышей СВА после в/в введения комплексов исРНК/2X3-DOPE (А) или после и/н введения ЛПС.

Наши данные показали, что повышение уровня профибротических цитокинов (MCP-1, IL-6, IL-1 α), вызванное воздействием исРНК, не приводит к усилению воспаления или развитию фиброза в легких ни при однократном профилактическом применении, ни при двукратном терапевтическом режиме (Рис. 8, 9). Это указывает на безопасность применения исРНК для лечения опухолей и инфекционных заболеваний. Компоненты химиотерапии, используемые для лечения опухолевых заболеваний, могут повреждать чувствительные, не опухолевые клетки и вызывать последующее развитие фиброза в качестве побочного эффекта химиотерапии [386] (модель фиброза, индуцированного BLM). При инфекционных заболеваниях, как вирусных, так и бактериальных, продукция интерферонов и цитокинов индуцируется самим возбудителем; однако многие патогены имеют приобретенные в процессе эволюции механизмы уклонения от иммунного ответа [387], и в этом случае ИНА могут активировать иммунную систему без нежелательных последствий (модель фиброза, индуцированного LPS).

Молекулы с антифибротическими эффектами (интерфероны α и γ , IL-10) могут оказывать свое действие непосредственно на фибробласты или опосредованно влияя на микроокружение [373]. Так, INF- γ ингибирует дифференцировку фибробластов в миофибробласты и снижает экспрессию белков ВКМ и профибротических факторов, в том числе трансформирующего фактора роста бета (TGF- β) и фактора роста соединительной ткани (CTGF) [388]. Было документально подтверждено, что при идиопатическом фиброзе легких ингаляция аэрозоля интерферона- γ дает хороший терапевтический эффект [389].

Аденоассоциированный вирус, экспрессирующий гамма-интерферон человека, продемонстрировал способность ингибировать прогрессирование фиброза печени при экспериментальном фиброзе *in vitro* и *in vivo* [390]. IL-10 подавляет выработку провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин 1 бета (IL-1 β) и интерлейкин 6 (IL-6), которые могут стимулировать активацию фибробластов и синтез ВКМ [391]. Гидрогель, содержащий IL-10, подавлял выработку коллагена, стимулируемую TGF- β , легочными фибробластами и миофибробластами и уменьшал отложение коллагена на мышинной модели фиброза легких, индуцированного блеомицином [392]. TNF- α индуцирует апоптоз фибробластов и миофибробластов и способствует деградации ВКМ путем активации матриксных металлопротеиназ (ММП) [393]. Согласно недавним исследованиям, лечение фиброзных заболеваний либо напрямую, либо путем воздействия на TNF или его рецепторы может быть многообещающей стратегией [394].

Наши данные показали, что профилактическое лечение исРНК оказало более заметное благоприятное воздействие в случае фиброза, индуцированного LPS, чем в случае фиброза, индуцированного BLM. Наблюдаемое различие потенциально может быть результатом различной динамики развития патологического процесса, вызванного разными стимулами, хотя на конечном этапе экспериментов параметры фибротических и воспалительных изменений у мышей, подвергнутых воздействию BLM или LPS, были практически идентичными. Действие BLM в первую очередь вызывает повреждение клеток, после чего они подвергаются апоптозу, на поздних стадиях которого высвобождаются паттерны, ассоциированные с повреждением (DAMPs). На следующей стадии активируются сигнальные пути, приводящие к синтезу цитокинов, хемокинов и интерферонов, и развивается воспаление. Совершенно иная ситуация наблюдается, когда легкие мыши подвергаются воздействию LPS, который является компонентом бактериальной клеточной стенки, принадлежащим к паттернам, ассоциированным с патогеном (PAMPs). PAMPs связываются с рецепторами распознавания паттернов (PRRs) и немедленно вызывают синтез сигнальных молекул и развитие воспаления. Предположительно, в случае индукции BLM основной пик цитокинов наблюдается позже, длится дольше или менее выражен, и, таким образом, превышает длительность индуцированного исРНК рефрактерного состояния. Это предположение подтверждается данными Kimura и др. [395], которые изучали воздействие BLM и LPS и их комбинированное воздействие на индукцию фиброза и показали, что уровни цитокинов, таких как MCP-1, KC (цитокин, вырабатываемый кератоцитами) и IL-6 в бронхоальвеолярной жидкости мышей были выше после воздействия LPS, чем после воздействия BLM. Можно предположить, что положительный эффект исРНК в случае

фиброза, индуцированного BLM, можно увеличить, изменяя временные интервалы в профилактическом режиме.

Таким образом, сравнение эффектов исРНК, использованной в профилактической или терапевтической схеме, на развитие фиброза в выбранных моделях мышей, индуцированных BLM и LPS, показало, что исРНК может быть использована в патологических состояниях, сопровождающихся развитием воспаления и риском развития фиброза, без усугубления патологической ситуации. Противофибротический эффект исРНК при фиброзе, индуцированном LPS и BLM, не только показывает безопасность ее использования при инфекционных и опухолевых заболеваниях, но и раскрывает дополнительные преимущества в снижении вредного воздействия цитостатиков, вызывающих фиброз. Профилактическая схема применения исРНК может быть полезной для предотвращения развития легочного фиброза. Однако для определения режимов дозирования и выбора оптимальных липидных формул требуются дальнейшие исследования для более полного раскрытия потенциала исРНК против конкретных агентов, вызывающих патологию.

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

Действие ТНК в значительной степени зависит от эффективности их доставки в целевые клетки. Для этой цели чаще всего используют ТНК, конъюгированные с транспортными лигандами [5] или включённые в состав комплексов с различными катионными липидами, липосомами, полимерами или наночастицами [6]. Многочисленные исследования были посвящены оптимизации липидных систем для доставки антисенс-олигонуклеотидов, siРНК, мРНК и терапевтических вакцин при различных режимах введения [7]. Однако проблемы доставки иммуностимулирующих ТНК и влияние систем доставки на эффективность биологического действия пока не были систематически изучены.

В данной части исследования мы исследовали влияние различных систем доставки на цитокин-индуцирующую, антипролиферативную и противоопухолевые активности исРНК. Системы доставки были получены и предоставлены для исследования проф. М. А. Масловым с коллегами (Институт тонких химических технологий имени Ломоносова, Москва, Россия). Данные липидные системы были созданы на основе поликатионного амфифила 1,26-бис(холест-5-ен-3-илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетразагексакозана тетрагидрохлорида (2X3) и липида-хелпера диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE)

(липосомы 2X3-DOPE), которые доказали свою способность эффективно доставлять различные нуклеиновые кислоты как *in vitro*, так и *in vivo* [23,24]. Для доставки исРНК мы использовали набор катионных липосом на основе 2X3-DOPE для доставки исРНК (Таблица 7, Рис. 11). Соотношение между 2X3 и DOPE было выбрано 1:1, так как, согласно литературным данным, это соотношение (1:1) способствует более эффективной работе липосом *in vivo* [396]. ИсРНК и липосомы образуют комплексы из-за электростатических взаимодействий между отрицательно заряженными фосфатными группами исРНК и четырьмя положительно заряженными протонированными аминогруппами в 2X3. Модификацию поверхности липосом полиэтиленгликолем и фолат-содержащим липоконъюгатом использовали для стабилизации липосом и их комплексов с исРНК в кровотоке и обеспечения их эффективного накопления в целевых клетках, а также для снижения скорости выведения комплексов из кровотока и улучшения биодоступности. Для этого в состав липосом вводили липоконъюгаты, содержащие PEG, отличающейся по молекулярной массе (800, 1500 и 2000 Да) и структуре. Серия P содержит PEG, присоединенный к 1,2-ди-О-дигетрадецил-*rac*-глицеролу в качестве якоря, а серия diP представлена PEG-цепью разной длины, содержащей на обоих концах аналогичные якорные группы. Липоконъюгаты серии diP, включенные в состав липосом, закрепляются на поверхности липосом обеими якорными группами и принимают форму петли, что позволяет образовывать более плотную, но тонкую защитную оболочку. Содержание липоконъюгатов в липосомальной формуле варьировало от 2 до 4%, чтобы обеспечить эффективную защиту от агрегации в сыворотке и опсонизации сывороточными белками. Наконец, в липосомы был добавлен липоконъюгат, содержащий фолат (FC), состоящий из 1,2-ди-О-дигетрадецил-*rac*-глицерола и связанной через 800 Да PEG спейсер фолевой кислоты для облегчения взаимодействия липосом с фолатными рецепторами, которые экспрессируются на нескольких типах опухолевых клеток [37]. Состав и некоторые характеристики полученных липосом и исРНК-содержащих липоплексов перечислены в Таблице 7, измерения проведены Д. В. Гладких (ЛБНК, ИХБФМ СО РАН). Можно заметить, что размеры исходных липосом (2X3-DOPE) не превышают 130 нм. Добавление липоконъюгатов в состав 2X3-DOPE привело к двукратному сокращению их размеров для серий P и F, но не изменило размер diP-липосом. В Таблице 7 представлены характеристики комплексов исРНК/липосомы, полученные при N/P 6/1, это соотношение было ранее определено как оптимальное для доставки siРНК с точки зрения баланса эффективности и отсутствия токсичности [377]. Данные показывают, что образование липоплексов с исРНК немного увеличивает размер частиц, но они остаются в приемлемом диапазоне для доставки ТНК.

Таблица 7. Гидродинамические диаметры, индекс полидисперсности и ζ -потенциалы липоплексов, образованных исРНК и катионными липосомами.

Липосомы	Состав, мол. %	N/P ¹	Размер, d нм	Z, мВ	PdI
2X3-DOPE	2X3/DOPE (50/50)	-	125.6 ± 0.6	42.5 ± 8.4	0.2
		6/1	218.8 ± 4.6	24.0 ± 0.3	0.4
P800	2X3/DOPE/P800 (49/49/2)	-	99.8 ± 3.1	40.8 ± 2.9	0.4
		6/1	156.0 ± 28.1	33.9 ± 0.6	0.4
P800 (4%)	2X3/DOPE/P800 (48/48/4)	-	61.5 ± 2.1	40.7 ± 1.2	0.4
		6/1	125.4 ± 3.4	22.1 ± 1.8	0.3
P800+F12 (2%)	2X3/DOPE/P800/F12 (48/48/2/2)	-	57.9 ± 1.0	40.6 ± 2.4	0.3
		6/1	172.4 ± 13.4	40.2 ± 0.3	0.4
diP800	2X3/DOPE/diP800 (49/49/2)	-	99.8 ± 3.1	40.8 ± 2.9	0.5
		6/1	235.3 ± 31.9	38.4 ± 0.9	0.3
diP800 (4%)	2X3/DOPE/diP800 (48/48/4)	-	127.3 ± 1.5	48.9 ± 0.9	0.5
		6/1	111.8 ± 2.5	23.2 ± 4.1	0.4
diP800+F12 (2%)	2X3/DOPE/diP800/F12 (48/48/2/2)	-	110.6 ± 2.5	47.7 ± 0.4	0.3
		6/1	218.8 ± 9.4	36.2 ± 1.1	0.3
P1500	2X3/DOPE/P1500 (49/49/2)	-	102.0 ± 6.8	21.4 ± 2.1	0.3
		6/1	223.1 ± 7.7	25.3 ± 1.9	0.4
diP1500	2X3/DOPE/diP1500 (49/49/2)	-	98.0±4.3	51.3±1.1	0.4
		6/1	119.2±1.5	10.3±1.1	0.4
P2000	2X3/DOPE/P2000 (49/49/2)	-	67.4±2.1	47.3±1.3	0.4
		6/1	114.3±2.3	13.3±2.1	0.6
diP2000	2X3/DOPE/diP2000 (49/49/2)	-	109.8±1.2	54.1±2.7	0.3
		6/1	129.6±11.4	15.1±1.1	0.4
F12	2X3/DOPE/F12 (49/49/2)	-	77.3 ± 9.5	35.7 ± 5.6	0.4
		6/1	170.8 ± 4.8	34.5 ± 0.4	0.4

¹ Соотношение азота и фосфора в комплексе исРНК/липосомы. По данным Д.В. Гладких.

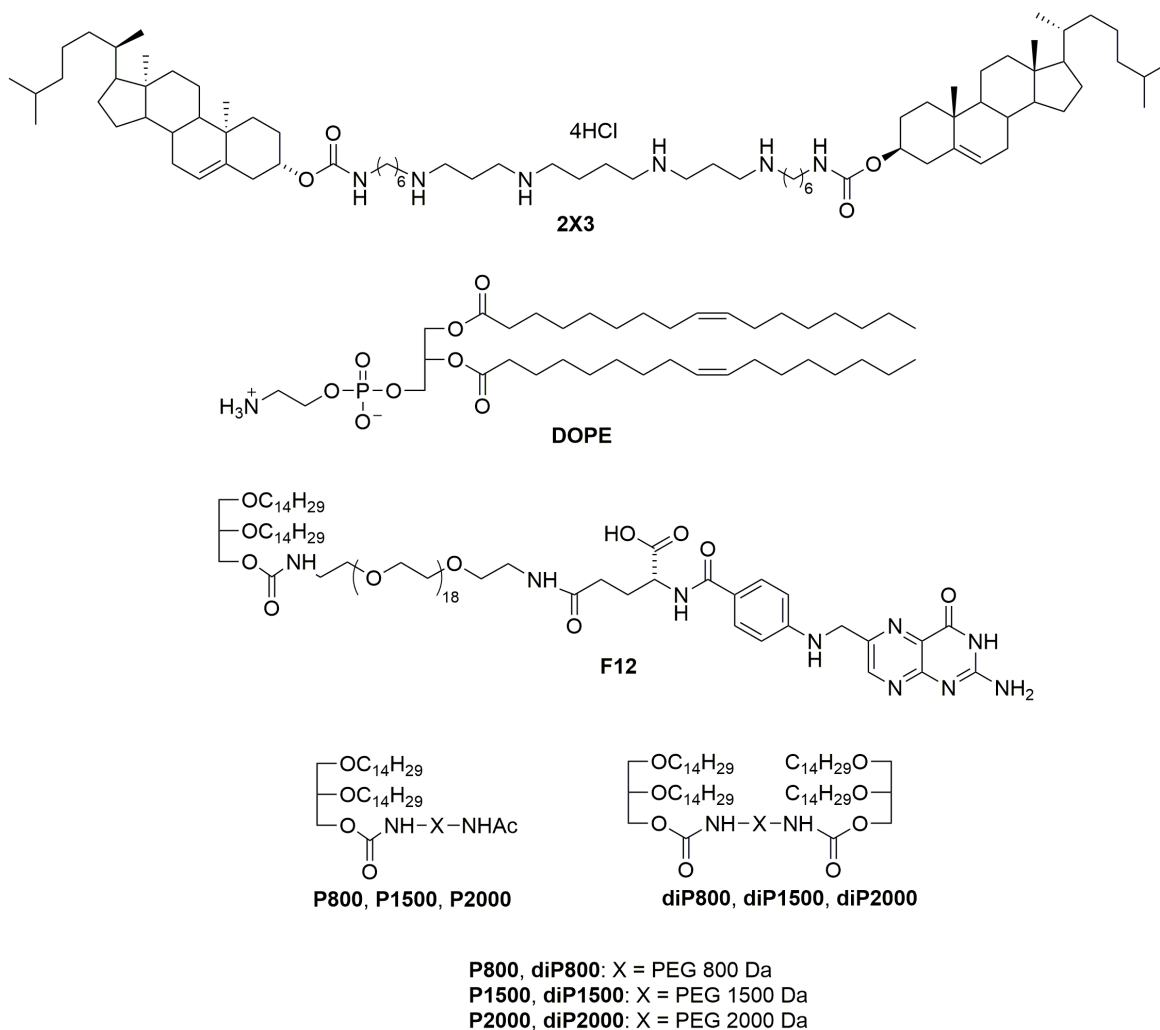


Рисунок 11. Структуры холестерол-основанных поликационных амфифильных соединений 1.26-бис(холест-5-ен-3-илоксикарбониламино)-7.11.16.20-тетраазагексакозан тетрагидрохлорид (2X3), липид-хелпер диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE), липоконъюгаты: *O,O'*-[*rac*-2,3-ди(тетрадецилокси)пропил-1-оксикарбониламино]октадекаэтиленгликоль (P800), *O,O'*-бис[*rac*-2,3-ди(тетрадецилокси)пропил-1-оксикарбониламино]октадекаэтиленгликоль (diP800), *O,O'*-[*rac*-2,3-ди(тетрадецилокси)пропил-1-оксикарбониламино]поли(этиленгликоль₁₅₀₀) (P1500), *O,O'*-бис[*rac*-2,3-ди(тетрадецилокси)пропил-1-оксикарбониламино]поли(этиленгликоль₁₅₀₀) (diP1500), *O,O'*-[*rac*-2,3-ди(тетрадецилокси)пропил-1-оксикарбониламино]поли(этиленгликоль₂₀₀₀) (P2000), *O,O'*-бис[*rac*-2,3-ди(тетрадецилокси)пропил-1-оксикарбониламино]поли(этиленгликоль₂₀₀₀) (diP2000) и *O*-{2-[*ra* -2,3-ди(тетрадецилокси)проп-1-илоксикарбонил]аминоэтил}-*O'*-[2-(птероил-L-глутам-5-ил)аминоэтил]октадекаэтиленгликоль (F12) использованные для приготовления липосом.

3.2.1 Активация продукции цитокинов исРНК/липосомами в РВМС человека

Иммуностимулирующее воздействие выбранных липосом и комплексов исРНК/липосом было исследовано в первичных культурах человеческих РВМС с целью оценить возможный терапевтический потенциал систем доставки и сравнить с результатами

in vivo экспериментов. Был определен уровень IFN- α , поскольку он обладает противоопухолевой и противовирусной активностью и играет важную роль в иммунотерапии; также было важно определить уровни провоспалительных цитокинов, особенно IL-6 и TNF- α , чтобы избежать острой воспалительной реакции; соответственно, эти конкретные цитокины были отобраны для измерения их уровней в динамике. Выделенные адгерентные PBMC высаживали в 24-луночные планшеты и инкубировали с пустыми липосомами или исРНК липоплексами. Среду из культуры клеток собирали через 6, 16 и 24 ч после трансфекции. Для оценки противоопухолевого потенциала использовался ELISA для измерения уровней IFN- α . Уровни TNF- α и IL-6 измерялись тем же методом для оценки возможной токсичности, связанной с побочными эффектами воспаления.

Результаты показывают, что через 6 часов после трансфекции значительных изменений в уровне IFN- α не наблюдалось, затем, через 16 часов, уровни значительно повышаются (Рис. 12А), после чего снова снижаются до своих исходных значений через 24 часа. Комплекс исРНК/P1500 вызывал наибольший подъем уровня IFN- α через 16 часов после трансфекции (872,93 пг/мл); в то же время сами липосомы P1500 практически не влияли на уровень IFN- α . В случае других липоплексов эффекты комплексов исРНК/липосомы и пустых липосом были сходными, что указывает на то, что эти липосомы имеют иммуностимулирующее действие и не способствуют проявлению специфической активности исРНК в этой модели. Включение фолатсодержащего липоконъюгата в композицию практически полностью блокировало желаемый эффект (Рис. 12А).

В 16-часовой экспериментальной точке было зарегистрировано незначительное увеличение уровня TNF- α (до 33 pg/mL); это увеличение было вызвано липосомами 2X3-DOPE, комплексами исРНК/diP800 (2 и 4%) и P1500, причем сами липосомы diP800 и P1500 не вызывали такого эффекта. Умеренный подъем уровня IL-6 наблюдался через 6 ч после трансфекции; более высокие уровни были отмечены для комплексов исРНК с diP800 и F12. Уровни IL-6 в клетках, трансфицированных P1500 и исРНК/P1500, были лишь незначительно повышены и не отличаются достоверно от уровней в необработанных клетках. diP800 (2%) и исРНК/diP800 (2%) вызывали примерно трехкратное увеличение уровней IL-6. С учетом наблюдаемых результатов исРНК/P1500 оказался наиболее благоприятной формулой, поскольку не вызывал явной активации выделения провоспалительных цитокинов, обеспечивая специфическую и эффективную продукцию IFN- α .

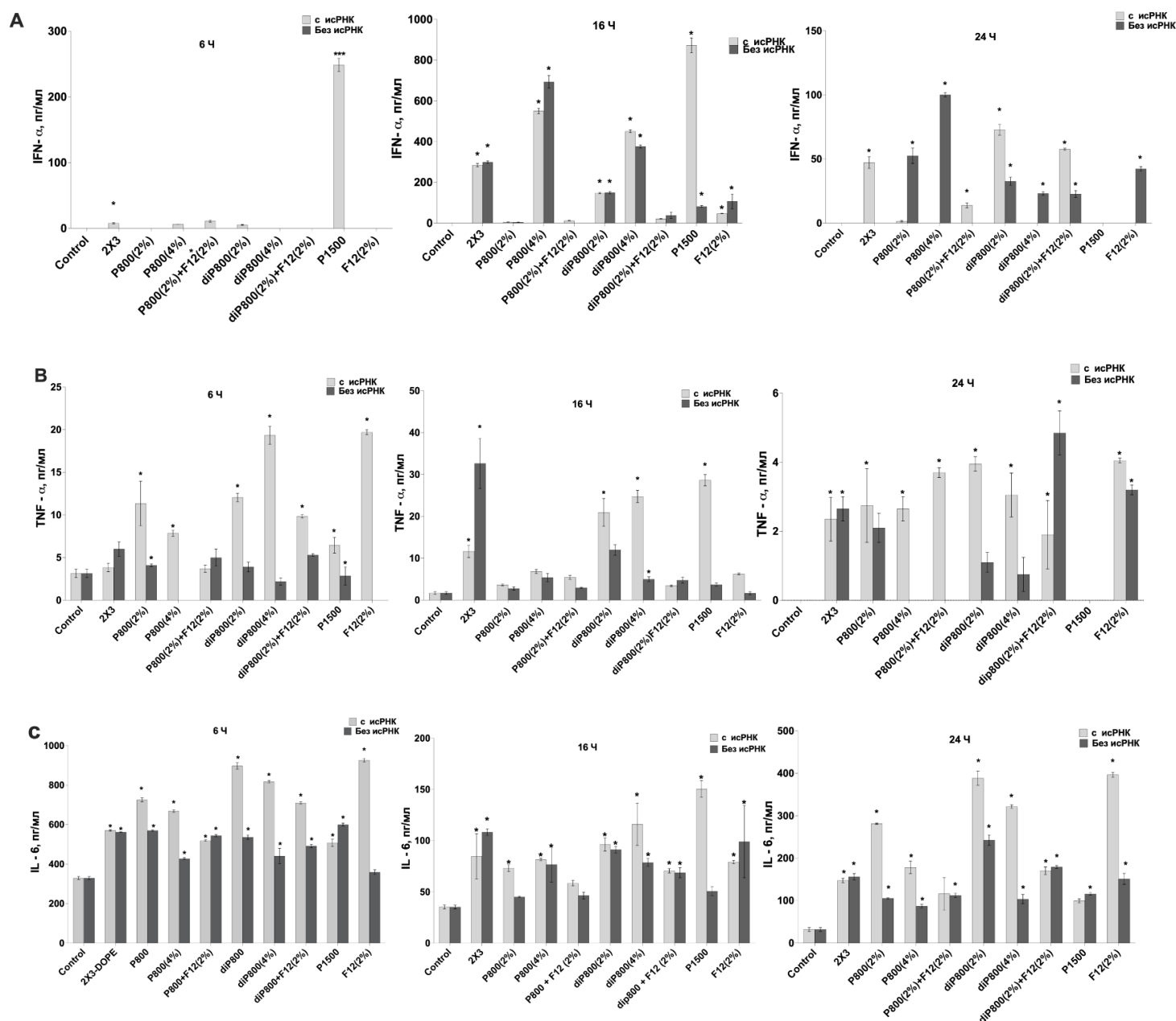


Рисунок 12. Уровни цитокинов в первичной культуре клеток PBMC человека после трансфекции клеток комплексами исРНК/липосомы. Уровни IFN-α (A) и TNF-α (B) через 16 ч после трансфекции и уровни IL-6 (C) через 6 ч после трансфекции были измерены с помощью ELISA. Данные представлены в виде среднего значения ± 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.

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

Для оценки влияния липосомных композиций на иммуностимулирующую активность исРНК в организме была изучена активность липоплексов, состоящих из 10 мкг

исРНК и различных липосом в концентрации, соответствующей N/P = 6/1, путем измерения уровня цитокинов, связанных с воспалением, и интерферонов в сыворотке крови мышей СВА через 6 ч после внутривенного (в.в.) введения липоплексов. Профилирование 13 провоспалительных и противовоспалительных цитокинов проводили с использованием набора LEGEND plex™ Mouse Inflammation Panel (13-plex) в соответствии с разделом "Материалы и методы"; уровень IFN- α , не включенного в комплект, измеряли с помощью ELISA (рис. 13, Таблица 8). 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.

Результаты указывают на то, что основными цитокинами, синтез которых активируется в ответ на введение комплексов исРНК/липосомы, являются MCP-1, а также интерфероны α и γ . Также была показана умеренная активация интерферона β , провоспалительного цитокина IL-6 и, в меньшей степени, IL-1 α и TNF α , а также слабая активация противовоспалительных цитокинов IL-10 и IL-27. Уровни IL-23, IL-12p70, IL- β , IL-17A и GM-CSF заметно не изменялись в ответ на исРНК.

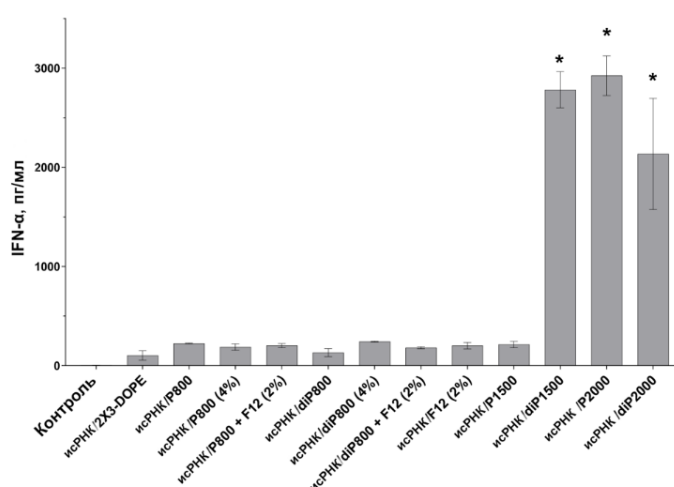
Полученные данные демонстрируют, что исРНК липоплексы содержащие diP1500, P2000 и diP2000 вызывает наиболее значительный подъем уровня IFN- α по сравнению с контрольной группой и группами, получавшими исРНК липоплексы другого состава. Наибольший подъем был вызван комплексами с P2000; это показывает, что увеличение длины цепи PEG последовательно улучшает способность исРНК к активации секреции IFN- α (Рис. 13А). 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: липоплексы с diP1500, P2000 и diP2000 вызывает заметное увеличение уровней IFN- α и γ без значительного повышения уровней провоспалительных цитокинов. Увеличение содержания PEG-липоконъюгата 800 Da в липосомной формуле с 2% до 4% не оказало выраженного влияния на синтез цитокинов: это снизило желаемый эффект серии P и слегка увеличило эффект серии diP, которая сама по себе менее

эффективна, чем серия Р (Рис. 13В). В отличие от данных, полученных *in vitro*, увеличение содержания Р800-липokonъюгата в составе липосом значительно не изменило иммуностимулирующий эффект соответствующих липоплексов *in vivo*. Обратное отношение наблюдается для липосом diP800, где увеличение процента липokonъюгата в их составе увеличивает уровни секретируемых цитокинов MCP-1, IFN- α , IFN- γ и IFN- β . Однако эти уровни цитокинов не настолько значительны, как те, которые вызываются липоплексами, содержащими липokonъюгаты с более длинными цепями PEG. Включение в состав липосом липokonъюгата, содержащего фолат, блокирует положительный эффект увеличения содержания PEG-липokonъюгатов (Рис. 13А).

Сравнение липосом серии Р (одна якорная группа на PEG-липokonъюгате) с аналогичными липосомами из серии diР (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. В случае липokonъюгатов с PEG 800 Da, diP800 более эффективно увеличивал уровни про-воспалительных цитокинов, чем Р800. Включение липokonъюгата F12, содержащего фолиевую кислоту, в липосомные формулы самого по себе или дополнительно к diP800 не оказывает положительного эффекта, а скорее уменьшает иммуностимуляцию. Наконец, сравнение всех протестированных формул с точки зрения положительных (производство интерферонов и MCP-1) и отрицательных (противовоспалительная активность) свойств позволяет выбрать Р2000 для дальнейших *in vivo* экспериментов.

А



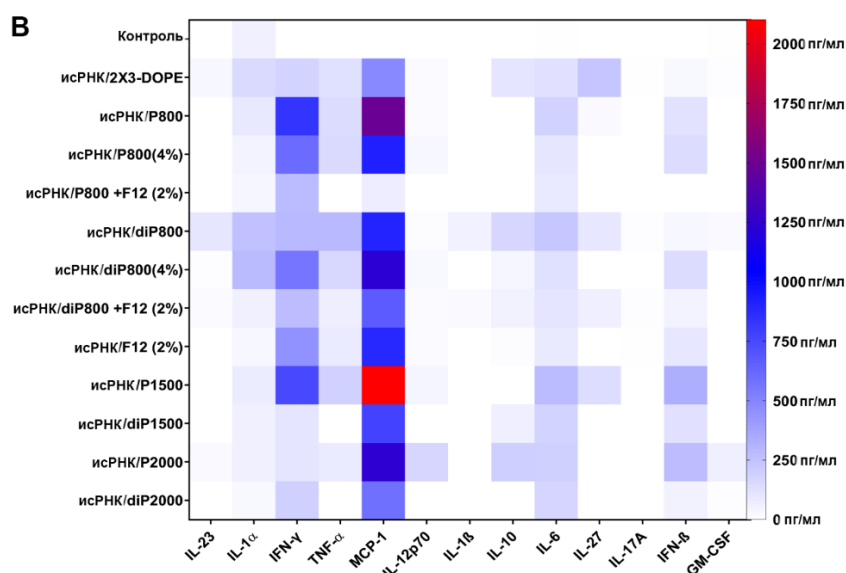


Рисунок 13. Уровни цитокинов в сыворотки крови мышей СВА (n=3) через 6 ч после в/в введения комплексов исРНК/липосомы. А. Уровни IFN- α в сыворотке, измеренные методом ELISA. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартного отклонения (SD), рассчитанного из образцов от трех мышей, измеренных в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

Таблица 8. Уровни цитокинов, измеренные с использованием набора LEGEND plexTM Mouse Inflammation Panel (13-plex) после инъекций исРНК + липосомы различной структуры. Данные представляют собой среднее $\pm$ стандартное отклонение (SD), рассчитанное на основе измерений по меньшей мере трех мышей. Статистически значимые различия между экспериментальными группами и контрольной группой отмечены звездочкой (***) = значение $P \leq 0,0001$, ** = значение $P < 0,001$, * = значение $P < 0,05$; обычный двусторонний дисперсионный анализ, критерий множественных сравнений Даннетта

	CTR L	2X3	F12	P800	P800 (4%)	P80 0+F1 2	diP8 00	diP80 0(4%)	diP8 00+F 12	P150 0	diP1 500	P200 0	diP2 000
IL-23	0	29.1 1 $\pm$ 10 .15	0	0	0	0	0	4.85 $\pm$ 11.88 ***	13.3 9 $\pm$ 20 .78	0	0	0	38.2 $\pm$ 15. 39
IL- 1 α	58.3 3 $\pm$ 1 5.75	151. 44 $\pm$ 1 4.92	31.26 $\pm$ 2.15	90.87 $\pm$ 7.94	47.0 5 $\pm$ 21.2 8	33.3 8 $\pm$ 1. 36	254. 06 $\pm$ 7 0.08	331.3 06 $\pm$ 3 14.91	58.8 5 $\pm$ 2. 80	74.35 $\pm$ 15.8 9	58.3 1 $\pm$ 33 .98	25.85 $\pm$ 10.9 8	59.0 4 $\pm$ 20 .56
IFN- γ	0	180. 18 $\pm$ 6 3.75 *	451.0 9 $\pm$ 138 .24 ***	832.43 $\pm$ 340.5 1 ***	608. 68 $\pm$ 6 7.84 ***	279. 41 $\pm$ 1 0.82 **	286. 02 $\pm$ 7 6.15 ***	567.5 6 $\pm$ 31. 56 ***	273. 59 $\pm$ 5 9.38 ***	753.6 3 $\pm$ 71. 64 ***	105. 73 $\pm$ 2 6.17	191.4 5 $\pm$ 80. 02 *	0

TNF-α	0	124. 31 $\pm$ 2 5.19	79.48 $\pm$ 34.0 3	140.36 $\pm$ 49.10	150. 53 $\pm$ 3 2.78	0	285. 8 $\pm$ 14 .31	160.6 7 $\pm$ 82. 00 **	66.0 9 $\pm$ 19 .29 ***	188.0 5 $\pm$ 11 6.97	0	79.75 $\pm$ 0	106. 45 $\pm$ 5 6.60 ***
MCP-1	0	483. 68 $\pm$ 1 46.3 7 ***	887.8 8 $\pm$ 243 .91** *	1488.4 3 $\pm$ 131. 06***	919. 51 $\pm$ 1 83.5 4 ***	70.4 1 $\pm$ 5. 51	903. 56 $\pm$ 1 69.4 4 ***	1220. 31 $\pm$ 2 41.35 ***	672. 23 $\pm$ 6 2.69 ***	2101. 24 $\pm$ 8 57.31 ***	773. 48 $\pm$ 2 14.7 3 ***	1239. 09 $\pm$ 3 70.26 ***	586. 81 $\pm$ 1 20.2
IL-12p70	0	15.0 4 $\pm$ 6. 47	19.95 $\pm$ 6.46	15.26 $\pm$ 3.45	29.6 9 $\pm$ 5. 47	0	9.85 $\pm$ 1.5 5	26.41 $\pm$ 5.59	13.8 5 $\pm$ 10 .70	37.57 $\pm$ 16.1 8	0	167.8 $\pm$ 0	0
IL-1β	0	0	0	0	0	0	110. 28 $\pm$ 5 6.08	0	23.6 8 $\pm$ 12 .00	0	0	0	0
IL-10	0	103. 1 $\pm$ 10 .61	0	0	0	0	248. 29 $\pm$ 1 47.7 1 **	0	52.4 7 $\pm$ 42 .10	0	0	196.2 7 $\pm$ 25. 44 **	0
IL-6	3.98 $\pm$ 1.4 6	120. 31 $\pm$ 5 6.47	85.11 $\pm$ 41.7 6	181.53 $\pm$ 48.86 *	100. 72 $\pm$ 5 1.04	87.7 7 $\pm$ 5. 05	228. 63 $\pm$ 2 0.08	127.6 5 $\pm$ 38. 89	103. 11 $\pm$ 6 .48	277.3 $\pm$ 64.8 9 ***	180. 88 $\pm$ 1 00.7 1 *	193.5 8 $\pm$ 82. 48	171. 87 $\pm$ 6 5.99
IL-27	0	236. 5 $\pm$ 61 .99	0	22.38 $\pm$ 0	0	0	95.4 4 $\pm$ 17 .82	0	65.7 7 $\pm$ 55 .68	139.6 6 $\pm$ 10 7.37 *	0	0	0
IL-17A	0	3.05 $\pm$ 1.2 0	0.57 $\pm$ 0	0	0	0	14.8 1 $\pm$ 9. 20	0	4.17 $\pm$ 3.8 9	0	0	0	0
IFN-β	0	28.2 6 $\pm$ 13 .56	97.97 $\pm$ 36.8 4	118.44 $\pm$ 21.99	142. 57 $\pm$ 2 4.90	0	31.8 8 $\pm$ 9. 52	140.8 5 $\pm$ 20. 75	46.1 3 $\pm$ 34 .58	330.3 5 $\pm$ 55. 69 ***	122. 97 $\pm$ 3 2.03	274.9 8 $\pm$ 38. 28	49.6 2 $\pm$ 30 .55
GM-CSF	3.31 $\pm$ 5.1 7	7.45 $\pm$ 1.7 1	0	0	0	0	23.6 9 $\pm$ 1. 56	0	0	0	0	63.79 $\pm$ 0.1	7.32 $\pm$ 1.5 5

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

Для исследования антипролиферативных эффектов исРНК/P2000 и исРНК/2X3-DOPE на опухолевые клетки были выбраны клеточные линии различного происхождения, меланома В16 и устойчивая к цитостатикам лимфосаркома RLS40, поскольку они обладают опухоленности в сингенных мышах и могут быть в дальнейшем использованы для оценки противоопухолевой активности *in vivo*. Экспериментальная схема показана на рис. 14А. Клетки были посеяны на 96-луночные планшеты за день до трансфекции в трехкратном повторе, количество живых клеток анализировали с помощью WST-1 теста через 2–7 день после трансфекции.

A

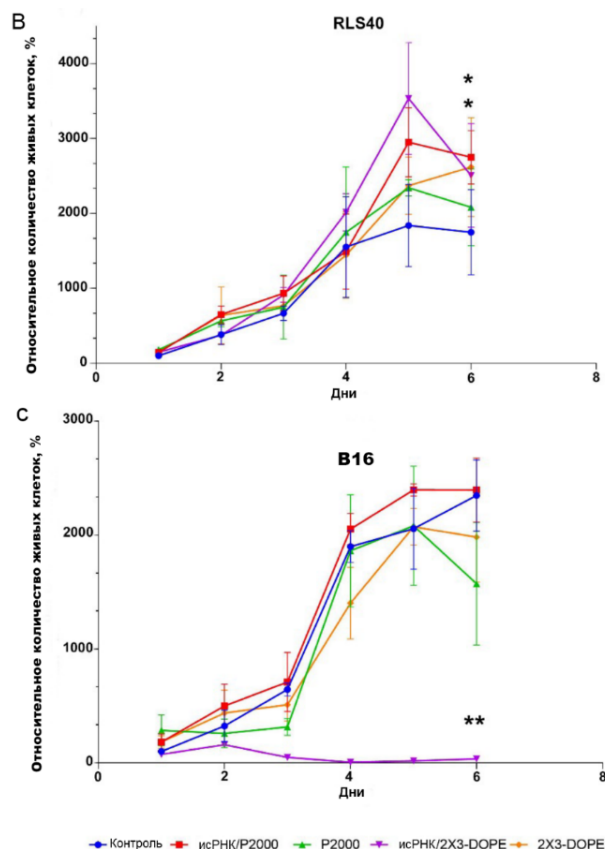
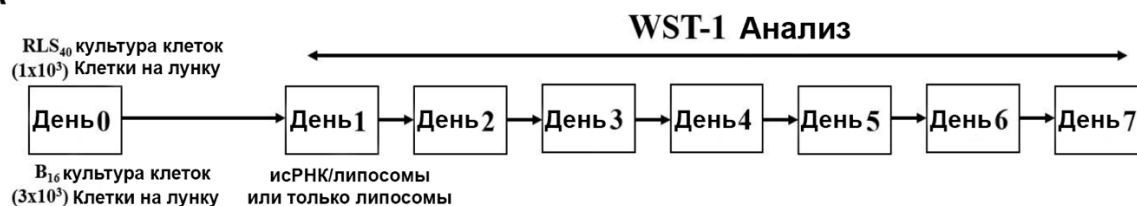


Рисунок 14. Антипролиферативная активность комплексов исРНК/липосомы в клетках меланомы B16 и лимфосаркомы RLS40. А. Экспериментальная схема. Б. Динамика роста клеток лимфосаркомы RLS40. С. Динамика роста клеток меланомы B16. Относительное количество живых клеток оценивали с помощью WST-1, количество клеток в контрольной группе на следующий день после трансфекции исРНК было принято за 100%. Статистически значимые различия между экспериментальными группами (исРНК/P2000 и P2000 в RLS40, исРНК/2X3-DOPE в B16) и контрольной группой обозначены звездочкой (* $p < 0.05$ для P2000 и исРНК/P2000, ** $p < 0.005$ для исРНК/2X3-DOPE); двухфакторная ANOVA, тест множественных сравнений Даннетта.

В течение периода наблюдения клетки RLS40 экспоненциально росли и не проявляли статистически 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, в некоторые моменты времени, даже немного превышало количество клеток в контрольной необработанной группе (Рис. 14В).

Совершенно иная картина наблюдается в случае клеток меланомы B16: количество живых клеток, обработанных исРНК/2X3-DOPE, значительно уменьшилось по сравнению с контрольной группой и соответствующей группой с липосомами уже на следующий день после трансфекции. Пустые липосомы P2000 незначительно подавляли рост клеток в течение первых трех дней после обработки, но в последующие дни скорость роста клеток восстанавливались, и они росли аналогично другим группам. Комплексы исРНК/P2000 практически не оказывали влияния на скорость пролиферации клеток (Рис. 14С). Такое различие в поведении "реагирующих" и "нереагирующих" опухолевых клеток может возникнуть как из-за характеристик самих клеток, связанных с их тканевым происхождением, таких как наличие распознающих рецепторов и компонентов дальнейших сигнальных путей [397], так и из-за различной эффективности накопления исРНК в клетках. Что бы проверить это предположение, мы использовали Су5.5-меченую исРНК для сравнения эффективности ее накопления в клетках B16 и RLS40. Клетки были трансфицированы комплексами или только исРНК, и спустя 4 часа инкубации уровни накопления исРНК в клетках измеряли с использованием поточной цитометрии (Рис. 15). Результаты свидетельствуют о том, что во всех случаях накопление свободной или исРНК в комплексе с липосомами в клетках меланомы B16 происходило как минимум в 2 раза эффективнее, чем в клетках лимфосаркомы RLS40; тем не менее, уровни накопления комплексов исРНК/2X3-DOPE в клетках RLS40 достаточно значительны. В обеих линиях клеток накопление исРНК, опосредованное липосомами 2X3-DOPE, было гораздо более эффективным, чем накопление исРНК, опосредованное липосомами P2000 (Рис. 15). Эти данные показывают, что наблюдаемые закономерности во время доставки исРНК подобные тем, что наблюдаются для других типов ТНК, хорошо согласуются с нашими недавно полученными данными, показывающими, что включение PEG-липоконъюгата в липосомы снижает эффективность накопления антисенс-олигонуклеотидов и плазмидной ДНК в клетках *in vitro* [125].

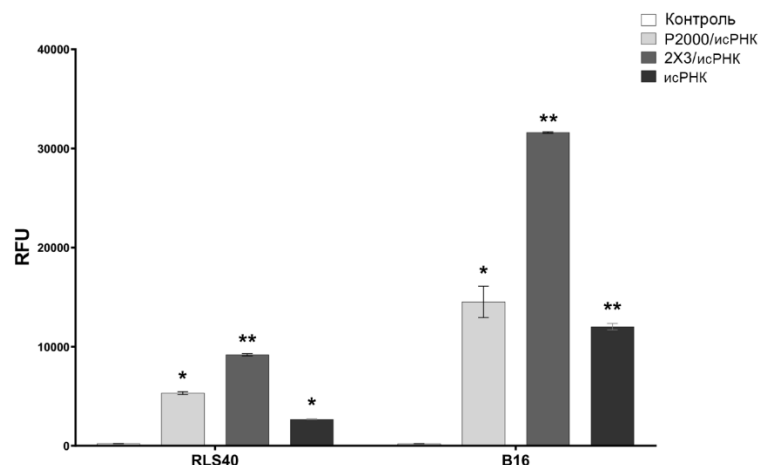


Рисунок 15. Накопление Cy5.5-исРНК и её комплексов с липосомами в клетках B16 и RLS40. Накопление измеряли через 4 ч после трансфекции Cy5.5-исРНК с использованием поточной цитометрии. Статистически значимые различия между экспериментальными группами и контрольной группой указаны звёздочкой (* $p < 0.005$, ** $p < 0.0001$); двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA), множественный сравнительный тест Даннетта. RFU – Относительные единицы флуоресценции.

Мы использовали активацию маркера иммуностимуляции мРНК *Pkr* для оценки иммунного ответа в клеточных линиях различного происхождения. Клетки B16 и RLS40 трансфицировали исРНК/липосомами или только липосомами, к контрольным добавляли OptiMEM. Клетки инкубировали в течение 24 ч, после чего из них выделяли мРНК, и определяли относительную экспрессию *Pkr* мРНК методом RT-qPCR (Рис. 16). Экспрессия *Pkr* мРНК была выбрана в качестве маркера активации иммунного ответа, поскольку этот ген переэкспрессирован при вирусных инфекциях и кодирует двухцепочечный белок-киназу R (PKR), важный компонент клеточной противовирусной защиты у млекопитающих. Ранее было показано, что исРНК активирует экспрессию этого гена, а ингибирование PKR 2-аминопурином блокирует антипролиферативную активность исРНК в опухолевых клетках человека [398].

Полученные данные показывают, что значительной активации экспрессии *Pkr* мРНК клетках RLS40 после трансфекции исРНК не наблюдалось. Напротив, клетки меланомы B16, обработанные исРНК/2X3-DOPE или 2X3-DOPE, демонстрируют значительное 7-кратное увеличение уровней экспрессии *Pkr* мРНК. Комплекс исРНК/P2000 вызвал 6-кратное увеличение, в то время как эффект пустых липосом P2000 дал 4-кратное увеличение экспрессии *Pkr* мРНК. ИсРНК без липосом не оказывал влияния на экспрессию маркера. Таким образом, можно заключить, что RLS40 относится к "нереагирующим" клеточным

линиям скорее всего из-за особенностей их тканевого происхождения и соответствующего состояния профиля транскриптома, а не потому, что исРНК не проникает в эти клетки.

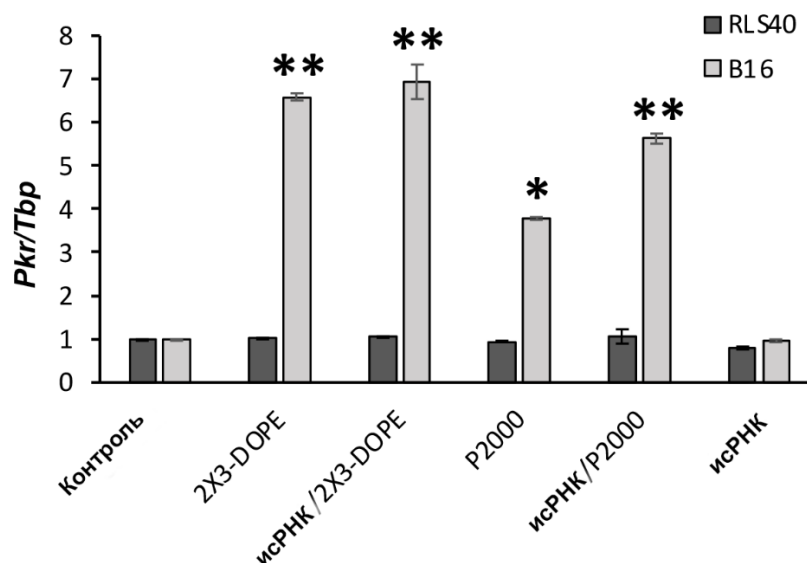


Рисунок 16. Уровни *Pkr* мРНК в клетках RLS40 и B16 после обработки исРНК/липосомами или пустыми липосомами. Относительный уровень мРНК *Pkr*, нормализованный на уровень мРНК *Tbp*, измеряли методом RT-qPCR через 24 ч после трансфекции. Отношение *Pkr/Tbp* в контроле было принято за 1. Статистически значимые различия между экспериментальными группами и контрольной группой обозначены звездочкой (* $p < 0.005$, ** $p < 0.0001$); обычный двухфакторный ANOVA, множественный тест сравнения Даннетта.

3.2.4. Противоопухолевая активность комплексов исРНК/липосомы на мышинных моделях

При переходе от *in vitro* к *in vivo* такие факторы, как биораспределение препарата в организме и скорость выведения препарата из кровотока, могут влиять или даже определять эффективность противоопухолевого действия исРНК. Кроме того, противоопухолевая активность может определяться как эффективностью прямого действия исРНК на опухолевые клетки, так и эффективностью исРНК-опосредованной активации иммунной системы. Для оценки противоопухолевого эффекта комплексов исРНК/липосомы *in vivo* мы использовали сингенные мышинные модели, актуальные для изучения иммунотерапии: меланому B16, имплантированную мышам C57BL/6, и лимфосаркому RLS40 имплантированную мышам СВА. исРНК/липосомы или пустые липосомы вводили внутривенно на 10, 13 и 16 дни после имплантации опухоли. За ростом опухоли следили и в конце эксперимента собирали органы для гистологического исследования; схема эксперимента, представлена на рис. 17А. Временные интервалы между инъекциями выбирались в соответствии с ранее полученными данными о продолжительности периода рефрактерности к индукции интерферона после введения исРНК [38].

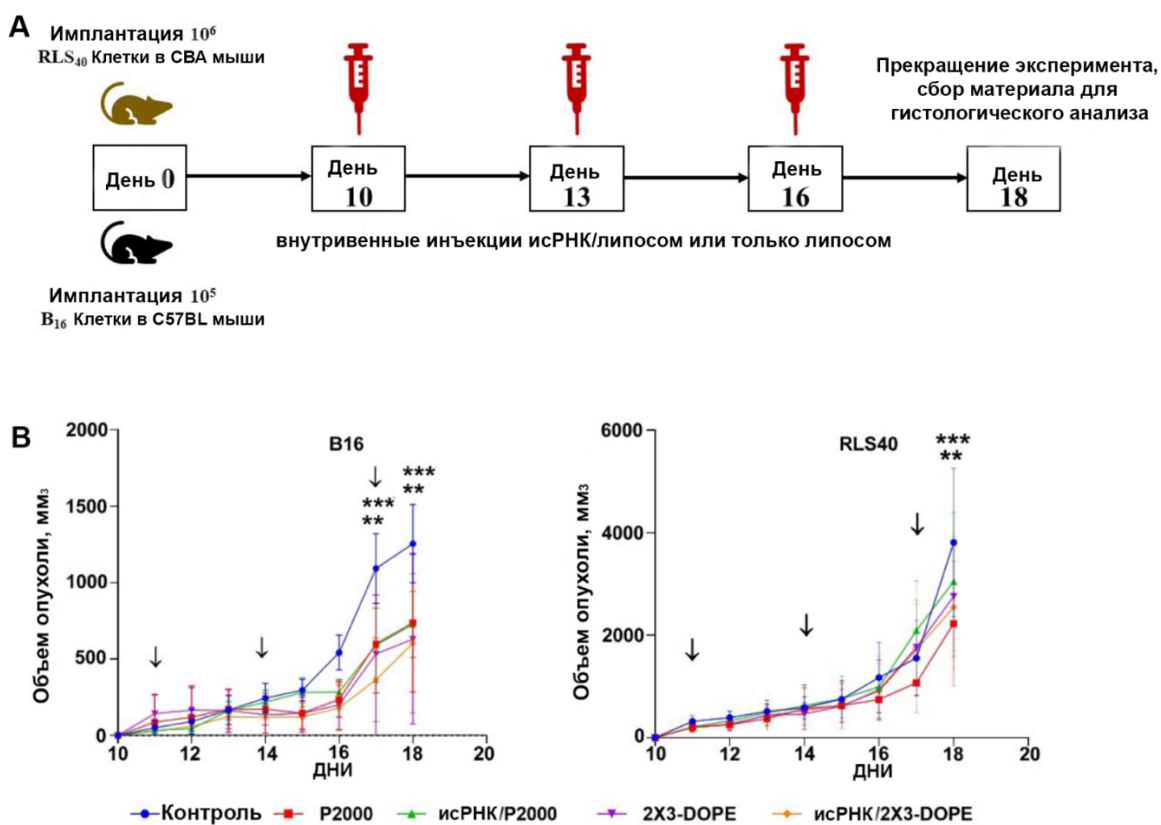
Анализ динамики роста опухоли показал, что трехкратные инъекции вызывали задержку роста опухоли и уменьшали ее объем на модели меланомы В16 под действием как исРНК/липосом, так и самих липосом. Наиболее выраженный эффект наблюдался после введения исРНК/2X3-DOPE, который проявил мощную противоопухолевую активность, вызывая уменьшение общего объема опухоли в 2 раза по сравнению с контролем (рис. 17Б, левый график). Что касается мышей с лимфосаркомой RLS40, наблюдаемый противоопухолевый эффект был незначительным (рис. 17В, правый график). Сравнение веса опухоли В16 в конце эксперимента показало, что только опухоли у мышей, получивших исРНК/2X3-DOPE, были статистически значимо меньше, чем в контрольной группе (рис. 17С, левый график). Тенденция к снижению объема опухоли наблюдалась в группе, получавшей исРНК/P2000; однако различия с контролем не являются статистически значимыми (рис. 17В, левый график). Как и ожидалось в соответствии с кинетикой роста опухолей RLS, их масса статистически значимо не различалась во всех экспериментальных группах (рис. 17В, правый график).

Гистологический анализ печени нелеченых контрольных мышей с меланомой В16 и мышей, которых лечили исРНК/липосомами или пустыми липосомами, проводили для оценки возможной токсичности лечения. Данные показывают (табл. 9, рис. 18), что рост меланомы В16 сопровождается высокой печеночной токсичностью, проявляющейся в выраженным увеличением суммарных деструктивных изменений в паренхиме печени (увеличение в 3 раза) в контрольной группе, не получавшей лечения, группа, которая получала только 2X3-DOPE, характеризуется высоким уровнем дистрофии и некроза в печени по сравнению со здоровым контролем. Лечение исРНК/2X3-DOPE и P2000 вызывало уменьшение площади суммарных деструктивных изменений в паренхиме печени в 2 раза, о чем свидетельствовало уменьшение как дистрофий, так и некрозов, тогда как исРНК/P2000 вызывало умеренное уменьшение суммарных деструктивных изменений. Полученные данные свидетельствуют о том, что уменьшение деструктивных изменений в ткани печени коррелирует с уменьшением объема опухоли, а введение мышам исРНК/липосом или пустых липосом оказывает гепатопротекторное действие.

Селезенка — наиболее чувствительный к иммуностимуляции орган, поэтому был проведен его гистологический анализ. Селезенка нелеченых контрольных мышей с меланомой В16 имела типичное строение, сравнимое с селезенкой здоровых мышей: белая пульпа развита умеренно и состоит из лимфоидных фолликулов (рис. 19). Три в/в инъекции исРНК/липосом или только липосом вызвали выраженный иммунный ответ в селезенке

обработанных мышей, выражающийся в увеличении объемной плотности белой пульпы и лимфоидных фолликулов в селезенке (рис. 19А, Б).

Несмотря на то, что мыши СВА реагируют на введение комплексов исРНК/липосомы секрецией высоких уровней интерферонов I типа, этого недостаточно, чтобы существенно ограничить рост опухоли RLS40, которая сама по себе не реагирует на действие исРНК. Сравнение эффективности комплексов исРНК с различными липосомами на развитие опухолей B16 у мышей свидетельствует о том, что эффективность антипролиферативного воздействия на опухолевые клетки имеет первостепенное значение для торможения роста опухоли у сингенных мышей, что сопровождается снижением печеночной токсичности и выраженным иммуностимулирующим эффектом.



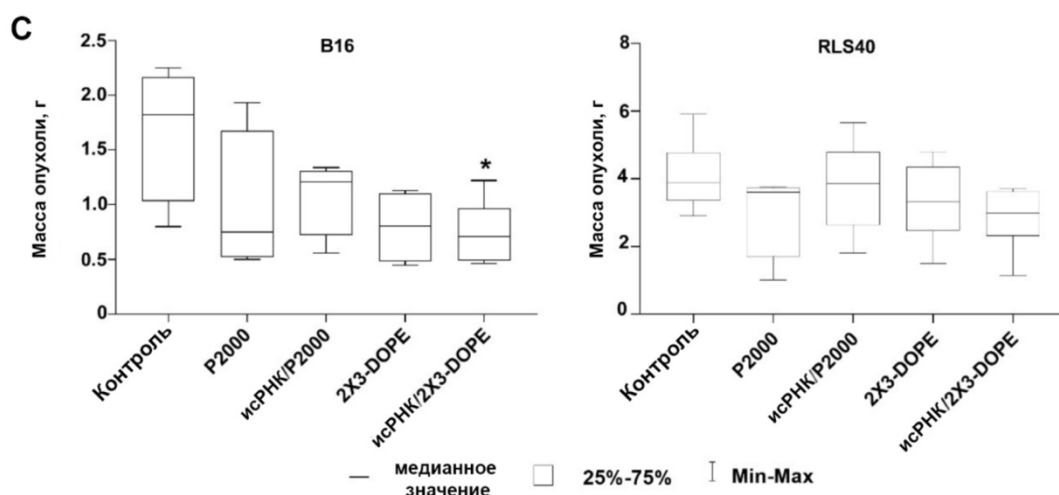


Рисунок 17. Противоопухолевая активность исРНК в комплексе с липосомами на моделях мышей с лимфосаркомой RLS40 и меланомой B16. А. Экспериментальная схема. Б. Динамика роста опухоли (n = 5 мышей в группе). С. Средний вес опухоли в конечной точке эксперимента. Стрелки указывают день, когда мышам сделаны 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.

Таблица 9. Морфологические изменения¹ в ткани печени здоровых мышей и мышей с меланомой B16 без лечения (Контроль) и после введения исРНК/липосом или липосом.

	Здоровые	Контроль	2X3-DOPE	исРНК/ 2X3-DOPE	P2000	исРНК/ P2000
Нормальные гепатоциты, Vv, %	80.0±1.7 ***	54.9± 16.5 ###	52.7 ± 9.9 ###	71.8 ± 6.3 **	69.3 ± 16.6 *	63.4 ± 2.2 ##
Дистрофия, Vv, %	6.3±0.7 ***	32.3±14.9 ###	30.9± 11.6 ###	15.3 ± 4.9 **	17.2 ± 16.4* ##	21.3 ± 1.9 ###
Некроз, Vv, %	2.0±0.7	2.1 ± 1.7	4.9 ± 1.4	2.1 ± 1.7	0.7 ± 0.1	2.2 ± 0.6
Суммарные деструктив-ные изменения, Vv, %	9.4±1.2	34.4±16.6	35.7±13.0	17.1±6.6	17.7±16.5	23.5±2.6
Другое, Vv, %	11.7±1.3	10.5 ± 0.9	11.6 ± 1.1	10.7 ± 0.4	12.9 ± 1.1	13.1 ± 0.3
Двуядерные гепатоциты, Nv	3.5±1.2	14.2 ±6.2	19.4 ± 5.5	14.7 ± 4.9	20.4 ±7.7	9.0± 0.4

¹Среднее среднее значение ± стандартное отклонение представлено в таблице, статистически значимые различия между экспериментальными группами и контрольной группой обозначены звездочкой, а между экспериментальными группами и здоровой группой обозначены решеткой (* или # $p < 0,05$, ** или ## $p < 0,01$, *** или ### $p < 0,0001$); двусторонний анализ ANOVA, тест множественного сравнения Даннетта.

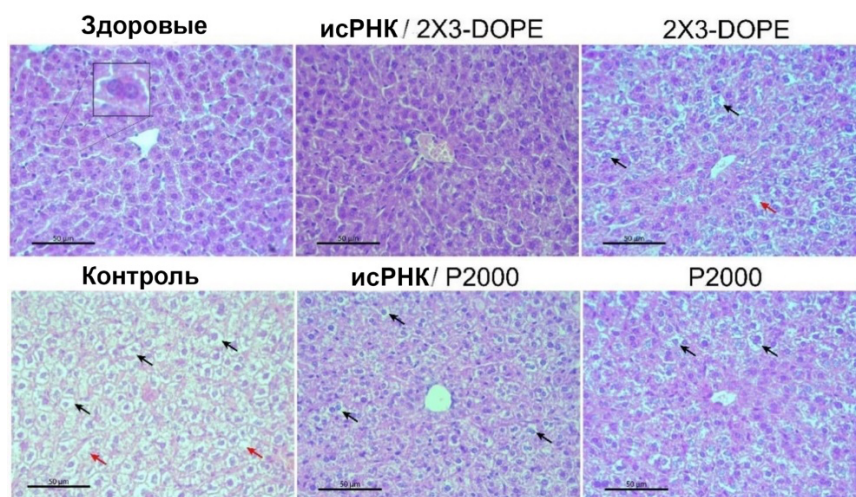


Рисунок 18. Влияние комплексов исРНК/липосомы на ткань печени мышей с меланомой B16. Репрезентативные гистологические изображения тканей печени здоровых животных, контрольных, необработанных мышей, мышей, получивших комплексы исРНК/2X3-DOPE или исРНК/P2000, и мышей, обработанных 2X3-DOPE или P2000 в OptiMEM, соответственно. На вставках показаны двоядерные гепатоциты (слева), некроз паренхимы печени (красные стрелки) и гепатоциты с дистрофией (черные стрелки). Окраска гематоксилином и эозином, исходное увеличение в 400 раз. Масштабная полоса соответствует 50 мкм.

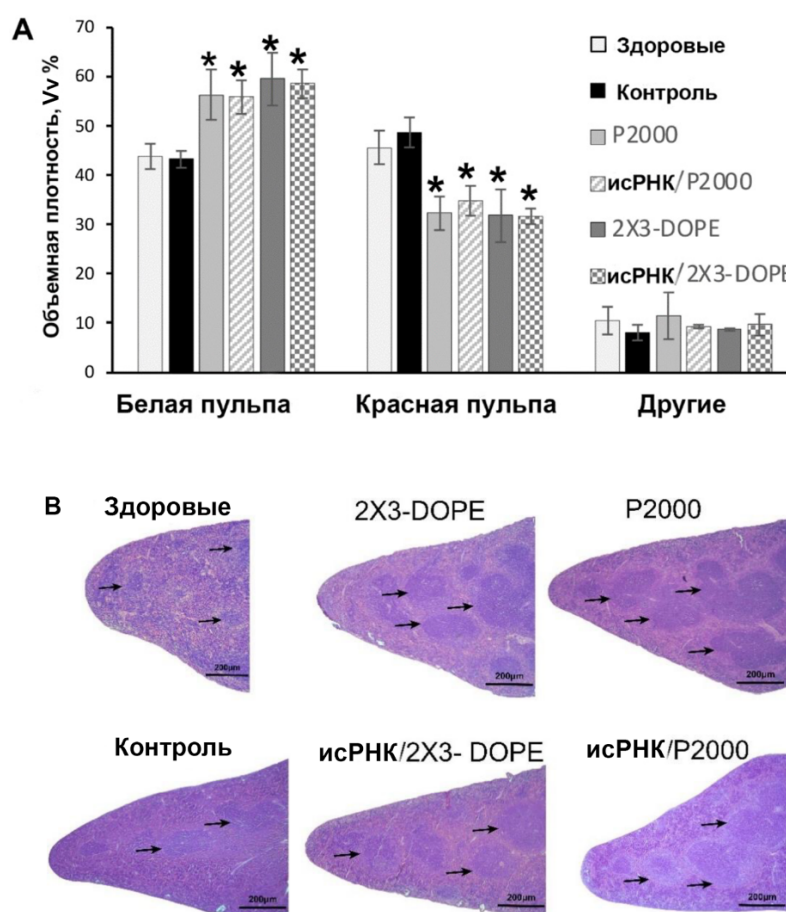


Рисунок 19. Влияние исРНК на ткань селезенки мышей с меланомой B16. А. Данные морфометрии селезенки мышей C57BL/6 с меланомой B16. Объемная плотность белой и

красной пульпы в ткани селезенки после 3-х инъекций исРНК/липосом или только липосом. Б. Репрезентативные гистологические изображения срезов селезенки. Окраска гематоксилином и эозином. Черные стрелки указывают лимфоидные фолликулы в селезенке. Исходное увеличение $\times 100$. Данные представляют собой среднее $\pm$ стандартное отклонение, рассчитанное на основе измерений пяти мышей в каждой группе. Статистически значимые различия между экспериментальными группами и контрольной и здоровой группами отмечены звездочкой (* $P < 0.001$); двусторонний анализ ANOVA, тест множественного сравнения Даннетта. Масштабная линейка соответствует 200 мкм.

Ранее было показано, что иммуностимулирующая активность данной исРНК проявляется только при использовании систем доставки, что согласуется с вовлечением внутриклеточных молекулярных сенсоров RIG-I и PKR в антипролиферативное действие исРНК [274]. Липосомы представляют собой многообещающую систему доставки из-за их клеточной мембраноподобной структуры, которая значительно усиливает клеточное поглощение и накопление и обеспечивает эффективное сродство к клеткам [399–402]. В данном исследовании впервые проведено детальное профилирование цитокинов, секретируемых в крови мышей под действием комплексов липосом с исРНК. Наши данные по профилированию цитокинов демонстрируют удивительно высокие уровни MCP-1, также известного как хемокиновый (CC-мотив) лиганд 2 (CCL2). Взаимосвязь между MCP-1 и интерферонами как типа I, так и типа II при воспалении и противовирусной защите изучалась в работе Hokeness et al, 2005 [403] на модели мышинной цитомегаловирусной (CMV) инфекции. Они проанализировали уровни MCP-1 у иммунокомпетентных и дефицитных по IFN- α/β (IFN- α/β R-) мышей и показали, что у IFN- α/β R- мышей уровень MCP-1 в ответ на инфекцию был снижен в 5 раз в сравнение с иммунокомпетентными животными. Gill и др. [404] обсуждали в своей работе, как множественные волны IFN могут влиять на уровни MCP-1 в ходе инфекции вирусом простого герпеса (HSV-2). Ранняя волна IFN- β (через 12 часов после заражения) привела к индукции опосредованного MCP-1 воспалительного рекрутирования моноцитов, что впоследствии привело к IL-18-индуцированной продукции IFN- γ NK-клетками, которая подавляется второй волной IFN типа I.

Модульная структура систем доставки позволяет контролировать не только размер и заряд их комплексов с нуклеиновыми кислотами, но и изменять их свойства путем декорирования поверхности путем добавления различных липоконъюгатов [48]. Основные функции липоконъюгатов в липосомах направлены на обеспечение адресной доставки к определенным типам клеток, экспрессирующих соответствующие рецепторы, защиту

липосом и их комплексов от поглощения РЭС-клетками, агрегации и опсонизации, а также контроль их размера и поверхностного заряда.

Методы адресной доставки включают использование антител, аптамеров и лигандов рецепторов, экспрессируемых на поверхности клеток-мишеней; фолат является одним из наиболее широко используемых и изученных лигандов [406,407]. Как показано ранее в нашей лаборатории, липоконъюгат фолата в составе липосом с 2X3-DOPE, усиливает накопление siРНК в опухолевых клетках, которые экспрессируют рецепторы фолата [30]. В текущем исследовании мы доставили исРНК с помощью липосом, содержащих фолат, и обнаружили, что липоконъюгат фолата снижает эффективность индукции интерферона (рис. 12), указывая на то, что клетки, продуцирующие интерферон, не имеют повышенного уровня фолатных рецепторов. Выбрать конкретные лиганды для клеток, продуцирующих интерферон, пока не представляется возможным, поскольку на данном этапе исследования они не обнаружены для исРНК.

Чтобы увеличить время циркуляции и стабильность препарата в кровотоке, поверхность липосом была модифицирована путем добавления защитного слоя, состоящего из PEG [399]. Сравнение эффективности интерферон-индуцирующего действия исРНК в комплексах с липосомами, содержащими PEG-липоконъюгаты различной длины и структуры на мышах и на первичных культурах мононуклеарных клеток человека показало, что выбор наиболее оптимальных составов в определенной степени зависит от экспериментального объекта. В целом, предпочтительнее использовать липоконъюгаты с более длинным PEG, при этом увеличение плотности защитного слоя за счет увеличения содержания липоконъюгата или сворачивания его в петлеобразную структуру не дает видимого преимущества (рис. 12–14). Следует отметить, что липосомы, содержащие длинный PEG, демонстрируют существенное преимущество как по эффективности индукции интерферона в присутствии исРНК, так и по специфичности действия в отсутствие исРНК (рис. 14).

Кабилова и др. показали, что увеличение длины PEG в липосомах снижает эффективность их трансфекции в клетки *in vitro*, но увеличивает время циркуляции в кровотоке *in vivo* [37]. Последняя особенность может быть особенно важна из-за ее влияния на клетки организма, продуцирующие интерферон. Это согласуется с нашими данными, которые показали, что комплексы с липосомами P2000 индуцируют IFN- α у мышей значительно эффективнее, чем P1500 и P800 (рис. 12, 13). При трансфекции опухолевых клеток *in vitro* неПЕГирированными липосомами (2X3-DOPE) исРНК накапливались в клетках лучше, чем при использовании ПЕГирированных липосом (P2000).

Цитокиновое профилирование показало, что спектр цитокинов, активируемых исРНК в комплексе с липосомами, также зависит от состава липосом (рис. 13). Таким образом, наибольшая активация MCP-1, INF- α , β и γ происходит под действием комплексов исРНК с липосомами P1500 и P2000, тогда как комплексы исРНК с P800 вызывают значительную активацию MCP-1 и INF- γ , но не INF- α и β . Поскольку интерфероны I типа являются важными противовирусными и противоопухолевыми средствами, способность их активировать важна для системы доставки.

Все больше публикаций сообщают об использовании различных иммуностимулирующих нуклеиновых кислот в иммунотерапии и накопленные данные показывают, что использование разных систем доставки приводит к разным ответам [3,400,401,408]. В настоящем исследовании использование исРНК вызывало заметное повышение уровня IFN- γ в комплексе с липосомами P800 и P1500 по сравнению с контрольной группой (около 750 пг/мл). Это указывает на участие различных молекулярных сенсоров исРНК в зависимости от внутриклеточной локализации ИНК, доставляемого липосомальной системой; в этом случае нельзя исключить участие эндосомальных сенсоров, таких как TLR7/8 [402]. Благодаря своим мощным иммуностимулирующим свойствам агонисты TLR7/8 показали впечатляющие результаты в качестве средства противоопухолевой терапии при системном применении [409]. Поскольку эти рецепторы являются эндосомальными, их агонисты должны быть интернализованы в клетки, чтобы активировать их. В работе Obermann и др., наночастицы РНК, конъюгированной с холестерином (двучепочная версия иммуностимулирующей РНК40-хол) более эффективно индуцировали синтез интерферонов I типа плазмитоидными дендритными клетками человека и мыши, а также продукцию провоспалительных цитокинов (например, TNF- α , IL12p70 или IL-6) в моноцитах человека *in vitro* по сравнению с комплексами РНК/липосомы [410].

Важной мишенью для интерферон-индуцирующей терапии является RIG-I, который обнаруживает присутствие дцРНК с 5'-трифосфатом (3pRNA) в цитозоле и инициирует иммунный ответ для устранения источника патогена [3]. Синтетические молекулы дцРНК, образующие комплексы с различными системами доставки, изучались как его потенциальные активаторы. В исследовании, проведенном М. Jacobson и др., активация рецептора RIG-I с помощью 5'-3pRNA, доставляемой в составе полимерных наночастиц (PEG-блок-(DMAEMA-co-AnMA) полимерами, где AnMA представляет собой алкилметакрилатный мономер переменного состава в пределах от $n = 2-12$ атомов углерода) внутривенно [411]. Исследователи в этой работе идентифицировали четыре лидирующих

носителя (4–50, 6–40, 8–40 и 10–40, где первое число относится к длине алкильной цепи, а второе число относится к процентному содержанию гидрофобного мономера) использование которых значительно улучшило иммуностимулирующую активность 5'-трифосфатных РНК-лигандов RIG-I *in vitro* и *in vivo*. При использовании этих носителей лиганд вызывал активацию и демонстрировал заметное повышение уровней IFN- α в сыворотке и повышенную экспрессию *Ifnb1* и *Cxcl10* в основных органах выведения.

PKR — еще один важный сенсор, распознающий исРНК [412]. Ранее в нашей лаборатории было показано, что использование ингибитора белка PKR 2-аминопурина или шпилечной РНК, нацеленной на ген *PKR*, предотвращает антипролиферативное действие исРНК на опухолевые клетки при доставке с 2X3-DOPE [142]. В предыдущей работе была доказана противоопухолевая и антипролиферативная активность исРНК, доставляемой липосомами 2X3-DOPE или Липофектамином 2000, в отношении меланомы и гепатомы, вызывающая уменьшение размера опухоли по сравнению с контрольной группой, а так же антиметастатическая активность, при этом наблюдаемый эффект коррелировал с эффективностью трансфекции [38]. В другой работе было показано, что использование РЕГилированных липосом для доставки исРНК дает преимущество в противовирусной активности и повышает эффективность подавления развития гриппозной инфекции у мышей, причем наблюдаемый эффект коррелирует с эффективностью индукции интерферона [413].

Мы сравнили антипролиферативный и противоопухолевый эффекты систем доставки с противоположными эффектами (2X3-DOPE и P2000) на моделях меланомы B16 и лимфосаркомы RLS, чтобы определить, является ли более важным для этого эффекта способность активировать продукцию интерферона или эффективность трансфекции. Установлено, что комплексы исРНК/2X3-DOPE оказывают выраженное антипролиферативное действие на B16 *in vitro*, а также противоопухолевый и гепатопротекторный эффект *in vivo* (рис. 17, 18), тогда как исРНК/P2000 вызывает умеренное снижение размера опухоли по сравнению с нелечеными мышами, а также оказывало незначительное антипролиферативное действие *in vitro*. Полученные результаты показали, что прямое воздействие на опухолевые клетки оказывает более существенное влияние на рост опухоли, чем индукция интерферона и активация иммунной системы. Таким образом, можно сделать вывод, что основным механизмом противоопухолевого действия комплексов исРНК/липосомы на опухоли B16 является снижение опухолевого роста за счет прямого антипролиферативного действия исРНК на опухолевые клетки. Этот эффект связан с замедлением скорости роста клеток или даже полной его остановкой под

действием исРНК за счет активации врожденной иммунной системы. Ранее было продемонстрировано, что избирательное ингибирование генов PKR и RIG-I в клетках человека KB-3-1 и A549 предотвращает антипролиферативный эффект исРНК, хотя экспрессия MDA5 и IRF3 не является критической для этого эффекта [142].

Мы обнаружили, что одна из выбранных нами моделей опухоли – лимфосаркома RLS40 – не реагировала на комплексы исРНК с исследуемыми липосомами (рис. 17) и не активировала экспрессию маркера иммунного ответа *Pkr* (рис. 16). Данная ситуация отражает ситуацию, наблюдаемую в клинической практике, где есть «отвечающие» и «неотвечающие» на определенные виды лечения опухоли [414]. Причина этого в данном случае не была выяснена в настоящем исследовании; вероятно, это может быть связано как с тканевым происхождением опухолевых клеток, так и с менее эффективным накоплением в них комплексов исРНК (рис. 15). Система доставки не проявила токсических эффектов и доказала свою способность активировать врожденный иммунитет; следовательно, ее можно рассматривать как потенциальный компонент препаратов для лечения меланомы.

В ходе проведенного исследования мы продемонстрировали, что структура системы доставки играет жизненно важную роль в определении иммунного ответа на исРНК; добавление липоконъюгатов позволяет изменить спектр и уровень эффектов иммуностимулирующей РНК и позволяет выбирать систему доставки в зависимости от желаемого эффекта.

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

исРНК активирует врожденную иммунную систему путем взаимодействия с паттерн-распознающими PRR [3,415]. Эти рецепторы распознают специфические мотивы РНК и запускают иммунные реакции, индуцируя выработку цитокинов, таких как интерфероны и интерлейкины [16]. РНК по своей природе нестабильна из-за эндо/экзорибонуклеаз, присутствующих в жидкостях организма, таких как сыворотка крови [8], которые могут расщеплять молекулу РНК по разным положениям, что приводит к ее деградации и потере биологической активности [12]. Чтобы защитить исРНК, исследователи активно пытались разработать защитные составы, такие как липидные наночастицы для ее доставки [10]. Другой подход к повышению устойчивости исРНК к нуклеазам основан на химической модификации ее рибозо-фосфатного остова [11].

Целью данной части исследований было определение влияния химических модификаций (2'-F, 2'-OMe, PS, холестерин, amino), расположенным в разных позициях

исРНК, на сохранение ее способности активировать систему врожденного иммунитета. Модифицированные дуплексы были синтезированы к.х.н. М.И. Мещаниновой (ЛХРНК ИХБФМ СО РАН).

3.3.1. Дуплексы исРНК и дизайн эксперимента

Многочисленные предыдущие исследования продемонстрировали эффективность аналогов нуклеотидов с химическими модификациями в 2'-положении рибозного кольца для повышения устойчивости siРНК к расщеплению нуклеазами. Однако было показано, что введение многочисленных модификаций в siРНК может поставить под угрозу ее функциональную эффективность [349]. Следовательно, систематическое исследование типа, количества и положения модификаций в цепях исРНК становится актуальным. В siРНК обычно используются следующие модификации: 2'-F и 2'-ОМе, PS-модификации, присоединение аминогруппы и холестерина на 5'- и 3'-концах (табл. 10). Выбранные нами схемы модификации 2'-F и 2'-ОМе основаны на предпочтительной модификации сайтов CpA, UpA, UpG, легко расщепляемых эндорибонуклеазами, аналогично разработанному нами алгоритму селективной модификации для siРНК [416]. Эти идентифицированные сайты были подвергнуты модификации 2'-F в паттерне F1, который содержал 7 модификаций в двух цепях. Наложение этой закономерности на ранее полученные данные показывает, что некоторые модификации расположены в сайтах, в которых нуклеотидные замены влияют на иммуностимулирующие свойства, поэтому в паттернах M (с 2'-ОМе) и F2 (с 2'-F) модификации в этих местах были удалены и эти паттерны содержали по 4 модификации в обеих цепях (табл. 10).

Фосфоротиоатная (PS) модификация олигонуклеотидов имеет решающее значение для улучшения их фармакологических свойств. Модификация 2-х межнуклеотидных фосфатов на обоих концах цепей siРНК успешно используется для защиты их от действия экзонуклеаз. Хотя олигонуклеотиды, несущие модификацию PS, демонстрируют повышенную аффинность связывания с белками, их влияние на взаимодействие олигорибонуклеотидов с PRR не выяснено, поэтому мы синтезировали цепи, содержащие по 2 PS на обоих концах одновременно (S), только на 3'- или 5'-концах (S3 и S5, соответственно) или в середине (SM) цепей (табл. 1).

Немодифицированный дуплекс исРНК обычно обладает молекулярной массой ниже порога почечной фильтрации (30–50 кДа), что приводит к быстрому выведению его из кровотока, тем самым снижая его терапевтический потенциал. Чтобы избежать почечного клиренса и повысить стабильность против экзонуклеаз, были изучены различные стратегии,

включая конъюгацию объемных фрагментов, таких как холестерин, к 5'- или 3'-концам цепей РНК (Ch- и -Ch соответственно). Здесь мы исследуем влияние этих концевых модификаций на активность исРНК при соединении холестерина на 3'- или 5'-конце цепей через гексаметиленовый линкер. Холестерин представляет собой довольно объемную гидрофобную модификацию и может влиять на биологические эффекты посредством различных механизмов; поэтому для оценки переносимости концевых модификаций мы использовали небольшую модификацию - аминогруппу, присоединенную через аналогичный линкер (-NH₂), которая, однако, может способствовать защите от экзонуклеаз (табл. 10). Паттерны модификаций, содержащие модификации PS, Ch и NH₂, накладывались на F2 или немодифицированную N-основу. Для изучения биологической активности были получены дуплексы, содержащие цепь 1 и цепь 2 с одинаковым или разными модификациями (табл. 10).

Иммуностимулирующая РНК (исРНК) проявляла активность как индуктор интерферонов I типа, в частности IFN- α , а также как агент со значительной антипролиферативной и противоопухолевой активностью. Чтобы оценить влияние вышеупомянутых модификаций на биологическую активность исРНК, мы отдельно исследовали их влияние на интерферон-индуцирующую активность на мышах СВА и антипролиферативную активность в культуре клеток меланомы В16 (Рис. 20). Ранее мы показали, что для проявления биологической активности исРНК необходимо обеспечить ее внутриклеточную доставку к клеткам-мишеням; поэтому в обоих случаях мы использовали комплексообразование исРНК с катионными липосомами 2X3-DOPE, которые высокоэффективны как *in vitro*, так и *in vivo* и действуют в присутствии сыворотки.

Таблица 10. Последовательности исРНК и ее модифицированных аналогов.

Обозначение	Последовательность ¹	
	Первая цепь	Вторая цепь
N	GUGUCAGGCUUUCAGAUUUUUU	AAAUCUGAAAGCCUGACACUUU
M	GUGUCmAGGCUUUCmAGAUUUUUU	AAAUCUmGAAAGCCUmGACACUUU
F1	GUfGUCfAGGCUUUCfAGAUUUUUU	AAAUCUfGAAAGCCUfGACfACUUFa
F2	GUGUCfAGGCUUUCfAGAUUUUUU	AAAUCUfGAAAGCCUfGACACUUU
F2_S	GsUsGUCfAGGCUUUCfAGAUUUUsUsU	AsAsAUCUfGAAAGCCUfGACACUsUsU
F2_S3	GUGUCfAGGCUUUCfAGAUUUUsUsU	AAAUCUfGAAAGCCUfGACACUsUsU
F2_S5	GsUsGUCfAGGCUUUCfAGAUUUUUU	AsAsAUCUfGAAAGCCUfGACACUUU

F2_SM	GUGUCfAGGCU <u>sUsUC</u> fAGAUUUUUU	AAAUCUfGA <u>sAsAGCCU</u> fGACACUUU
Ch-F2	Ch-GUGUCfAGGCUUUCfAGAUUUUUU	Ch-AAAUCUfGAAAGCCUfGACACUUU
Ch-F2_S3	Ch-GUGUCfAGGCUUUCfAGAUUUUsUsU	Ch-AAAUCUfGAAAGCCUfGACACUsUsU
F2-NH2	GUGUCfAGGCUUUCfAGAUUUUUU-NH2	AAAUCUfGAAAGCCUfGACACUUU-NH2
F2-Ch	GUGUCfAGGCUUUCfAGAUUUUUU-Ch	AAAUCUfGAAAGCCUfGACACUUU-Ch
Ch-N	Ch-GUGUCAGGCUUUCAGAUUUUUU	Ch-AAAUCUGAAAGCCUGACACUUU

¹Последовательности представлены в направлении 5'–3': Cm, Um – 2'-О-метилмодифицированные нуклеотиды; Cf, Uf – 2'-фтормодифицированные нуклеотиды; s – фосфоротиоатная модификация; Ch – остаток холестерина, присоединенный к 5'- или 3'-концу первой и второй цепи через гексаметилендиаминовый или сериоловый линкер соответственно; NH2 – гексаметиленамин. Обозначения цепей содержат указания на состав входящих в них модификаций; N, M, F1 и F2 обозначают соответственно немодифицированные 2'-ОМе и 2'-F (паттерны F1 и F2); 5'-концевые модификации указаны слева от обозначения (Ch-); 3'-концевые модификации указаны справа (-Ch, -NH2); модификации фосфатной группы обозначены подчеркиванием и указывают их 5'-(S5), 3'-(S3) и среднее (SM) расположение. Далее дуплексы даны как 1 цепь/2 цепи.

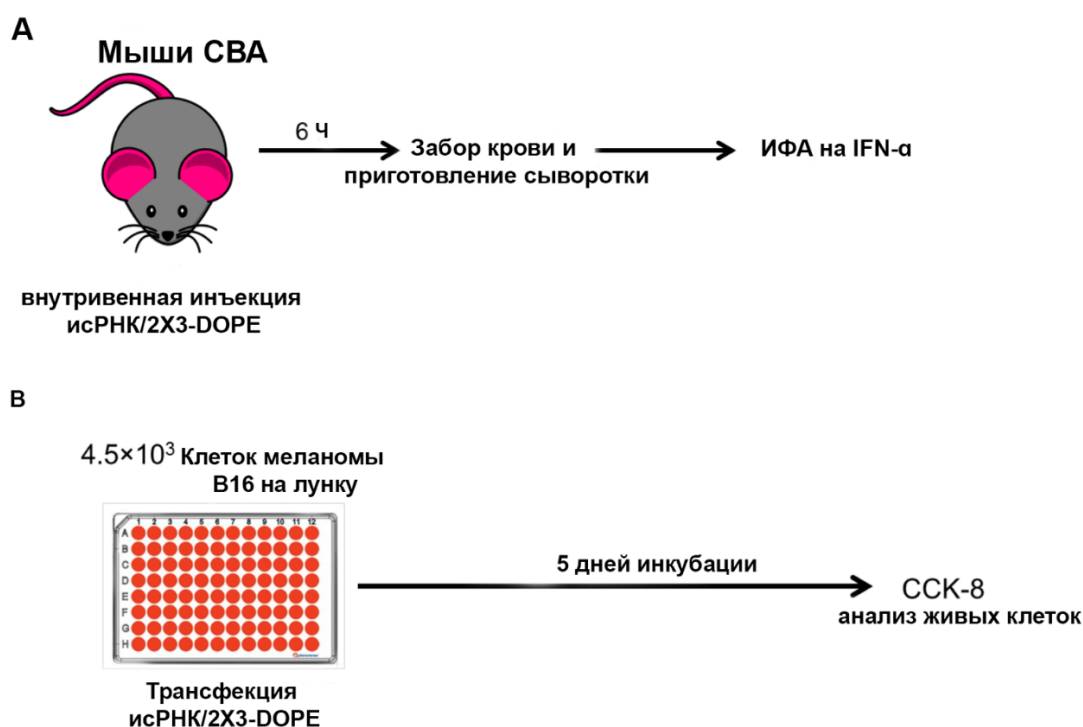


Рисунок 20. Схемы экспериментов *in vivo* (А) и *in vitro* (Б).

3.3.2. Оценка влияния химических модификаций в составе исРНК *in vivo*

Группам мышей СВА (n=3) вводили внутривенно модифицированную исРНК в комплексе с 2X3-DOPE, для выяснения влияния различных модификаций исРНК на уровни

IFN- α . После шестичасового интервала были собраны образцы крови и получены сыворотки для анализа ELISA (рис. 20A).

Структурные изменения, внесенные в 2'-положение рибозного фрагмента в основной цепи исРНК, продемонстрировали их заметное влияние на синтез IFN- α в крови мышей при введении таких дуплексов. Немодифицированная исРНК N/N вызывает 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. 21). 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 превосходит уровень, индуцированный немодифицированной исРНК. Примечательно, что включение 2'-ОМе модификаций в тех же позициях (М/М) полностью лишало дуплекс интерферон-индуцирующей активности. Таким образом, для изучения влияния терминальных модификаций мы выбрали 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. Интересно, что 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 21.

Последующее исследование последовало, 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/ч). 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. И наоборот, 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 21. Наконец, введение аминогруппы (-NH₂) на 3'-концах обеих цепей дуплекса наряду с модификацией F2 (F2-NH₂/F2-NH₂), вызвало заметное повышение уровня IFN- α (1320 ± 96 пг/мл) (Рис. 21).

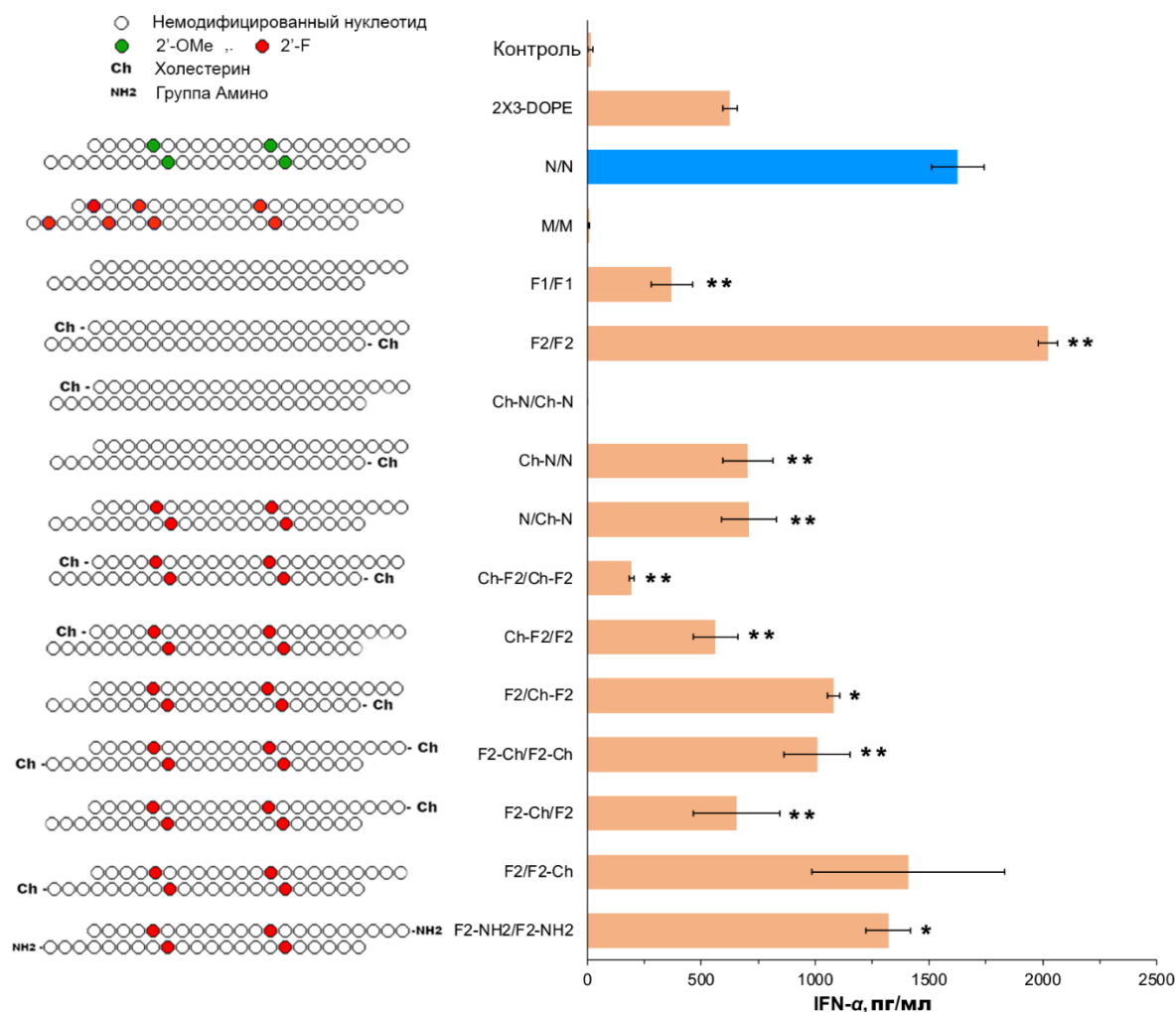


Рисунок 21. Влияние концевых и 2'- модификаций исРНК на продукцию IFN- α у мышей СВА ($n = 3$) через 6 ч после внутривенного введения комплексов исРНК/липосомы. Уровни IFN- α в сыворотке крови измеряли с помощью ELISA. Данные представляют собой среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, рассчитанное на основе трех независимых экспериментов, измеренных в двух повторах. 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 набор дуплексов был расширен с целью изучения влияния связей PS в остове F2/F2 на интерферон-индуцирующую активность соответствующих исРНК (рис. 22). Введение двух PS групп на обоих концах обеих цепей (F2_S/F2_S) или только одной цепи (F2_S/F2 и F2/F2_S), а также двух модификаций PS на 5'-концах обеих цепей (F2_S5/F2_S5) приводило к полной блокаде синтеза IFN- α , о чем свидетельствуют результаты, представленные на рисунке 22.

Введение модификации вблизи 3'-конца обеих цепей (F2_S3/F2_S3) вызывало умеренный интерфероновый ответ, примерно 707 пг/мл, что более чем в два раза меньше, чем наблюдалось для F2/F2. Аналогично, та же модификация, примененная к 5'-

холестериновому дуплексу с низкой активностью (Ch-F2_S3/Ch-F2_S3), приводит к полной потере его интерферон-индуцирующей активности. И наоборот, гетеродуплексы, содержащие модификацию 2 PS только на 3'-конце второй цепи (F2/F2_S3), обеспечивали более высокие уровни IFN- α (993 ± 92 пг/мл), чем те, которые содержали аналогичные модификации 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) привела к небольшому, хотя и статистически недостоверному, повышению уровня IFN- α (432 ± 87 пг/мл), что уступает эффективность активации IFN- α под действием вариантов F2_S3, как показано на рисунке 22.

Последующее введение модификаций PS на 5'-концах исРНК, одновременно с модификацией F2, выявило заслуживающие внимания наблюдения. 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) (рис. 22).

На основании приведенных выше результатов можно сделать вывод, что паттерн модификации F2 сам по себе (F2/F2) или в сочетании с PS на 5'-конце первой цепи (F2_S5/F2) оказывается эффективным, 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 .

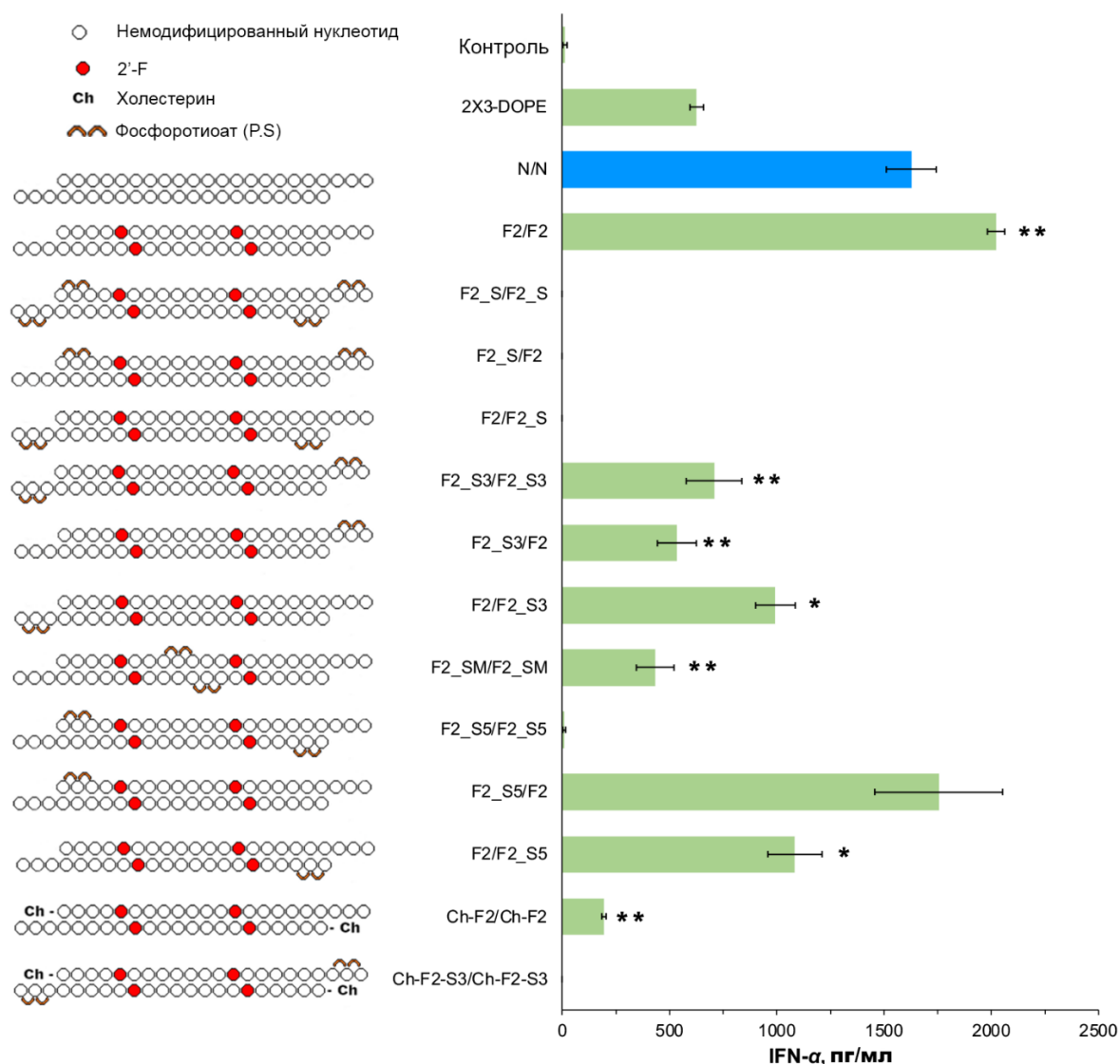


Рисунок 22. Влияние модификаций PS в исРНК на продукцию IFN-α у мышей СВА ($n = 3$) через 6 ч после внутривенного введения комплексов исРНК/липосомы. Уровни IFN-α в сыворотке измеряли с помощью ELISA. Данные представляют собой среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (SD), рассчитанное на основе 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.

3.3.3. Оценка влияния химических модификаций на антипролиферативную активность исРНК *in vitro*

Чтобы выяснить влияние химических модификаций на антипролиферативную эффективность исРНК, клетки меланомы В16 мышей высевали с плотностью $4,5 \times 10^3$ клеток на лунку 96-луночного планшета и трансфицировали химически модифицированной исРНК в комплексе с 2X3-DOPE в трех различных концентрациях (25, 50 и 100 нМ). Эти культуры поддерживали в течение 5 дней при ежедневном контроле для исключения перероста.

Анализ с помощью ССК-8 использовали для оценки количества живых клеток, а значения IC50 использовали в качестве параметра, отражающего влияние 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, что давало значение IC50 68 нМ. Примечательно, что модификации, введенные в 2'-положение рибозного фрагмента исРНК, оказали значительное влияние на ее активность.

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'-OMe-содержащий дуплекс (M/M) вызывал заметное ингибирование с эффективностью, сравнимой с эффективностью немодифицированного дуплекса, со значением IC50 67.2 нМ (рис. 23).

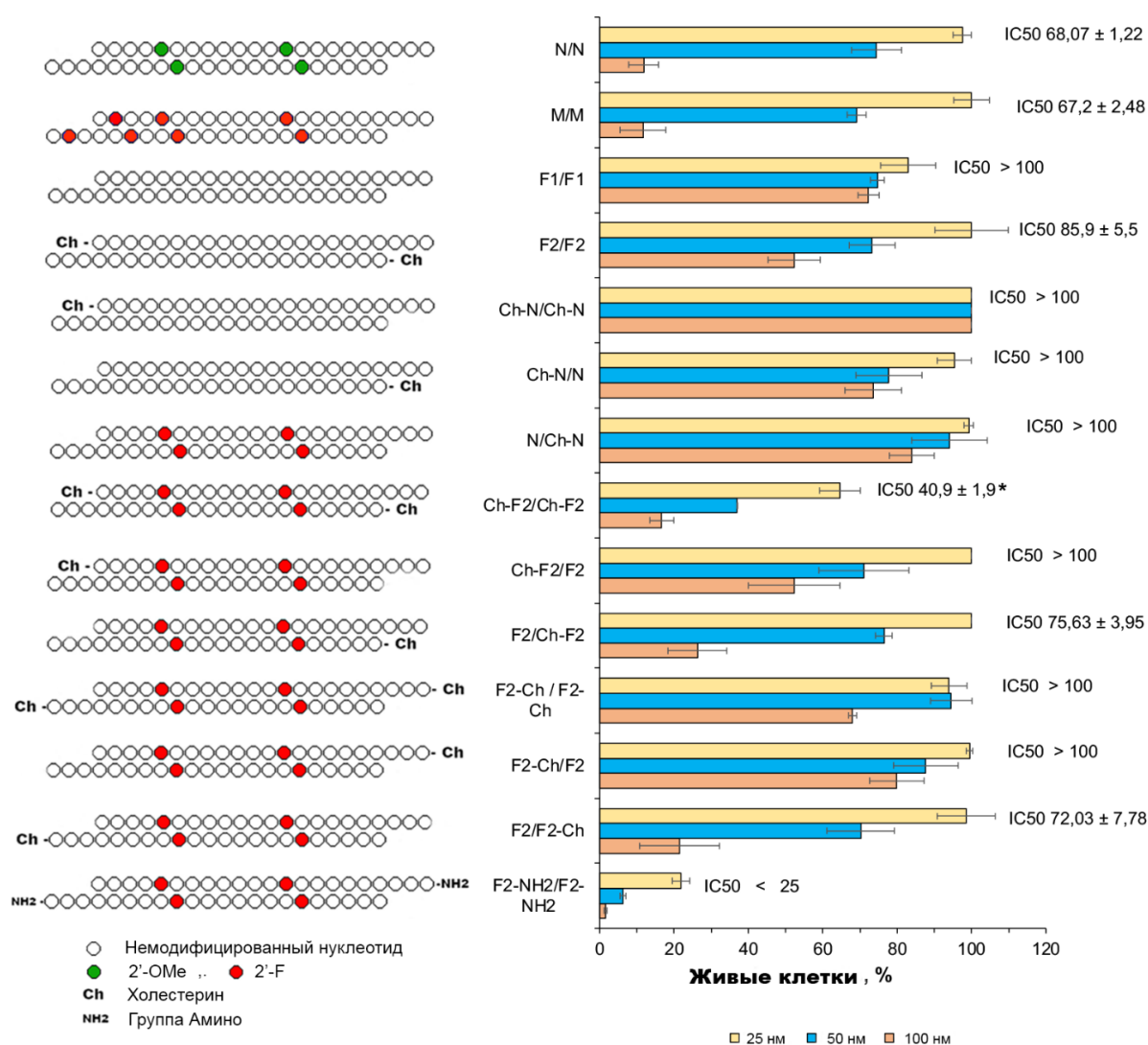


Рисунок 23. Влияние концевых и 2'-рибозных модификаций исРНК на антипролиферативную активность исРНК в клетках меланомы B16. Относительную жизнеспособность клеток оценивали с помощью анализа ССК-8. Данные представлены как средние значения ± стандартные отклонения (SD), полученные в результате независимых 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 в случае, когда холестерин присоединен к одной цепи, или к полной потере активности в случае, когда холестерин присоединялся к обеим цепям (рис. 23). 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) (рис. 23).

Наиболее эффективной модификацией оказалось введение аминогруппы на 3'-концах обеих цепей в сочетании с паттерном F2 (F2-NH₂/F2-NH₂): дуплекс с такими модификациями вызывал сильное ингибирование пролиферации даже при самой низкой концентрации, со значением IC₅₀ ниже 25 нМ. (Рисунок 23).

Последующие исследования были сосредоточены на применении паттерна F2 в сочетании с введением PS в различных положениях цепей. 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. 24).

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 24. 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. 23,24).

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.

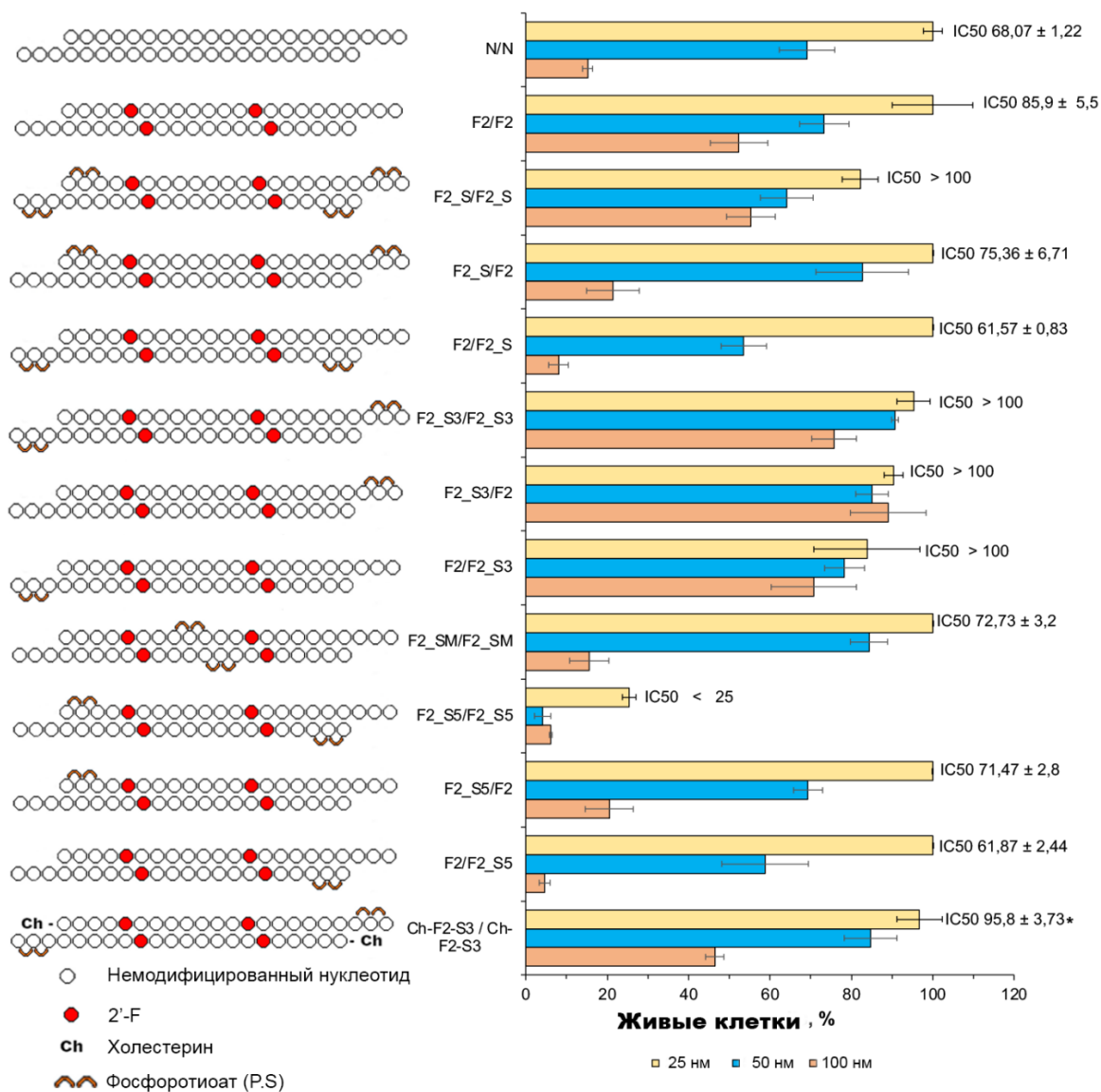


Рисунок 24. Влияние модификаций PS в исРНК на антипролиферативную активность исРНК в клетках меланомы B16. Относительную жизнеспособность клеток оценивали с помощью анализа ССК-8. Данные представлены как средние значения ± стандартные отклонения (SD), полученные в результате независимых экспериментов. 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.

Влияние химических модификаций на неспецифические иммуностимулирующие свойства терапевтических РНК, включая мРНК вакцины и siРНК стало важным предметом

обширных исследований. Цель таких исследований — предотвратить нежелательную активацию врожденного иммунитета и связанные с ней неспецифические эффекты, повысить специфичность действия и снизить токсичность препаратов на основе нуклеиновых кислот. Противоположная задача — поддержание иммуностимулирующей активности иммуностимулирующих РНК и ДНК — как правило, остается вне сферы интересов исследователей, несмотря на то что иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты активно изучаются как средства для лечения опухолевых и инфекционных заболеваний, а также как адъюванты.

Накапливающиеся данные свидетельствуют о способности немодифицированных дуплексов siРНК вызывать активацию врожденного иммунного ответа млекопитающих, приводящего к выработке воспалительных цитокинов и интерферонов [119]. Этот феномен, в основном, обеспечивается популяциями иммунных клеток, активирующихся через сигнальные каскады Toll-подобных рецепторов [119,417]. Однако, даже в неиммунных клетках, такие дуплексы вызывают глобальные изменения профиля экспрессии генов, влияя на пролиферацию, транскрипцию, трансляцию и другие клеточные функции. Детальное исследование выявляет ключевую роль специфичности последовательности и структурных особенностей в регулировании иммуногенности siРНК [119,418,419], одновременно проливая свет на перспективность стратегий химической модификации для смягчения нецелевых эффектов.

Было продемонстрировано, что химические модификации, включая замены 2'-ОМе и 2'-F, оказывают заметное влияние на иммуностимулирующие свойства siРНК [420]. Исследование показало, что активация иммунного ответа комплексами siРНК/липосомы на мышинных моделях выходит за рамки простой специфичности последовательности. Примечательно, что все 12 исследованных немодифицированных дуплексов siРНК вызывали сильное выделение цитокинов, включая IFN- α , что подчеркивает независимость иммунной активации от контекста последовательности. Однако при воздействии различных комбинаций 2'-ОМе, 2'-F и фосфоротиоатных замен было показано, что введение 3 замен 2'-ОМе только в смысловой цепи было достаточным для ослабления иммунной активации, запускаемой дуплексами siРНК. Примечательно, что эти модификации продемонстрировали пониженную эффективность в смягчении иммунного ответа, вызываемого одноцепочечными siРНК. Это наблюдение предполагает, что химические модификации siРНК является перспективной стратегией для предотвращения нежелательной иммунной активации терапевтическими siРНК или, наоборот, для усиления иммунной активации в контексте иммуностимулирующей РНК. Исследование показало, что

передача сигналов Toll-подобного рецептора 3 (TLR3) не участвует в иммунной стимуляции комплексами siРНК/липосомы, что приводит к сильной иммунной активации, наблюдаемой у мышей с нокаутом TLR3 при введении siРНК [420]. В сфере разработки мРНК-вакцин предотвращение неспецифического иммунного ответа представляет собой ключевую задачу, требующую сложных химических модификаций. Примечательно, что специализированные модификации, разработанные для молекул мРНК помогают поддерживать ее стабильность и одновременно снизить ее иммуногенность. Краеугольным камнем в этом стремлении является стратегическое включение модифицированных нуклеозидов, таких как псевдоуридин или 5-метилцитидин, которые продемонстрировали выраженную эффективность в блокировании врожденного иммунного ответа на мРНК, тем самым повышая эффективность ее трансляции [421].

В предыдущем исследовании, проведенном нашей исследовательской группой [15], обширный анализ зависимых от последовательности иммуностимулирующих свойств исРНК в рамках настоящего исследования был проведен как *in vivo*, так и *in vitro*. Это комплексное исследование включало преднамеренное введение замен и вставок в различные положения нуклеотидных цепей с целью выяснения областей, которые важны для ее активности, а также тех, которые допускают изменения. Были идентифицированы области дуплекса, чувствительные и нечувствительные к нуклеотидным заменам, в контексте антипролиферативного действия исРНК. Основываясь на этих результатах, настоящее исследование пытается расширить эти результаты путем введения химических модификаций в идентифицированных локусах с главной целью - определить как блокирующие активность, так и оптимальные положения, способствующие повышению функциональности.

В соответствии с результатами, описанными в научной литературе, наши наблюдения подтверждают, что модификации 2'-рибозы, включая модификации 2'-ОМе и 2'-F, могут препятствовать иммунному ответу. Полученные данные показали, что влияние этих модификаций на ингибирование иммунной активации позиционно-специфично: ингибирующий эффект оказывают модификации в позициях, принадлежащих «чувствительной к заменам» зоне, а модификации в «нечувствительных к заменам» зонах хорошо переносятся. Наши данные показали, что паттерн модификации F2 продемонстрировал заметную эффективность, что делает его оптимальным кандидатом для последующего исследования, особенно в сочетании с другими модификациями (рис. 21, 23).

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 (рис. 21, 23).

Введение фосфоротиоатных модификаций существенно снижает или даже блокирует иммуностимулирующую активность исРНК, особенно когда обе цепи модифицированы с обоих концов. Модификации PS в середине цепей или на 3'-конце проявляют определенную толерантность, не препятствуя активности исРНК. Такие дуплексы с модификациями PS вызывали индукцию IFN- α , сопровождавшуюся умеренным антипролиферативным действием против опухолевых клеток B16, хотя и менее эффективным по сравнению с неизмененными N/N или F2/F2.

Предыдущие исследования подчеркнули ингибирующее действие нуклеотидных замен на 3'-конце на функциональность исРНК. Наше нынешнее исследование расширяет эти наблюдения, обнаруживая выраженное влияние объемных химических модификаций 3'-конца на функцию исРНК. Это подчеркивает ключевую роль этого положения в распознавании исРНК путем связывания белков или клеточных рецепторов, тем самым вызывая иммунный ответ.

Комбинация структуры F2 с включением холестерина на 5'-конце обеих цепей заметно ослабляет синтез IFN- α со сниженным воздействием при ограничении первой цепи и незначительным эффектом при ограничении второй цепи. И наоборот, включение одной и той же модификации в обе цепи значительно усиливало антипролиферативную функцию, причем повышенная эффективность отмечалась при избирательной интеграции во вторую цепь. Аналогичным образом, комбинация F2 с PS вблизи 5'-концов обеих цепей приводила к блокаде индукции IFN- α , тогда как одностороннее введение демонстрировало менее выраженный эффект. Анализ *in vitro* подтвердил эти тенденции, выявив мощное ингибирование роста опухолевых клеток при введении этих модификаций в обе цепи, с повышенной эффективностью, наблюдаемой при избирательной интеграции во вторую цепь (рис. 22, 24).

В исследовании, проведенном Кабиловой и соавт. [15] было выяснено, что замена концевого нуклеотида на 3'-конце нуклеотидной цепи сохраняет активность только при замене в первой цепи. Более того, было обнаружено, что добавление нескольких нуклеотидов к 3'-концам препятствует биологической активности, тогда как добавление одного является допустимым в рамках эксперимента. Аналогично, в рамках нашего

исследования применение паттерна F2 в сочетании с холестерином или фосфоротиоатом на 3'-концах обеих цепей не отменяло индукцию интерферона; однако она оказалась менее эффективной по сравнению с немодифицированной N/N или F2/F2. Примечательно, что введение этих модификаций в первую цепь снижало активность, тогда как их включение во вторую цепь наоборот ее повышало.

Особый интерес представляет усиление интерферон-индуцирующей активности и усиление антипролиферативного эффекта, наблюдаемое при введении группы NH₂ на 3'-концы обеих цепей в сочетании с паттерном F2. Это улучшение можно объяснить относительно небольшим размером группы NH₂ по сравнению с холестерином, что приводит к лучшей переносимости в сочетании с защитой дуплекса от действия экзорибонуклеаз.

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) становятся 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, переменная 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 распространяться на обеспечение 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, индуцированных 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 цитокининдуцирующие, антипролиферативные, и противоопухолевую активность исРНК обнаружено, что значительная активация и продукция MCP-1 и INF- α , β и γ у мышей CBA 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 выбирать 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. Двукратное 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.

Список литературы

1. Sridharan K., Gogtay N.J. Therapeutic nucleic acids: current clinical status: 3 // *Br J Clin Pharmacol*. 2016. Vol. 82, № 3. P. 659–672.
2. Okude H., Ori D., Kawai T. Signaling Through Nucleic Acid Sensors and Their Roles in Inflammatory Diseases // *Frontiers in Immunology*. 2021. Vol. 11.
3. 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.
4. Hasan U.A. et al. Cell proliferation and survival induced by Toll-like receptors is antagonized by type I IFNs: 19 // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. Vol. 104, № 19. P. 8047–8052.
5. Kolate A. et al. PEG - a versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems // *J Control Release*. 2014. Vol. 192. P. 67–81.
6. Samaridou E., Heyes J., Lutwyche P. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Current perspectives // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2020. Vol. 154–155. P. 37–63.
7. Tran P. et al. Delivery of Oligonucleotides: Efficiency with Lipid Conjugation and Clinical Outcome: 2 // *Pharmaceutics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2022. Vol. 14, № 2. P. 342.
8. Wadhwa A. et al. Opportunities and Challenges in the Delivery of mRNA-Based Vaccines: 2 // *Pharmaceutics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020. Vol. 12, № 2. P. 102.
9. Yen A. et al. Serum Nuclease Susceptibility of mRNA Cargo in Condensed Polyplexes // *Mol Pharm*. 2018. Vol. 15, № 6. P. 2268–2276.
10. Aldosari B.N., Alfagih I.M., Almurshedi A.S. Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for RNA-Based Vaccines // *Pharmaceutics*. 2021. Vol. 13, № 2. P. 206.
11. Chernikov I.V., Ponomareva U.A., Chernolovskaya E.L. Structural Modifications of siRNA Improve Its Performance In Vivo // *Int J Mol Sci*. 2023. Vol. 24, № 2. P. 956.
12. Khvorova A., Watts J.K. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility // *Nat Biotechnol*. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 35, № 3. P. 238–248.
13. Sioud M., Furset G., Cekaite L. Suppression of immunostimulatory siRNA-driven innate immune activation by 2'-modified RNAs // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007. Vol. 361, № 1. P. 122–126.

14. Anwar S., Mir F., Yokota T. Enhancing the Effectiveness of Oligonucleotide Therapeutics Using Cell-Penetrating Peptide Conjugation, Chemical Modification, and Carrier-Based Delivery Strategies: 4 // *Pharmaceutics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2023. Vol. 15, № 4. P. 1130.
15. Kabilova T.O. et al. Short double-stranded RNA with immunostimulatory activity: sequence dependence: 3 // *Nucleic Acid Ther.* 2012. Vol. 22, № 3. P. 196–204.
16. 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.
17. Song X. et al. All-transretinoic acid ameliorates bleomycin-induced lung fibrosis by downregulating the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway in rats // *Lab Invest*. 2013. Vol. 93, № 11. P. 1219–1231.
18. Miao L., Zhang Y., Huang L. mRNA vaccine for cancer immunotherapy // *Molecular Cancer*. 2021. Vol. 20, № 1. P. 41.
19. Kciuk M. et al. Recent Advances in Molecular Mechanisms of Cancer Immunotherapy // *Cancers (Basel)*. 2023. Vol. 15, № 10. P. 2721.
20. Chehelgerdi M., Chehelgerdi M. The use of RNA-based treatments in the field of cancer immunotherapy // *Molecular Cancer*. 2023. Vol. 22, № 1. P. 106.
21. Long B., Brém E., Koyfman A. Oncologic Emergencies: Immune-Based Cancer Therapies and Complications // *West J Emerg Med*. 2020. Vol. 21, № 3. P. 566–580.
22. Wallis R.S. et al. Host-directed immunotherapy of viral and bacterial infections: past, present and future // *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group, 2023. Vol. 23, № 2. P. 121–133.
23. Dolton G. et al. Targeting of multiple tumor-associated antigens by individual T cell receptors during successful cancer immunotherapy // *Cell*. 2023. Vol. 186, № 16. P. 3333–3349.e27.
24. Maksym R.B. et al. Immunology and Immunotherapy of Endometriosis // *J Clin Med*. 2021. Vol. 10, № 24. P. 5879.
25. Ye F. et al. Advancements in clinical aspects of targeted therapy and immunotherapy in breast cancer // *Mol Cancer*. 2023. Vol. 22. P. 105.
26. Bagchi S., Yuan R., Engleman E.G. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Cancer: Clinical Impact and Mechanisms of Response and Resistance // *Annu Rev Pathol*. 2021. Vol. 16. P. 223–249.
27. Christofi T. et al. Current Perspectives in Cancer Immunotherapy // *Cancers (Basel)*. 2019. Vol. 11, № 10. P. 1472.

28. Posner J. et al. Monoclonal Antibodies: Past, Present and Future // *Handb Exp Pharmacol*. 2019. Vol. 260. P. 81–141.
29. Mullard A. FDA approves 100th monoclonal antibody product // *Nat Rev Drug Discov*. 2021. Vol. 20, № 7. P. 491–495.
30. Baldo B.A. Side effects of cytokines approved for therapy // *Drug Saf*. 2014. Vol. 37, № 11. P. 921–943.
31. Berraondo P. et al. Cytokines in clinical cancer immunotherapy // *Br J Cancer*. 2019. Vol. 120, № 1. P. 6–15.
32. 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.
33. Mian M.F. et al. Length of dsRNA (poly I:C) drives distinct innate immune responses, depending on the cell type // *J Leukoc Biol*. 2013. Vol. 94, № 5. P. 1025–1036.
34. Owen A.M. et al. TLR Agonists as Mediators of Trained Immunity: Mechanistic Insight and Immunotherapeutic Potential to Combat Infection // *Front. Immunol*. Frontiers, 2021. Vol. 11.
35. Chowdhury D., Novina C.D. RNAi and RNA-Based Regulation of Immune System Function // *Advances in Immunology*. Academic Press, 2005. Vol. 88. P. 267–292.
36. Żarczyńska M., Żarczyński P., Tomsia M. Nucleic Acids Persistence—Benefits and Limitations in Forensic Genetics // *Genes (Basel)*. 2023. Vol. 14, № 8. P. 1643.
37. Kabilova T. et al. Novel PEGylated Liposomes Enhance Immunostimulating Activity of isRNA: 12 // *Molecules*. 2018. Vol. 23, № 12. P. 3101.
38. Kabilova T.O. et al. Antitumor and Antimetastatic Effect of Small Immunostimulatory RNA against B16 Melanoma in Mice // *PLoS One*. 2016. Vol. 11, № 3. P. e0150751.
39. Zong Y. et al. Lipid Nanoparticle (LNP) Enables mRNA Delivery for Cancer Therapy // *Advanced Materials*. 2023. Vol. 35, № 51. P. 2303261.
40. Bitounis D. et al. Strategies to reduce the risks of mRNA drug and vaccine toxicity // *Nat Rev Drug Discov*. 2024. Vol. 23, № 4. P. 281–300.
41. Gladkikh D.V. et al. Folate-Equipped Cationic Liposomes Deliver Anti-MDR1-siRNA to the Tumor and Increase the Efficiency of Chemotherapy: 8 // *Pharmaceutics*. 2021. Vol. 13, № 8. P. 1252.
42. Durymanov M., Reineke J. Non-viral Delivery of Nucleic Acids: Insight Into Mechanisms of Overcoming Intracellular Barriers // *Front. Pharmacol*. Frontiers, 2018. Vol. 9.

43. Peng L., Wagner E. Polymeric Carriers for Nucleic Acid Delivery: Current Designs and Future Directions // *Biomacromolecules*. 2019. Vol. 20, № 10. P. 3613–3626.
44. Torres-Vanegas J.D., Cruz J.C., Reyes L.H. Delivery Systems for Nucleic Acids and Proteins: Barriers, Cell Capture Pathways and Nanocarriers: 3 // *Pharmaceutics*. 2021. Vol. 13, № 3. P. 428.
45. Jiang X. et al. Oral delivery of nucleic acid therapeutics: Challenges, strategies, and opportunities // *Drug Discovery Today*. 2023. Vol. 28, № 4. P. 103507.
46. Tang L. et al. Immunotherapy in hematologic malignancies: achievements, challenges and future prospects // *Sig Transduct Target Ther*. Nature Publishing Group, 2023. Vol. 8, № 1. P. 1–39.
47. Sordo-Bahamonde C. et al. Chemo-Immunotherapy: A New Trend in Cancer Treatment // *Cancers (Basel)*. 2023. Vol. 15, № 11. P. 2912.
48. Llovet J.M. et al. Adjuvant and neoadjuvant immunotherapies in hepatocellular carcinoma // *Nat Rev Clin Oncol*. 2024. Vol. 21, № 4. P. 294–311.
49. Suarez B. et al. LncRNAs in the Type I Interferon Antiviral Response // *Int J Mol Sci*. 2020. Vol. 21, № 17. P. 6447.
50. Jang J.-H. et al. An Overview of Pathogen Recognition Receptors for Innate Immunity in Dental Pulp // *Mediators Inflamm*. 2015. Vol. 2015. P. 794143.
51. Tsukidate T., Hespen C.W., Hang H.C. Small molecule modulators of immune pattern recognition receptors // *RSC Chem Biol*. Vol. 4, № 12. P. 1014–1036.
52. Zhang Y., Liang C. Innate recognition of microbial-derived signals in immunity and inflammation // *Sci China Life Sci*. 2016. Vol. 59, № 12. P. 1210–1217.
53. Hou S. et al. Damage-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity in Plants // *Front Plant Sci*. 2019. Vol. 10. P. 646.
54. Gao Y. et al. Damage-Associated Molecular Patterns, a Class of Potential Psoriasis Drug Targets // *Int J Mol Sci*. 2024. Vol. 25, № 2. P. 771.
55. Schlee M., Hornung V., Hartmann G. siRNA and isRNA: two edges of one sword // *Mol Ther*. 2006. Vol. 14, № 4. P. 463–470.
56. de Oliveira Mann C.C., Hornung V. Molecular mechanisms of nonself nucleic acid recognition by the innate immune system // *European Journal of Immunology*. 2021. Vol. 51, № 8. P. 1897–1910.
57. Kawasaki T., Kawai T. Discrimination Between Self and Non-Self-Nucleic Acids by the Innate Immune System // *Int Rev Cell Mol Biol*. 2019. Vol. 344. P. 1–30.

58. Gong T. et al. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases // *Nat Rev Immunol.* 2020. Vol. 20, № 2. P. 95–112.
59. Roh J.S., Sohn D.H. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases // *Immune Netw.* 2018. Vol. 18, № 4. P. e27.
60. Maverakis E. et al. Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: a critical review // *J Autoimmun.* 2015. Vol. 57. P. 1–13.
61. Gardella S. et al. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway // *EMBO Rep.* 2002. Vol. 3, № 10. P. 995–1001.
62. Belkaid Y., Hand T.W. Role of the microbiota in immunity and inflammation // *Cell.* 2014. Vol. 157, № 1. P. 121–141.
63. Ahmed A., Tait S.W.G. Targeting immunogenic cell death in cancer // *Mol Oncol.* 2020. Vol. 14, № 12. P. 2994–3006.
64. Kong L.-Z. et al. Understanding nucleic acid sensing and its therapeutic applications // *Exp Mol Med.* Nature Publishing Group, 2023. Vol. 55, № 11. P. 2320–2331.
65. Miyake K. et al. Nucleic Acid Sensing by Toll-Like Receptors in the Endosomal Compartment // *Front. Immunol.* Frontiers, 2022. Vol. 13.
66. Zheng J. et al. RIG-I-like receptors: Molecular mechanism of activation and signaling // *Adv Immunol.* 2023. Vol. 158. P. 1–74.
67. Zhang W. et al. DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors (DAI) promotes lupus nephritis by activating the calcium pathway // *J Biol Chem.* 2013. Vol. 288, № 19. P. 13534–13550.
68. Le Naour J. et al. Trial watch: TLR3 agonists in cancer therapy // *Oncoimmunology.* 2020. Vol. 9, № 1. P. 1771143.
69. Komura F. et al. Development of a Nanostructured RNA/DNA Assembly as an Adjuvant Targeting Toll-Like Receptor 7/8 // *Nucleic Acid Ther.* 2019. Vol. 29, № 6. P. 335–342.
70. Leifer C.A., Medvedev A.E. Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling // *J Leukoc Biol.* 2016. Vol. 100, № 5. P. 927–941.
71. Matsumoto M. et al. Chapter Eighteen - Toll-IL-1-Receptor-Containing Adaptor Molecule-1: A Signaling Adaptor Linking Innate Immunity to Adaptive Immunity // *Progress in Molecular Biology and Translational Science* / ed. Giraldo J., Ciruela F. Academic Press, 2013. Vol. 117. P. 487–510.
72. Sallusto F., Lanzavecchia A. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses // *Arthritis Res.* 2002. Vol. 4 Suppl 3, № Suppl 3. P. S127-132.

73. Delneste Y., Beauvillain C., Jeannin P. [Innate immunity: structure and function of TLRs] // *Med Sci (Paris)*. 2007. Vol. 23, № 1. P. 67–73.
74. Alexopoulou L. et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3 // *Nature*. 2001. Vol. 413, № 6857. P. 732–738.
75. Leonard J.N. et al. The TLR3 signaling complex forms by cooperative receptor dimerization // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008. Vol. 105, № 1. P. 258–263.
76. Diebold S.S. et al. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA // *Science*. 2004. Vol. 303, № 5663. P. 1529–1531.
77. Hu T. et al. TLR8 activation and inhibition by guanosine analogs in RNA: Importance of functional groups and chain length // *Bioorg Med Chem*. 2018. Vol. 26, № 1. P. 77–83.
78. Hu Z. et al. Small-Molecule TLR8 Antagonists via Structure-Based Rational Design // *Cell Chem Biol*. 2018. Vol. 25, № 10. P. 1286-1291.e3.
79. Ohto U., Shimizu T. Structural aspects of nucleic acid-sensing Toll-like receptors // *Biophys Rev*. 2016. Vol. 8, № 1. P. 33–43.
80. Tanji H. et al. Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA // *Nat Struct Mol Biol*. 2015. Vol. 22, № 2. P. 109–115.
81. Saber M.M. et al. TLR9: A friend or a foe // *Life Sci*. 2022. Vol. 307. P. 120874.
82. Ohto U. et al. Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9 // *Nature*. 2015. Vol. 520, № 7549. P. 702–705.
83. Ohto U. et al. Toll-like Receptor 9 Contains Two DNA Binding Sites that Function Cooperatively to Promote Receptor Dimerization and Activation // *Immunity*. 2018. Vol. 48, № 4. P. 649-658.e4.
84. Liu G. et al. Nuclear-resident RIG-I senses viral replication inducing antiviral immunity // *Nat Commun*. 2018. Vol. 9, № 1. P. 3199.
85. Pippig D.A. et al. The regulatory domain of the RIG-I family ATPase LGP2 senses double-stranded RNA // *Nucleic Acids Res*. 2009. Vol. 37, № 6. P. 2014–2025.
86. Brisse M., Ly H. Comparative Structure and Function Analysis of the RIG-I-Like Receptors: RIG-I and MDA5 // *Frontiers in Immunology*. 2019. Vol. 10. P. 1586.
87. Onomoto K., Onoguchi K., Yoneyama M. Regulation of RIG-I-like receptor-mediated signaling: interaction between host and viral factors // *Cell Mol Immunol*. Nature Publishing Group, 2021. Vol. 18, № 3. P. 539–555.
88. Bruns A.M., Horvath C.M. LGP2 synergy with MDA5 in RLR-mediated RNA recognition and antiviral signaling // *Cytokine*. 2015. Vol. 74, № 2. P. 198–206.

89. Sanchez David R.Y. et al. LGP2 binds to PACT to regulate RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses // *Sci Signal*. 2019. Vol. 12, № 601. P. eaar3993.
90. Nasirudeen A.M.A. et al. RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection // *PLoS Negl Trop Dis*. 2011. Vol. 5, № 1. P. e926.
91. Errett J.S. et al. The Essential, Nonredundant Roles of RIG-I and MDA5 in Detecting and Controlling West Nile Virus Infection // *J Virol*. 2013. Vol. 87, № 21. P. 11416–11425.
92. Solstad A. et al. RIG-I-like Receptor Regulation of Immune Cell Function and Therapeutic Implications // *J Immunol*. 2022. Vol. 209, № 5. P. 845–854.
93. Sanchez David R.Y. et al. Comparative analysis of viral RNA signatures on different RIG-I-like receptors // *Elife*. 2016. Vol. 5. P. e11275.
94. Anchisi S., Guerra J., Garcin D. RIG-I ATPase Activity and Discrimination of Self-RNA versus Non-Self-RNA // *mBio*. American Society for Microbiology. Vol. 6, № 2. P. e02349-14.
95. Geng S. et al. An arms race under RIG-I loss: 5'ppp-RNA and its alternative recognition receptor MDA5 // *eLife*. eLife Sciences Publications Limited, 2024. Vol. 13.
96. Goubau D. et al. Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates // *Nature*. 2014. Vol. 514, № 7522. P. 372–375.
97. Ren X. et al. RIG-I Selectively Discriminates against 5'-Monophosphate RNA // *Cell Rep*. 2019. Vol. 26, № 8. P. 2019-2027.e4.
98. Chan C.-P., Jin D.-Y. Cytoplasmic RNA sensors and their interplay with RNA-binding partners in innate antiviral response: theme and variations // *RNA*. 2022. Vol. 28, № 4. P. 449–477.
99. Dias Junior A.G., Sampaio N.G., Rehwinkel J. A Balancing Act: MDA5 in Antiviral Immunity and Autoinflammation // *Trends Microbiol*. 2019. Vol. 27, № 1. P. 75–85.
100. Wu B. et al. Structural basis for dsRNA recognition, filament formation, and antiviral signal activation by MDA5 // *Cell*. 2013. Vol. 152, № 1–2. P. 276–289.
101. Panigaj M. et al. Therapeutic immunomodulation by rationally designed nucleic acids and nucleic acid nanoparticles // *Front. Immunol*. Frontiers, 2023. Vol. 14.
102. Wicherska-Pawłowska K., Wróbel T., Rybka J. Toll-Like Receptors (TLRs), NOD-Like Receptors (NLRs), and RIG-I-Like Receptors (RLRs) in Innate Immunity. TLRs, NLRs, and RLRs Ligands as Immunotherapeutic Agents for Hematopoietic Diseases // *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22, № 24. P. 13397.

103. Halpern M.D., Kurlander R.J., Pisetsky D.S. Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha // *Cell Immunol.* 1996. Vol. 167, № 1. P. 72–78.
104. Krieg A.M. et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation // *Nature.* 1995. Vol. 374, № 6522. P. 546–549.
105. Khan M.E. et al. TLR9 Activation Is Triggered by the Excess of Stimulatory versus Inhibitory Motifs Present in Trypanosomatidae DNA // *PLOS Neglected Tropical Diseases. Public Library of Science*, 2014. Vol. 8, № 11. P. e3308.
106. Zhang Z., Guo K., Schluesener H.J. The immunostimulatory activity of CpG oligonucleotides on microglial N9 cells is affected by a polyguanosine motif // *J Neuroimmunol.* 2005. Vol. 161, № 1–2. P. 68–77.
107. Zhang Z. et al. CpG Oligodeoxynucleotides for Anticancer Monotherapy from Preclinical Stages to Clinical Trials: 1 // *Pharmaceutics. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2022. Vol. 14, № 1. P. 73.
108. Rothenfusser S. et al. Recent advances in immunostimulatory CpG oligonucleotides // *Curr Opin Mol Ther.* 2003. Vol. 5, № 2. P. 98–106.
109. Salem A.K., Weiner G.J. CpG oligonucleotides as immunotherapeutic adjuvants: innovative applications and delivery strategies // *Adv Drug Deliv Rev.* 2009. Vol. 61, № 3. P. 193–194.
110. Luo Y. et al. CpG Oligodeoxynucleotides Induces Apoptosis of Human Bladder Cancer Cells via Caspase-3-Bax/Bcl-2-p53 Axis // *Arch Med Res.* 2020. Vol. 51, № 3. P. 233–244.
111. Qi X.-F. et al. CpG oligodeoxynucleotide induces apoptosis and cell cycle arrest in A20 lymphoma cells via TLR9-mediated pathways // *Mol Immunol.* 2013. Vol. 54, № 3–4. P. 327–337.
112. Pohar J. et al. Phosphodiester backbone of the CpG motif within immunostimulatory oligodeoxynucleotides augments activation of Toll-like receptor 9 // *Sci Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 14598.
113. Hoshi K. et al. G-Quadruplex Structure Improves the Immunostimulatory Effects of CpG Oligonucleotides // *Nucleic Acid Ther.* 2019. Vol. 29, № 4. P. 224–229.
114. Tu A.T.T. et al. G-quadruplex-based CpG oligodeoxynucleotide/DOTAP complex strongly stimulates immunity in CpG motif-specific and loop-length-dependent manners // *Nanomedicine.* 2022. Vol. 40. P. 102508.
115. Hartmann G., Krieg A.M. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells // *J Immunol.* 2000. Vol. 164, № 2. P. 944–953.
116. Hartmann G., Krieg A.M. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells // *J Immunol.* 2000. Vol. 164, № 2. P. 944–953.

117. Zamore P.D. et al. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals // *Cell*. 2000. Vol. 101, № 1. P. 25–33.
118. Meng Z., Lu M. RNA Interference-Induced Innate Immunity, Off-Target Effect, or Immune Adjuvant? // *Front Immunol*. 2017. Vol. 8. P. 331.
119. Robbins M., Judge A., MacLachlan I. siRNA and innate immunity // *Oligonucleotides*. 2009. Vol. 19, № 2. P. 89–102.
120. Kaushal A. Innate immune regulations and various siRNA modalities // *Drug Deliv. and Transl. Res*. 2023. Vol. 13, № 11. P. 2704–2718.
121. Schlender J. et al. Inhibition of toll-like receptor 7- and 9-mediated alpha/beta interferon production in human plasmacytoid dendritic cells by respiratory syncytial virus and measles virus // *J Virol*. 2005. Vol. 79, № 9. P. 5507–5515.
122. Li Y. et al. Extraordinary GU-rich single-strand RNA identified from SARS coronavirus contributes an excessive innate immune response // *Microbes Infect*. 2013. Vol. 15, № 2. P. 88–95.
123. Poeck H. et al. 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma // *Nat Med*. 2008. Vol. 14, № 11. P. 1256–1263.
124. Chen X. et al. 5'-triphosphate-siRNA activates RIG-I-dependent type I interferon production and enhances inhibition of hepatitis B virus replication in HepG2.2.15 cells // *Eur J Pharmacol*. 2013. Vol. 721, № 1–3. P. 86–95.
125. Kabilova T.O. et al. Antiproliferative and interferon-inducing activities of unique short double-stranded RNA // *Dokl Biochem Biophys*. 2011. Vol. 436. P. 8–11.
126. Zharkov M.I. et al. Molecular Mechanism of the Antiproliferative Activity of Short Immunostimulating dsRNA // *Front Oncol*. 2019. Vol. 9. P. 1454.
127. Goncharova E.P. et al. Immunostimulating RNA Delivered by P1500 PEGylated Cationic Liposomes Limits Influenza Infection in C57Bl/6 Mice // *Pharmaceutics*. 2020. Vol. 12, № 9. P. 875.
128. Heil F. et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8 // *Science*. 2004. Vol. 303, № 5663. P. 1526–1529.
129. Mansoori B. et al. Mechanisms of immune system activation in mammals by small interfering RNA (siRNA) // *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2016. Vol. 44, № 7. P. 1589–1596.
130. Sen G. et al. The critical DNA flanking sequences of a CpG oligodeoxynucleotide, but not the 6 base CpG motif, can be replaced with RNA without quantitative or qualitative changes in Toll-like receptor 9-mediated activity // *Cell Immunol*. 2004. Vol. 232, № 1–2. P. 64–74.

131. Liu S., Yu C.-Y., Wei H. Spherical nucleic acids-based nanoplateforms for tumor precision medicine and immunotherapy // *Materials Today Bio.* 2023. Vol. 22. P. 100750.
132. Barnaby S.N. et al. Design Considerations for RNA Spherical Nucleic Acids (SNAs) // *Bioconjug Chem.* 2016. Vol. 27, № 9. P. 2124–2131.
133. Song Y. et al. Spherical nucleic acids: Organized nucleotide aggregates as versatile nanomedicine // *Aggregate.* 2022. Vol. 3, № 1. P. e120.
134. Guan C. et al. RNA-Based Immunostimulatory Liposomal Spherical Nucleic Acids as Potent TLR7/8 Modulators // *Small.* 2018. Vol. 14, № 49. P. e1803284.
135. Zhao M. et al. Nucleic acid nanoassembly-enhanced RNA therapeutics and diagnosis // *Acta Pharmaceutica Sinica B.* 2023. Vol. 13, № 3. P. 916–941.
136. Radovic-Moreno A.F. et al. Immunomodulatory spherical nucleic acids // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015. Vol. 112, № 13. P. 3892–3897.
137. Kortylewski M. et al. In vivo delivery of siRNA to immune cells by conjugation to a TLR9 agonist enhances antitumor immune responses // *Nat Biotechnol.* 2009. Vol. 27, № 10. P. 925–932.
138. Luo Y. et al. CpG Oligodeoxynucleotides Induces Apoptosis of Human Bladder Cancer Cells via Caspase-3-Bax/Bcl-2-p53 Axis // *Arch Med Res.* 2020. Vol. 51, № 3. P. 233–244.
139. Qi X.-F. et al. CpG oligodeoxynucleotide induces apoptosis and cell cycle arrest in A20 lymphoma cells via TLR9-mediated pathways // *Mol Immunol.* 2013. Vol. 54, № 3–4. P. 327–337.
140. Li Y. et al. Extraordinary GU-rich single-strand RNA identified from SARS coronavirus contributes an excessive innate immune response // *Microbes Infect.* 2013. Vol. 15, № 2. P. 88–95.
141. Guan C. et al. RNA-Based Immunostimulatory Liposomal Spherical Nucleic Acids as Potent TLR7/8 Modulators // *Small.* 2018. Vol. 14, № 49. P. e1803284.
142. Zharkov M.I. et al. Molecular Mechanism of the Antiproliferative Activity of Short Immunostimulating dsRNA // *Front Oncol.* 2019. Vol. 9. P. 1454.
143. Radovic-Moreno A.F. et al. Immunomodulatory spherical nucleic acids // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015. Vol. 112, № 13. P. 3892–3897.
144. Chen Y.G., Hur S. Cellular origins of dsRNA, their recognition and consequences // *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022. Vol. 23, № 4. P. 286–301.
145. Rampersad S., Tennant P. Replication and Expression Strategies of Viruses // *Viruses.* 2018. P. 55–82.

146. Fortier M.-E. et al. The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004. Vol. 287, № 4. P. R759-766.
147. Hänel G. et al. Blood DCs activated with R848 and poly(I:C) induce antigen-specific immune responses against viral and tumor-associated antigens // *Cancer Immunol Immunother*. 2021. Vol. 71, № 7. P. 1705–1718.
148. Mitchell W.M. Efficacy of rintatolimod in the treatment of chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis (CFS/ME) // *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2016. Vol. 9, № 6. P. 755–770.
149. Jin B. et al. Immunomodulatory effects of dsRNA and its potential as vaccine adjuvant // *J Biomed Biotechnol*. 2010. Vol. 2010. P. 690438.
150. Majumder R. et al. Revisiting the COVID-19 Pandemic: An Insight into Long-Term Post-COVID Complications and Repurposing of Drugs: 4 // *COVID. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2023. Vol. 3, № 4. P. 494–519.
151. Luan X. et al. Innate immune responses to RNA: sensing and signaling // *Front. Immunol. Frontiers*, 2024. Vol. 15.
152. Akimov I.A. et al. Inhibition of human cancer-cell proliferation by long double-stranded RNAs: 1 // *Oligonucleotides*. 2009. Vol. 19, № 1. P. 31–40.
153. Silin D.S. et al. Synthetic and natural immunomodulators acting as interferon inducers // *Curr Pharm Des*. 2009. Vol. 15, № 11. P. 1238–1247.
154. Schlee M. et al. Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus // *Immunity*. 2009. Vol. 31, № 1. P. 25–34.
155. Hornung V. et al. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I // *Science*. 2006. Vol. 314, № 5801. P. 994–997.
156. Kato H. et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5 // *J Exp Med*. 2008. Vol. 205, № 7. P. 1601–1610.
157. Lind N.A. et al. Regulation of the nucleic acid-sensing Toll-like receptors // *Nat Rev Immunol. Nature Publishing Group*, 2022. Vol. 22, № 4. P. 224–235.
158. Straub S., Sampaio N.G. Activation of cytosolic RNA sensors by endogenous ligands: roles in disease pathogenesis // *Front. Immunol. Frontiers*, 2023. Vol. 14.
159. Kato H., Fujita T. Cytoplasmic Viral RNA Sensors: RIG-I-Like Receptors // *Encyclopedia of Immunobiology*. 2016. P. 352–359.

160. Kobayashi T. et al. Gene-specific inhibition of reovirus replication by RNA interference // *J Virol*. 2006. Vol. 80, № 18. P. 9053–9063.
161. Venkataraman T. et al. Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses // *J Immunol*. 2007. Vol. 178, № 10. P. 6444–6455.
162. Saito T., Gale M. Differential recognition of double-stranded RNA by RIG-I-like receptors in antiviral immunity // *J Exp Med*. 2008. Vol. 205, № 7. P. 1523–1527.
163. Chen Y.G. et al. N6-Methyladenosine Modification Controls Circular RNA Immunity // *Mol Cell*. 2019. Vol. 76, № 1. P. 96-109.e9.
164. Takaoka A. et al. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response // *Nature*. 2007. Vol. 448, № 7152. P. 501–505.
165. Zahid A. et al. Molecular and Structural Basis of DNA Sensors in Antiviral Innate Immunity // *Front. Immunol. Frontiers*, 2020. Vol. 11.
166. Bürckstümmer T. et al. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome // *Nat Immunol*. 2009. Vol. 10, № 3. P. 266–272.
167. Zhu H. et al. The complex role of AIM2 in autoimmune diseases and cancers // *Immunity, Inflammation and Disease*. 2021. Vol. 9, № 3. P. 649–665.
168. Ferguson B.J. et al. DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity // *Elife*. 2012. Vol. 1. P. e00047.
169. Saar M. et al. Expression of immune checkpoint PD-1 in non-small cell lung cancer is associated with tumor cell DNA-dependent protein kinase // *Molecular and Clinical Oncology*. Spandidos Publications, 2021. Vol. 15, № 4. P. 1–8.
170. Ohto U., Shimizu T. Structural aspects of nucleic acid-sensing Toll-like receptors // *Biophys Rev*. 2016. Vol. 8, № 1. P. 33–43.
171. Diebold S.S. et al. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA // *Science*. 2004. Vol. 303, № 5663. P. 1529–1531.
172. Callmann C.E. et al. Tumor cell lysate-loaded immunostimulatory spherical nucleic acids as therapeutics for triple-negative breast cancer // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020. Vol. 117, № 30. P. 17543–17550.
173. Pichlmair A. et al. Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection // *J Virol*. 2009. Vol. 83, № 20. P. 10761–10769.
174. Anchisi S., Guerra J., Garcin D. RIG-I ATPase activity and discrimination of self-RNA versus non-self-RNA // *mBio*. 2015. Vol. 6, № 2. P. e02349.

175. Pichlmair A. et al. Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection // *J Virol*. 2009. Vol. 83, № 20. P. 10761–10769.
176. Kawasaki T., Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways // *Front Immunol*. 2014. Vol. 5. P. 461.
177. Koushki K. et al. Anti-inflammatory Action of Statins in Cardiovascular Disease: the Role of Inflammasome and Toll-Like Receptor Pathways // *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2021. Vol. 60, № 2. P. 175–199.
178. Guan H. et al. Molecular characteristics and therapeutic implications of Toll-like receptor signaling pathway in melanoma // *Sci Rep*. Nature Publishing Group, 2023. Vol. 13, № 1. P. 13788.
179. Takeda K., Akira S. TLR signaling pathways // *Semin Immunol*. 2004. Vol. 16, № 1. P. 3–9.
180. Liu B.M. et al. Key roles for phosphorylation and the Coiled-coil domain in TRIM56-mediated positive regulation of TLR3-TRIF-dependent innate immunity // *Journal of Biological Chemistry*. 2024. Vol. 300, № 5. P. 107249.
181. Hoebe K. et al. Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways // *Nat Immunol*. 2003. Vol. 4, № 12. P. 1223–1229.
182. Chakraborty S. et al. Application of toll-like receptors (TLRs) and their agonists in cancer vaccines and immunotherapy // *Front. Immunol*. Frontiers, 2023. Vol. 14.
183. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors // *Nat Immunol*. 2010. Vol. 11, № 5. P. 373–384.
184. Chang Z.L. Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways // *Inflamm. Res*. 2010. Vol. 59, № 10. P. 791–808.
185. Lannoy V. et al. TIRAP, TRAM, and Toll-Like Receptors: The Untold Story // *Mediators of Inflammation*. Hindawi, 2023. Vol. 2023. P. e2899271.
186. Zhang J. et al. An unexpected twist to the activation of IKK β : TAK1 primes IKK β for activation by autophosphorylation // *Biochem J*. 2014. Vol. 461, № 3. P. 531–537.
187. Zhang J. et al. I κ B kinase β (IKK β): Structure, transduction mechanism, biological function, and discovery of its inhibitors // *Int J Biol Sci*. 2023. Vol. 19, № 13. P. 4181–4203.
188. Rastogi S. et al. NF- κ B mediated regulation of tumor cell proliferation in hypoxic microenvironment // *Front. Pharmacol*. Frontiers, 2023. Vol. 14.
189. Matsumiya T., Stafforini D.M. Function and Regulation of Retinoic Acid-Inducible Gene-I // *CRI*. Begel House Inc., 2010. Vol. 30, № 6.

190. Cheng H. et al. Signaling pathways involved in the biological functions of dendritic cells and their implications for disease treatment // *Mol Biomed*. 2023. Vol. 4, № 1. P. 15.
191. Batool M., Kim M.S., Choi S. Structural insights into the distinctive RNA recognition and therapeutic potentials of RIG-I-like receptors // *Medicinal Research Reviews*. 2022. Vol. 42, № 1. P. 399–425.
192. Rojas J.M. et al. Viral pathogen-induced mechanisms to antagonize mammalian interferon (IFN) signaling pathway // *Cell. Mol. Life Sci*. 2021. Vol. 78, № 4. P. 1423–1444.
193. Mahjoor M. et al. Double-edged sword of JAK/STAT signaling pathway in viral infections: novel insights into virotherapy // *Cell Commun Signal*. 2023. Vol. 21, № 1. P. 272.
194. Li M. et al. Signaling pathways in macrophages: molecular mechanisms and therapeutic targets // *MedComm*. 2023. Vol. 4, № 5. P. e349.
195. Barber G.N. STING: infection, inflammation and cancer // *Nat Rev Immunol*. 2015. Vol. 15, № 12. P. 760–770.
196. Chen R. et al. The cyclic guanosine monophosphate synthase-stimulator of interferon genes pathway as a potential target for tumor immunotherapy // *Front. Immunol. Frontiers*, 2023. Vol. 14.
197. Zheng W. et al. How the Innate Immune DNA Sensing cGAS-STING Pathway Is Involved in Apoptosis: 3 // *International Journal of Molecular Sciences. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2023. Vol. 24, № 3. P. 3029.
198. Hager S. et al. Nucleic Acid-Based Approaches for Tumor Therapy: 9 // *Cells. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2020. Vol. 9, № 9. P. 2061.
199. Jin J.-O. et al. Nucleic acid nanotechnology for cancer treatment // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2020. Vol. 1874, № 1. P. 188377.
200. Saleh R.O. et al. Nucleic acid vaccines-based therapy for triple-negative breast cancer: A new paradigm in tumor immunotherapy arena // *Cell Biochemistry and Function*. 2024. Vol. 42, № 3. P. e3992.
201. Shah N.N., Fry T.J. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy // *Nat Rev Clin Oncol*. 2019. Vol. 16, № 6. P. 372–385.
202. Huayamares S.G. et al. Nucleic acid-based drugs for patients with solid tumours // *Nat Rev Clin Oncol. Nature Publishing Group*, 2024. P. 1–21.
203. Ginn S.L. et al. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update // *The Journal of Gene Medicine*. 2018. Vol. 20, № 5. P. e3015.
204. Barbari C. et al. Immunotherapies and Combination Strategies for Immuno-Oncology: 14 // *International Journal of Molecular Sciences. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2020. Vol. 21, № 14. P. 5009.

205. Dunn G.P. et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape // *Nat Immunol.* 2002. Vol. 3, № 11. P. 991–998.
206. Dutta S. et al. Targets of Immune Escape Mechanisms in Cancer: Basis for Development and Evolution of Cancer Immune Checkpoint Inhibitors: 2 // *Biology. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2023. Vol. 12, № 2. P. 218.
207. Kraehenbuehl L. et al. Enhancing immunotherapy in cancer by targeting emerging immunomodulatory pathways // *Nat Rev Clin Oncol.* 2022. Vol. 19, № 1. P. 37–50.
208. Shiravand Y. et al. Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy: 5 // *Current Oncology. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2022. Vol. 29, № 5. P. 3044–3060.
209. Smith M. et al. Trial Watch: Toll-like receptor agonists in cancer immunotherapy // *Oncoimmunology.* 2018. Vol. 7, № 12. P. e1526250.
210. Majer O., Liu B., Barton G.M. Nucleic acid-sensing TLRs: trafficking and regulation // *Curr Opin Immunol.* 2017. Vol. 44. P. 26–33.
211. Liao W. et al. Construction of Monomeric and Dimeric G-Quadruplex-Structured CpG Oligodeoxynucleotides for Enhanced Uptake and Activation in TLR9-Positive Macrophages // *Nucleic Acid Ther.* 2020. Vol. 30, № 5. P. 299–311.
212. Huang C. et al. TLR3 Ligand PolyI:C Prevents Acute Pancreatitis Through the Interferon- β /Interferon- α/β Receptor Signaling Pathway in a Caerulein-Induced Pancreatitis Mouse Model // *Front Immunol.* 2019. Vol. 10. P. 980.
213. Adamus T., Kortylewski M. The revival of CpG oligonucleotide-based cancer immunotherapies // *Contemp Oncol (Pozn).* 2018. Vol. 22, № 1A. P. 56–60.
214. Frank-Bertoncelj M. et al. TLR3 Ligand Poly(I:C) Exerts Distinct Actions in Synovial Fibroblasts When Delivered by Extracellular Vesicles // *Front Immunol.* 2018. Vol. 9. P. 28.
215. Bianchi F. et al. Exploiting poly(I:C) to induce cancer cell apoptosis // *Cancer Biol Ther.* 2017. Vol. 18, № 10. P. 747–756.
216. Ammi R. et al. Poly(I:C) as cancer vaccine adjuvant: knocking on the door of medical breakthroughs // *Pharmacol Ther.* 2015. Vol. 146. P. 120–131.
217. Levy H.B. et al. A modified polyribonucleosinic-polyribocytidylic acid complex that induces interferon in primates // *J Infect Dis.* 1975. Vol. 132, № 4. P. 434–439.
218. Levine A.S. et al. Initial clinical trials in cancer patients of polyribonucleosinic-polyribocytidylic acid stabilized with poly-L-lysine, in carboxymethylcellulose [poly(ICLC)], a highly effective interferon inducer // *Cancer Res.* 1979. Vol. 39, № 5. P. 1645–1650.

219. Patchett A.L. et al. The toll-like receptor ligands Hiltonol® (polyI:CLC) and imiquimod effectively activate antigen-specific immune responses in Tasmanian devils (*Sarcophilus harrisii*) // *Dev Comp Immunol*. 2017. Vol. 76. P. 352–360.
220. Khairuddin N. et al. siRNA-induced immunostimulation through TLR7 promotes antitumoral activity against HPV-driven tumors in vivo // *Immunol Cell Biol*. 2012. Vol. 90, № 2. P. 187–196.
221. Anz D. et al. Immunostimulatory RNA blocks suppression by regulatory T cells // *J Immunol*. 2010. Vol. 184, № 2. P. 939–946.
222. Stewart C.R. et al. Immunostimulatory motifs enhance antiviral siRNAs targeting highly pathogenic avian influenza H5N1 // *PLoS One*. 2011. Vol. 6, № 7. P. e21552.
223. Kabilova T.O. et al. Immunotherapy of hepatocellular carcinoma with small double-stranded RNA // *BMC Cancer*. 2014. Vol. 14. P. 338.
224. Poeck H. et al. 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma // *Nat Med*. 2008. Vol. 14, № 11. P. 1256–1263.
225. Wang K. et al. 5'-triphosphate-siRNA against survivin gene induces interferon production and inhibits proliferation of lung cancer cells in vitro // *J Immunother*. 2013. Vol. 36, № 5. P. 294–304.
226. Bastola R. et al. Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system // *Arch Pharm Res*. 2017. Vol. 40, № 11. P. 1238–1248.
227. Malla R. et al. mRNA vaccines and their delivery strategies: A journey from infectious diseases to cancer // *Molecular Therapy*. Elsevier, 2024. Vol. 32, № 1. P. 13–31.
228. Boretti A. mRNA vaccine boosters and impaired immune system response in immune compromised individuals: a narrative review // *Clin Exp Med*. 2024. Vol. 24, № 1. P. 23.
229. Wu L. et al. Lipid Nanoparticle (LNP) Delivery Carrier-Assisted Targeted Controlled Release mRNA Vaccines in Tumor Immunity: 2 // *Vaccines*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2024. Vol. 12, № 2. P. 186.
230. Akbarian M. et al. Chapter 6 - Vector-based vaccine delivery and associated immunity: Current status and way forward // *Advanced Vaccination Technologies for Infectious and Chronic Diseases* / ed. Chavda V.P., Vora L.K., Apostolopoulos V. Academic Press, 2024. P. 73–98.
231. Qin F. et al. A Guide to Nucleic Acid Vaccines in the Prevention and Treatment of Infectious Diseases and Cancers: From Basic Principles to Current Applications // *Front Cell Dev Biol*. 2021. Vol. 9. P. 633776.
232. Lin Y.-J., Zimmermann J., Schülke S. Novel adjuvants in allergen-specific immunotherapy: where do we stand? // *Front. Immunol*. Frontiers, 2024. Vol. 15.

233. Pulendran B., S Arunachalam P., O'Hagan D.T. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants // *Nat Rev Drug Discov.* 2021. Vol. 20, № 6. P. 454–475.
234. Weide B. et al. Direct injection of protamine-protected mRNA: results of a phase 1/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients // *J Immunother.* 2009. Vol. 32, № 5. P. 498–507.
235. Balcorta H.V. et al. Nucleic Acid Delivery Nanotechnologies for In Vivo Cell Programming // *ACS Appl. Bio Mater.* American Chemical Society, 2024.
236. Barbieri I., Kouzarides T. Role of RNA modifications in cancer // *Nat Rev Cancer.* Nature Publishing Group, 2020. Vol. 20, № 6. P. 303–322.
237. Osborn M.F., Khvorova A. Improving siRNA Delivery In Vivo Through Lipid Conjugation // *Nucleic Acid Ther.* 2018. Vol. 28, № 3. P. 128–136.
238. Zhao Z., Anselmo A.C., Mitragotri S. Viral vector-based gene therapies in the clinic // *Bioengineering & Translational Medicine.* 2022. Vol. 7, № 1. P. e10258.
239. Shirley J.L. et al. Immune Responses to Viral Gene Therapy Vectors // *Molecular Therapy.* Elsevier, 2020. Vol. 28, № 3. P. 709–722.
240. Bulcha J.T. et al. Viral vector platforms within the gene therapy landscape // *Sig Transduct Target Ther.* Nature Publishing Group, 2021. Vol. 6, № 1. P. 1–24.
241. Aronson S.J. et al. Prevalence and Relevance of Pre-Existing Anti-Adeno-Associated Virus Immunity in the Context of Gene Therapy for Crigler–Najjar Syndrome // *Human Gene Therapy.* Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 2019. Vol. 30, № 10. P. 1297–1305.
242. Bryson T.E. et al. Nuclease-Mediated Gene Therapies for Inherited Metabolic Diseases of the Liver // *Yale J Biol Med.* 2017. Vol. 90, № 4. P. 553–566.
243. Winkle M. et al. Noncoding RNA therapeutics — challenges and potential solutions // *Nat Rev Drug Discov.* Nature Publishing Group, 2021. Vol. 20, № 8. P. 629–651.
244. Damase T.R. et al. The Limitless Future of RNA Therapeutics // *Front. Bioeng. Biotechnol.* Frontiers, 2021. Vol. 9.
245. Chandler M. et al. Challenges in optimizing RNA nanostructures for large-scale production and controlled therapeutic properties // *Nanomedicine (Lond).* Vol. 15, № 13. P. 1331–1340.
246. Balwani M. et al. Phase 3 Trial of RNAi Therapeutic Givosiran for Acute Intermittent Porphyria // *N Engl J Med.* 2020. Vol. 382, № 24. P. 2289–2301.
247. Ray K.K. et al. Two Phase 3 Trials of Inclisiran in Patients with Elevated LDL Cholesterol // *N Engl J Med.* 2020. Vol. 382, № 16. P. 1507–1519.

248. Garrelfs S.F. et al. Lumasiran, an RNAi Therapeutic for Primary Hyperoxaluria Type 1 // *N Engl J Med*. 2021. Vol. 384, № 13. P. 1216–1226.
249. Adams D. et al. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis // *N Engl J Med*. 2018. Vol. 379, № 1. P. 11–21.
250. Li Z. et al. Biosafety assessment of delivery systems for clinical nucleic acid therapeutics // *Biosafety and Health*. 2022. Vol. 4, № 2. P. 105–117.
251. Parums D.V. Editorial: First Full Regulatory Approval of a COVID-19 Vaccine, the BNT162b2 Pfizer-BioNTech Vaccine, and the Real-World Implications for Public Health Policy // *Med Sci Monit*. 2021. Vol. 27. P. e934625.
252. Baden L.R. et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine // *N Engl J Med*. 2021. Vol. 384, № 5. P. 403–416.
253. Sheridan C. To win at gene therapy, companies pick viruses with production credentials // *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 2019. Vol. 37, № 1. P. 5–6.
254. Hsu H.-L. et al. Structural characterization of a novel human adeno-associated virus capsid with neurotropic properties // *Nat Commun*. 2020. Vol. 11. P. 3279.
255. Wang D., Tai P.W.L., Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery // *Nat Rev Drug Discov*. 2019. Vol. 18, № 5. P. 358–378.
256. Nicolson S.C., Samulski R.J. Recombinant adeno-associated virus utilizes host cell nuclear import machinery to enter the nucleus // *J Virol*. 2014. Vol. 88, № 8. P. 4132–4144.
257. Chiu W. et al. An Update on Gene Therapy for Inherited Retinal Dystrophy: Experience in Leber Congenital Amaurosis Clinical Trials // *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22, № 9. P. 4534.
258. Emami M.R. et al. Innate and adaptive AAV-mediated immune responses in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy // *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2023. Vol. 30. P. 90–102.
259. Wilson J.M., Flotte T.R. Moving Forward After Two Deaths in a Gene Therapy Trial of Myotubular Myopathy // *Human Gene Therapy*. Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 2020. Vol. 31, № 13–14. P. 695–696.
260. High-dose AAV gene therapy deaths // *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 2020. Vol. 38, № 8. P. 910–910.
261. Goswami R. et al. Gene Therapy Leaves a Vicious Cycle // *Front. Oncol. Frontiers*, 2019. Vol. 9.
262. Kanvinde S. et al. Non-Viral Vectors for Delivery of Nucleic Acid Therapies for Cancer: 1 // *BioTech. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2022. Vol. 11, № 1. P. 6.

263. Ramamoorth M., Narvekar A. Non viral vectors in gene therapy- an overview // J Clin Diagn Res. 2015. Vol. 9, № 1. P. GE01-06.
264. Wang C. et al. Emerging non-viral vectors for gene delivery // Journal of Nanobiotechnology. 2023. Vol. 21, № 1. P. 272.
265. Cevher E. et al. Gene Delivery Systems: Recent Progress in Viral and Non-Viral Therapy // Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems. IntechOpen, 2012.
266. Avci-Adali M., A. Santos H. Current trends in delivery of non-viral nucleic acid-based therapeutics for improved efficacy // Adv Drug Deliv Rev. 2022. Vol. 185. P. 114297.
267. Ewert K.K. et al. Cationic Liposomes as Vectors for Nucleic Acid and Hydrophobic Drug Therapeutics: 9 // Pharmaceutics. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021. Vol. 13, № 9. P. 1365.
268. Li Z. et al. Biosafety assessment of delivery systems for clinical nucleic acid therapeutics // Biosafety and Health. 2022. Vol. 4, № 2. P. 105–117.
269. Hald Albertsen C. et al. The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy // Advanced Drug Delivery Reviews. 2022. Vol. 188. P. 114416.
270. Shah S. et al. Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process // Advanced Drug Delivery Reviews. 2020. Vol. 154–155. P. 102–122.
271. Khalil I.A. et al. Lipid Nanoparticles for Cell-Specific in Vivo Targeted Delivery of Nucleic Acids // Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2020. Vol. 43, № 4. P. 584–595.
272. Terada T. et al. Characterization of Lipid Nanoparticles Containing Ionizable Cationic Lipids Using Design-of-Experiments Approach // Langmuir. American Chemical Society, 2021. Vol. 37, № 3. P. 1120–1128.
273. Andresen J.L., Fenton O.S. Nucleic acid delivery and nanoparticle design for COVID vaccines // MRS Bulletin. 2021. Vol. 46, № 9. P. 832–839.
274. Hald Albertsen C. et al. The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy // Adv Drug Deliv Rev. 2022. Vol. 188. P. 114416.
275. Tenchov R., Sasso J.M., Zhou Q.A. PEGylated Lipid Nanoparticle Formulations: Immunological Safety and Efficiency Perspective // Bioconjugate Chem. American Chemical Society, 2023. Vol. 34, № 6. P. 941–960.
276. Degors I.M.S. et al. Carriers Break Barriers in Drug Delivery: Endocytosis and Endosomal Escape of Gene Delivery Vectors // Acc. Chem. Res. American Chemical Society, 2019. Vol. 52, № 7. P. 1750–1760.
277. Wahane A. et al. Role of Lipid-Based and Polymer-Based Non-Viral Vectors in Nucleic Acid Delivery for Next-Generation Gene Therapy // Molecules. 2020. Vol. 25, № 12. P. 2866.

278. Zuhorn I.S., Engberts J.B.F.N., Hoekstra D. Gene delivery by cationic lipid vectors: overcoming cellular barriers // *Eur Biophys J.* 2007. Vol. 36, № 4. P. 349–362.
279. Eygeris Y. et al. Chemistry of Lipid Nanoparticles for RNA Delivery // *Acc. Chem. Res. American Chemical Society*, 2022. Vol. 55, № 1. P. 2–12.
280. Ribovski L. et al. Breaking free: endocytosis and endosomal escape of extracellular vesicles // *Extracellular Vesicles and Circulating Nucleic Acids.* 2023. Vol. 4, № 2. P. 283–305.
281. Chatterjee S. et al. Endosomal escape: A bottleneck for LNP-mediated therapeutics // *Proceedings of the National Academy of Sciences. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2024. Vol. 121, № 11. P. e2307800120.
282. Gandek T.B., van der Koog L., Nagelkerke A. A Comparison of Cellular Uptake Mechanisms, Delivery Efficacy, and Intracellular Fate between Liposomes and Extracellular Vesicles // *Advanced Healthcare Materials.* 2023. Vol. 12, № 25. P. 2300319.
283. Chung S., Mi Lee C., Zhang M. Advances in nanoparticle-based mRNA delivery for liver cancer and liver-associated infectious diseases // *Nanoscale Horizons. Royal Society of Chemistry*, 2023. Vol. 8, № 1. P. 10–28.
284. Hu M. et al. Physiological Barriers and Strategies of Lipid-Based Nanoparticles for Nucleic Acid Drug Delivery // *Advanced Materials.* Vol. n/a, № n/a. P. 2303266.
285. Delehedde C. et al. Intracellular Routing and Recognition of Lipid-Based mRNA Nanoparticles: 7 // *Pharmaceutics. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2021. Vol. 13, № 7. P. 945.
286. Azarnezhad A. et al. Toxicological profile of lipid-based nanostructures: are they considered as completely safe nanocarriers? // *Critical Reviews in Toxicology. Taylor & Francis*, 2020. Vol. 50, № 2. P. 148–176.
287. Jørgensen A.M., Wibel R., Bernkop-Schnürch A. Biodegradable Cationic and Ionizable Cationic Lipids: A Roadmap for Safer Pharmaceutical Excipients // *Small.* 2023. Vol. 19, № 17. P. 2206968.
288. Padín-González E. et al. Understanding the Role and Impact of Poly (Ethylene Glycol) (PEG) on Nanoparticle Formulation: Implications for COVID-19 Vaccines // *Front. Bioeng. Biotechnol. Frontiers*, 2022. Vol. 10.
289. Briolay T. et al. Delivery of cancer therapies by synthetic and bio-inspired nanovectors // *Molecular Cancer.* 2021. Vol. 20, № 1. P. 55.
290. Vhora I., Khatri N. Gene Delivery Using Nanocarriers // *Nanotechnology in Medicine. John Wiley & Sons, Ltd*, 2021. P. 195–232.
291. Zhang H. et al. Aerosolizable Lipid Nanoparticles for Pulmonary Delivery of mRNA through Design of Experiments: 11 // *Pharmaceutics. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2020. Vol. 12, № 11. P. 1042.

292. Xiao Y., Shi J. Lipids and the Emerging RNA Medicines // Chem. Rev. American Chemical Society, 2021. Vol. 121, № 20. P. 12109–12111.
293. Suzuki Y., Ishihara H. Difference in the lipid nanoparticle technology employed in three approved siRNA (Patisiran) and mRNA (COVID-19 vaccine) drugs // Drug Metabolism and Pharmacokinetics. 2021. Vol. 41. P. 100424.
294. van den Berg A.I.S. et al. Polymeric delivery systems for nucleic acid therapeutics: Approaching the clinic // Journal of Controlled Release. 2021. Vol. 331. P. 121–141.
295. Sung Y.K., Kim S.W. Recent advances in polymeric drug delivery systems // Biomaterials Research. American Association for the Advancement of Science, 2020. Vol. 24, № 1. P. 12.
296. Jarak I. et al. Multifunctional polymeric micelle-based nucleic acid delivery: Current advances and future perspectives // Applied Materials Today. 2021. Vol. 25. P. 101217.
297. Yang W. et al. Polymer-Based mRNA Delivery Strategies for Advanced Therapies // Advanced Healthcare Materials. 2023. Vol. 12, № 15. P. 2202688.
298. Ghosh B., Biswas S. Polymeric micelles in cancer therapy: State of the art // Journal of Controlled Release. 2021. Vol. 332. P. 127–147.
299. Butt A.M. et al. Endosomal Escape of Bioactives Deployed via Nanocarriers: Insights Into the Design of Polymeric Micelles // Pharm Res. 2022. Vol. 39, № 6. P. 1047–1064.
300. Ghezzi M. et al. Polymeric micelles in drug delivery: An insight of the techniques for their characterization and assessment in biorelevant conditions // Journal of Controlled Release. 2021. Vol. 332. P. 312–336.
301. Sinani G. et al. Polymeric-Micelle-Based Delivery Systems for Nucleic Acids: 8 // Pharmaceutics. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2023. Vol. 15, № 8. P. 2021.
302. Jiang C. et al. Recent advances in the development of polyethylenimine-based gene vectors for safe and efficient gene delivery // Expert Opinion on Drug Delivery. Taylor & Francis, 2019. Vol. 16, № 4. P. 363–376.
303. Bauer M. et al. Rethinking the impact of the protonable amine density on cationic polymers for gene delivery: A comparative study of partially hydrolyzed poly(2-ethyl-2-oxazoline)s and linear poly(ethylene imine)s // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2018. Vol. 133. P. 112–121.
304. Chen Z. et al. Recent advancements in polyethyleneimine-based materials and their biomedical, biotechnology, and biomaterial applications // J. Mater. Chem. B. The Royal Society of Chemistry, 2020. Vol. 8, № 15. P. 2951–2973.
305. Gallops C., Ziebarth J., Wang Y. A Polymer Physics Perspective on Why PEI Is an Effective Nonviral Gene Delivery Vector // ACS Symposium Series. 2020. Vol. 1350. P. 1–12.

306. Li Z. et al. Solvent and catalyst-free modification of hyperbranched polyethyleneimines by ring-opening-addition or ring-opening-polymerization of N-sulfonyl aziridines // *Polym. Chem. The Royal Society of Chemistry*, 2021. Vol. 12, № 12. P. 1787–1796.
307. Gleede T. et al. Linear Well-Defined Polyamines via Anionic Ring-Opening Polymerization of Activated Aziridines: From Mild Desulfonylation to Cell Transfection // *ACS Macro Lett. American Chemical Society*, 2020. Vol. 9, № 1. P. 20–25.
308. Wightman L. et al. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo // *J Gene Med.* 2001. Vol. 3, № 4. P. 362–372.
309. Zhao C., Zhou B. Polyethyleneimine-Based Drug Delivery Systems for Cancer Theranostics: 1 // *Journal of Functional Biomaterials. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2023. Vol. 14, № 1. P. 12.
310. Hisham F. et al. Biopolymer chitosan: Potential sources, extraction methods, and emerging applications // *Ain Shams Engineering Journal.* 2024. Vol. 15, № 2. P. 102424.
311. Santos-Carballal B., Fernández Fernández E., Goycoolea F.M. Chitosan in Non-Viral Gene Delivery: Role of Structure, Characterization Methods, and Insights in Cancer and Rare Diseases Therapies: 4 // *Polymers. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2018. Vol. 10, № 4. P. 444.
312. Sharma D. et al. Chitosan-Based Systems for Gene Delivery // *Functional Chitosan: Drug Delivery and Biomedical Applications* / ed. Jana S., Jana S. Singapore: Springer, 2019. P. 229–267.
313. Buschmann M.D. et al. Chitosans for delivery of nucleic acids // *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2013. Vol. 65, № 9. P. 1234–1270.
314. Delas T. et al. Effects of Chain Length of Chitosan Oligosaccharides on Solution Properties and Complexation with siRNA: 8 // *Polymers. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2019. Vol. 11, № 8. P. 1236.
315. Aranda-Barradas M.E. et al. Effect of molecular weight of chitosan on the physicochemical, morphological, and biological properties of polyplex nanoparticles intended for gene delivery // *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications.* 2022. Vol. 4. P. 100228.
316. Karayianni M. et al. Chitosan-Based Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery: Technological Aspects, Applications, and Future Perspectives: 7 // *Pharmaceutics. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2023. Vol. 15, № 7. P. 1849.
317. Poddar A., Banerjee R., Shukla R. Editorial: Non-viral vectors for gene therapy/nucleic acid delivery // *Front. Bioeng. Biotechnol. Frontiers*, 2023. Vol. 11.
318. Sunshine J.C., Bishop C.J., Green J.J. Advances in polymeric and inorganic vectors for nonviral nucleic acid delivery // *Ther Deliv.* 2011. Vol. 2, № 4. P. 493–521.

319. Kapoor M., Burgess D.J. Targeted Delivery of Nucleic Acid Therapeutics via Nonviral Vectors // Targeted Drug Delivery : Concepts and Design / ed. Devarajan P.V., Jain S. Cham: Springer International Publishing, 2015. P. 271–312.
320. Boisguérin P. et al. Peptide-Based Nanoparticles for Therapeutic Nucleic Acid Delivery: 5 // Biomedicines. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021. Vol. 9, № 5. P. 583.
321. Hooshmand S.E. et al. Histidine-enhanced gene delivery systems: The state of the art // The Journal of Gene Medicine. 2022. Vol. 24, № 5. P. e3415.
322. Hadianamrei R., Zhao X. Current state of the art in peptide-based gene delivery // Journal of Controlled Release. 2022. Vol. 343. P. 600–619.
323. Cerrato C.P., Lehto T., Langel Ü. Peptide-based vectors: recent developments // Biomolecular Concepts. De Gruyter, 2014. Vol. 5, № 6. P. 479–488.
324. Yang Y. et al. Application of Peptides in Construction of Nonviral Vectors for Gene Delivery: 22 // Nanomaterials. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2022. Vol. 12, № 22. P. 4076.
325. Trabulo S. et al. Cell-Penetrating Peptides—Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems: 4 // Pharmaceuticals. Molecular Diversity Preservation International, 2010. Vol. 3, № 4. P. 961–993.
326. Wei L. et al. ToxIBTL: prediction of peptide toxicity based on information bottleneck and transfer learning // Bioinformatics. 2022. Vol. 38, № 6. P. 1514–1524.
327. Zu H., Gao D. Non-viral Vectors in Gene Therapy: Recent Development, Challenges, and Prospects // AAPS J. 2021. Vol. 23, № 4. P. 78.
328. Artiga Á. et al. Current status and future perspectives of gold nanoparticle vectors for siRNA delivery // J. Mater. Chem. B. The Royal Society of Chemistry, 2019. Vol. 7, № 6. P. 876–896.
329. Khan M.A. et al. Effect of Confinement in Nanopores on RNA Interactions with Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles // J. Phys. Chem. B. American Chemical Society, 2020. Vol. 124, № 39. P. 8549–8561.
330. Shen L., Li B., Qiao Y. Fe₃O₄ Nanoparticles in Targeted Drug/Gene Delivery Systems: 2 // Materials. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2018. Vol. 11, № 2. P. 324.
331. Jain N. S., Somanna P., Patil A.B. Application of Quantum Dots in Drug Delivery // Nanoscience & Nanotechnology-Asia. 2022. Vol. 12, № 1. P. 16–31.
332. Khalid K. et al. Advanced in developmental organic and inorganic nanomaterial: a review // Bioengineered. Taylor & Francis, 2020. Vol. 11, № 1. P. 328–355.

333. Li F. et al. Stimuli-responsive nano-assemblies for remotely controlled drug delivery // *Journal of Controlled Release*. 2020. Vol. 322. P. 566–592.
334. Garcia-Guerra A., Dunwell T.L., Trigueros S. Nano-Scale Gene Delivery Systems: Current Technology, Obstacles, and Future Directions // *Current Medicinal Chemistry*. 2018. Vol. 25, № 21. P. 2448–2464.
335. Kulkarni J.A. et al. The current landscape of nucleic acid therapeutics // *Nat Nanotechnol*. 2021. Vol. 16, № 6. P. 630–643.
336. Crooke S.T. et al. RNA-Targeted Therapeutics // *Cell Metab*. 2018. Vol. 27, № 4. P. 714–739.
337. Fàbrega C., Aviñó A., Eritja R. Chemical Modifications in Nucleic Acids for Therapeutic and Diagnostic Applications // *Chem Rec*. 2022. Vol. 22, № 4. P. e202100270.
338. Chernikov I.V. et al. Cholesterol-Conjugated Supramolecular Multimeric siRNAs: Effect of siRNA Length on Accumulation and Silencing In Vitro and In Vivo // *Nucleic Acid Therapeutics*. Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 2023. Vol. 33, № 6. P. 361–373.
339. Chen C., Yang Z., Tang X. Chemical modifications of nucleic acid drugs and their delivery systems for gene-based therapy // *Med Res Rev*. 2018. Vol. 38, № 3. P. 829–869.
340. McKenzie L.K. et al. Recent progress in non-native nucleic acid modifications // *Chem. Soc. Rev*. The Royal Society of Chemistry, 2021. Vol. 50, № 8. P. 5126–5164.
341. Moradian H. et al. Chemical modification of uridine modulates mRNA-mediated proinflammatory and antiviral response in primary human macrophages // *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 2022. Vol. 27. P. 854–869.
342. Irie A. et al. An artificial cationic oligosaccharide combined with phosphorothioate linkages strongly improves siRNA stability // *Sci Rep*. Nature Publishing Group, 2020. Vol. 10, № 1. P. 14845.
343. Wu S.Y. et al. 2'-f-OMe-phosphorodithioate modified siRNAs show increased loading into the RISC complex and enhanced anti-tumour activity // *Nat Commun*. 2014. Vol. 5. P. 3459.
344. Janas M.M. et al. Safety evaluation of 2'-deoxy-2'-fluoro nucleotides in GalNAc-siRNA conjugates // *Nucleic Acids Res*. 2019. Vol. 47, № 7. P. 3306–3320.
345. Michailidou F. et al. Synthesis and Conformational Analysis of Fluorinated Uridine Analogues Provide Insight into a Neighbouring-Group Participation Mechanism // *Molecules*. 2020. Vol. 25, № 23. P. 5513.
346. Hassler M.R. et al. Comparison of partially and fully chemically-modified siRNA in conjugate-mediated delivery in vivo // *Nucleic Acids Research*. 2018. Vol. 46, № 5. P. 2185–2196.

347. Shinohara F. et al. siRNA potency enhancement via chemical modifications of nucleotide bases at the 5'-end of the siRNA guide strand // *RNA*. 2021. Vol. 27, № 2. P. 163–173.
348. Jaafar M. et al. 2'-O-Ribose Methylation of Ribosomal RNAs: Natural Diversity in Living Organisms, Biological Processes, and Diseases // *Cells*. 2021. Vol. 10, № 8. P. 1948.
349. Gatta A.K. et al. Strategies for improving the specificity of siRNAs for enhanced therapeutic potential // *Expert Opinion on Drug Discovery*. Taylor & Francis, 2018. Vol. 13, № 8. P. 709–725.
350. Hamm S. et al. Alternating 2'-O-ribose methylation is a universal approach for generating non-stimulatory siRNA by acting as TLR7 antagonist // *Immunobiology*. 2010. Vol. 215, № 7. P. 559–569.
351. Biscans A. et al. The chemical structure and phosphorothioate content of hydrophobically modified siRNAs impact extrahepatic distribution and efficacy // *Nucleic Acids Res.* 2020. Vol. 48, № 14. P. 7665–7680.
352. Ni S. et al. Chemical Modifications of Nucleic Acid Aptamers for Therapeutic Purposes: 8 // *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2017. Vol. 18, № 8. P. 1683.
353. Sajid M.I. et al. Overcoming Barriers for siRNA Therapeutics: From Bench to Bedside // *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020. Vol. 13, № 10. P. 294.
354. Crooke S.T., Vickers T.A., Liang X. Phosphorothioate modified oligonucleotide–protein interactions // *Nucleic Acids Res.* 2020. Vol. 48, № 10. P. 5235–5253.
355. Kumari A., Kaur A., Aggarwal G. The emerging potential of siRNA nanotherapeutics in treatment of arthritis // *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2023. Vol. 18, № 5. P. 100845.
356. Pan Y., Zhou X., Yang Z. Progress of Oligonucleotide Therapeutics Target to Rna // *Nucleic Acids in Medicinal Chemistry and Chemical Biology*. John Wiley & Sons, Ltd, 2023. P. 373–427.
357. Chernikov I.V. et al. Fluorophore Labeling Affects the Cellular Accumulation and Gene Silencing Activity of Cholesterol-Modified siRNAs In Vitro // *Nucleic Acid Ther.* 2019. Vol. 29, № 1. P. 33–43.
358. Meschaninova M.I. et al. Novel Convenient Approach to the Solid-Phase Synthesis of Oligonucleotide Conjugates // *Molecules*. 2019. Vol. 24, № 23. P. 4266.
359. Luneva A.S. et al. Optimization of the Technology for the Preparation of Cationic Liposomes for the Delivery of Nucleic Acids: 6 // *Russ J Bioorg Chem.* 2018. Vol. 44, № 6. P. 724–731.
360. Petukhov I.A. et al. Synthesis of polycationic lipids based on cholesterol and spermine: 1 // *Russ Chem Bull.* 2010. Vol. 59, № 1. P. 260–268.

361. Kabilova T.O. et al. Targeted delivery of nucleic acids into xenograft tumors mediated by novel folate-equipped liposomes // *Eur J Pharm Biopharm.* 2018. Vol. 123. P. 59–70.
362. Mironova N. et al. Animal model of drug-resistant tumor progression // *Ann N Y Acad Sci.* 2006. Vol. 1091. P. 490–500.
363. Yan P. et al. Glycolysis Reprogramming in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Unveiling the Mystery of Lactate in the Lung // *Int J Mol Sci.* 2023. Vol. 25, № 1. P. 315.
364. Savin I.A., Zenkova M.A., Sen'kova A.V. Pulmonary Fibrosis as a Result of Acute Lung Inflammation: Molecular Mechanisms, Relevant In Vivo Models, Prognostic and Therapeutic Approaches // *Int J Mol Sci.* 2022. Vol. 23, № 23. P. 14959.
365. Zou S. et al. The role of neutrophil extracellular traps in sepsis and sepsis-related acute lung injury // *Int Immunopharmacol.* 2023. Vol. 124, № Pt A. P. 110436.
366. Meyer N.J., Gattinoni L., Calfee C.S. Acute respiratory distress syndrome // *Lancet.* 2021. Vol. 398, № 10300. P. 622–637.
367. Bochaton-Piallat M.-L., Gabbiani G., Hinz B. The myofibroblast in wound healing and fibrosis: answered and unanswered questions // *F1000Res.* 2016. Vol. 5. P. F1000 Faculty Rev-752.
368. Habiels D.M., Hogaboam C.M. Heterogeneity of Fibroblasts and Myofibroblasts in Pulmonary Fibrosis // *Curr Pathobiol Rep.* 2017. Vol. 5, № 2. P. 101–110.
369. Upagupta C. et al. Matrix abnormalities in pulmonary fibrosis // *Eur Respir Rev.* 2018. Vol. 27, № 148. P. 180033.
370. Kumar V. et al. Type 1 invariant natural killer T cells in chronic inflammation and tissue fibrosis // *Front Immunol.* 2023. Vol. 14. P. 1260503.
371. Mertowska P. et al. Immunomodulatory Role of Interferons in Viral and Bacterial Infections // *Int J Mol Sci.* 2023. Vol. 24, № 12. P. 10115.
372. Kany S., Vollrath J.T., Relja B. Cytokines in Inflammatory Disease // *Int J Mol Sci.* 2019. Vol. 20, № 23. P. 6008.
373. Ding X., Ren Y., He X. IFN- γ Mediates Lupus Nephritis From the Beginning to Renal Fibrosis // *Frontiers in Immunology.* 2021. Vol. 12.
374. Degryse A.L., Lawson W.E. Progress toward improving animal models for idiopathic pulmonary fibrosis // *Am J Med Sci.* 2011. Vol. 341, № 6. P. 444–449.
375. Liu T., De Los Santos F.G., Phan S.H. The Bleomycin Model of Pulmonary Fibrosis // *Fibrosis: Methods and Protocols* / ed. Rittié L. New York, NY: Springer, 2017. P. 27–42.
376. Ye R., Liu Z. ACE2 exhibits protective effects against LPS-induced acute lung injury in mice by inhibiting the LPS-TLR4 pathway // *Exp Mol Pathol.* 2020. Vol. 113. P. 104350.

377. Vysochinskaya V. et al. Influence of Lipid Composition of Cationic Liposomes 2X3-DOPE on mRNA Delivery into Eukaryotic Cells: 1 // *Pharmaceutics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2023. Vol. 15, № 1. P. 8.
378. He S., Yao L., Li J. Role of MCP-1/CCR2 axis in renal fibrosis: Mechanisms and therapeutic targeting // *Medicine (Baltimore)*. 2023. Vol. 102, № 42. P. e35613.
379. Kang J. et al. Notch-mediated hepatocyte MCP-1 secretion causes liver fibrosis // *JCI Insight*. 2023. Vol. 8, № 3. P. e165369.
380. Inoshima I. et al. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates pulmonary fibrosis in mice // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004. Vol. 286, № 5. P. L1038-1044.
381. Xia Y., Frangogiannis N.G. MCP-1/CCL2 as a therapeutic target in myocardial infarction and ischemic cardiomyopathy // *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2007. Vol. 6, № 2. P. 101–107.
382. Chen W. et al. Blocking interleukin-6 trans-signaling protects against renal fibrosis by suppressing STAT3 activation // *Theranostics*. 2019. Vol. 9, № 14. P. 3980–3991.
383. Han D. et al. Hesperidin inhibits lung fibroblast senescence via IL-6/STAT3 signaling pathway to suppress pulmonary fibrosis // *Phytomedicine*. 2023. Vol. 112. P. 154680.
384. Borthwick L.A. The IL-1 cytokine family and its role in inflammation and fibrosis in the lung // *Semin Immunopathol*. 2016. Vol. 38, № 4. P. 517–534.
385. Suwara M.I. et al. IL-1 α released from damaged epithelial cells is sufficient and essential to trigger inflammatory responses in human lung fibroblasts // *Mucosal Immunol*. 2014. Vol. 7, № 3. P. 684–693.
386. Boopathi E., Thangavel C. Dark Side of Cancer Therapy: Cancer Treatment-Induced Cardiopulmonary Inflammation, Fibrosis, and Immune Modulation // *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22, № 18. P. 10126.
387. Kobayashi S.D., Malachowa N., DeLeo F.R. Neutrophils and Bacterial Immune Evasion // *J Innate Immun*. 2018. Vol. 10, № 5–6. P. 432–441.
388. Shi X. et al. Transforming Growth Factor- β Signaling in Fibrotic Diseases and Cancer-Associated Fibroblasts // *Biomolecules*. 2020. Vol. 10, № 12. P. 1666.
389. Diaz K.T. et al. Delivery and safety of inhaled interferon- γ in idiopathic pulmonary fibrosis // *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2012. Vol. 25, № 2. P. 79–87.
390. Chen M. et al. Adeno-associated virus mediated interferon-gamma inhibits the progression of hepatic fibrosis in vitro and in vivo // *World J Gastroenterol*. 2005. Vol. 11, № 26. P. 4045–4051.

391. Steen E.H. et al. The Role of the Anti-Inflammatory Cytokine Interleukin-10 in Tissue Fibrosis // *Adv Wound Care* (New Rochelle). 2020. Vol. 9, № 4. P. 184–198.
392. Shamskhov E.A. et al. Hydrogel-based delivery of Il-10 improves treatment of bleomycin-induced lung fibrosis in mice // *Biomaterials*. 2019. Vol. 203. P. 52–62.
393. Ågren M.S. et al. Tumor necrosis factor- α -accelerated degradation of type I collagen in human skin is associated with elevated matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 ex vivo // *European Journal of Cell Biology*. 2015. Vol. 94, № 1. P. 12–21.
394. Steele H. et al. TNF superfamily control of tissue remodeling and fibrosis // *Front Immunol*. 2023. Vol. 14. P. 1219907.
395. Kimura T. et al. Exacerbation of bleomycin-induced injury by lipopolysaccharide in mice: establishment of a mouse model for acute exacerbation of interstitial lung diseases // *Eur J Cardiothorac Surg*. 2015. Vol. 48, № 4. P. e85-91.
396. Shmendel E.V. et al. Uncharged Gemini-Amphiphiles as Components of Cationic Liposomes for Delivery of Nucleic Acids: 6 // *Russ J Bioorg Chem*. 2020. Vol. 46, № 6. P. 1250–1260.
397. Burn O.K., Prasit K.K., Hermans I.F. Modulating the Tumour Microenvironment by Intratumoural Injection of Pattern Recognition Receptor Agonists: 12 // *Cancers* (Basel). 2020. Vol. 12, № 12. P. 3824.
398. Ong G.H. et al. Exploration of Pattern Recognition Receptor Agonists as Candidate Adjuvants // *Front Cell Infect Microbiol*. 2021. Vol. 11. P. 745016.
399. Nunes S.S. et al. Influence of PEG coating on the biodistribution and tumor accumulation of pH-sensitive liposomes: 1 // *Drug Deliv Transl Res*. 2019. Vol. 9, № 1. P. 123–130.
400. Meng F., Wang J., Yeo Y. Nucleic acid and oligonucleotide delivery for activating innate immunity in cancer immunotherapy // *Journal of Controlled Release*. 2022. Vol. 345. P. 586–600.
401. Mendes B.B. et al. Nanodelivery of nucleic acids: 1 // *Nat Rev Methods Primers*. Nature Publishing Group, 2022. Vol. 2, № 1. P. 1–21.
402. Kiaie S.H. et al. Recent advances in mRNA-LNP therapeutics: immunological and pharmacological aspects // *J Nanobiotechnology*. 2022. Vol. 20. P. 276.
403. Hokeness K.L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 interactions are required for IFN- α /beta-induced inflammatory responses and antiviral defense in liver: 3 // *J Immunol*. 2005. Vol. 174, № 3. P. 1549–1556.
404. Gill N. et al. Induction of Innate Immunity against Herpes Simplex Virus Type 2 Infection via Local Delivery of Toll-Like Receptor Ligands Correlates with Beta Interferon

Production: 20 // Journal of Virology. American Society for Microbiology, 2006. Vol. 80, № 20. P. 9943–9950.

405. Torres-Vanegas J.D., Cruz J.C., Reyes L.H. Delivery Systems for Nucleic Acids and Proteins: Barriers, Cell Capture Pathways and Nanocarriers // *Pharmaceutics*. 2021. Vol. 13, № 3. P. 428.

406. Gladkikh D.V. et al. Folate-Equipped Cationic Liposomes Deliver Anti-MDR1-siRNA to the Tumor and Increase the Efficiency of Chemotherapy // *Pharmaceutics*. 2021. Vol. 13, № 8. P. 1252.

407. Kabilova T.O. et al. Targeted delivery of nucleic acids into xenograft tumors mediated by novel folate-equipped liposomes // *Eur J Pharm Biopharm*. 2018. Vol. 123. P. 59–70.

408. Yan Y. et al. Non-viral vectors for RNA delivery // *J Control Release*. 2022. Vol. 342. P. 241–279.

409. Stickdorn J. et al. Systemically Administered TLR7/8 Agonist and Antigen-Conjugated Nanogels Govern Immune Responses against Tumors: 3 // *ACS Nano*. American Chemical Society, 2022. Vol. 16, № 3. P. 4426–4443.

410. Obermann H.-L. et al. RNA-Cholesterol Nanoparticles Function as Potent Immune Activators via TLR7 and TLR8 // *Front Immunol*. 2022. Vol. 12. P. 658895.

411. Jacobson M.E. et al. Structural Optimization of Polymeric Carriers to Enhance the Immunostimulatory Activity of Molecularly Defined RIG-I Agonists: 11 // *ACS Cent Sci*. 2020. Vol. 6, № 11. P. 2008–2022.

412. Kim Y. et al. PKR Senses Nuclear and Mitochondrial Signals by Interacting with Endogenous Double-Stranded RNAs: 6 // *Molecular Cell*. 2018. Vol. 71, № 6. P. 1051-1063.e6.

413. Goncharova E.P. et al. Immunostimulating RNA Delivered by P1500 PEGylated Cationic Liposomes Limits Influenza Infection in C57Bl/6 Mice: 9 // *Pharmaceutics*. 2020. Vol. 12, № 9. P. 875.

414. Dalglish A.G. Why do the majority of patients not respond at all, or only partially or transiently, to immunotherapy? 12 // *Expert Review of Anticancer Therapy*. Taylor & Francis, 2019. Vol. 19, № 12. P. 1001–1003.

415. Chandler M. et al. Innate Immune Responses Triggered by Nucleic Acids Inspire the Design of Immunomodulatory Nucleic Acid Nanoparticles (NANPs)* // *Therapeutic RNA Nanotechnology*. Jenny Stanford Publishing, 2021. 16 p.

416. Volkov A.A. et al. Selective protection of nuclease-sensitive sites in siRNA prolongs silencing effect // *Oligonucleotides*. 2009. Vol. 19, № 2. P. 191–202.

417. Kim S. et al. Development of Long Asymmetric siRNA Structure for Target Gene Silencing and Immune Stimulation in Mammalian Cells // *Nucleic Acid Therapeutics*. Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 2023. Vol. 33, № 5. P. 329–337.

418. Goodchild A. et al. Sequence determinants of innate immune activation by short interfering RNAs // BMC Immunology. 2009. Vol. 10, № 1. P. 40.
419. Angart P. et al. Design of siRNA Therapeutics from the Molecular Scale: 4 // Pharmaceuticals. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2013. Vol. 6, № 4. P. 440–468.
420. Kim J.Y. et al. Immune activation by siRNA/liposome complexes in mice is sequence- independent: lack of a role for Toll-like receptor 3 signaling // Mol Cells. 2007. Vol. 24, № 2. P. 247–254.
421. Jin L. et al. Perspectives and Prospects on mRNA Vaccine Development for COVID-19 // Curr Med Chem. 2022. Vol. 29, № 23. P. 3991–3996.