

На правах рукописи



ЧЕРНИКОВ ИВАН ВЯЧЕСЛАВОВИЧ

**ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ ЛИПОФИЛЬНЫХ КОНЬЮГАТОВ МАЛЫХ  
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК НА ИХ НАКОПЛЕНИЕ В КЛЕТКАХ И  
БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ *IN VITRO* И *IN VIVO***

03.01.03 – молекулярная биология

Автореферат  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2019

Работа выполнена в Институте химической биологии и фундаментальной  
медицины СО РАН

**Научный руководитель:**

**Черноловская Елена Леонидовна**, д.б.н.

**Официальные оппоненты:**

**Прасолов Владимир Сергеевич**, д.б.н., профессор,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, г.н.с.

**Рыкова Елена Юрьевна**, д.б.н.,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО  
РАН, с.н.с.

**Васильев Геннадий Владимирович**, к.б.н.,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и  
генетики СО РАН, в.н.с.

Защита состоится « 6 » декабря 2019 г. в 12 часов  
на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 при Институте  
химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу:  
630090, Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической  
биологии и фундаментальной медицины СО РАН

С авторефератом можно ознакомиться на сайте [www.niboch.nsc.ru](http://www.niboch.nsc.ru)

Автореферат разослан « 6 » ноября \_\_\_\_\_ 2019 г.

Учёный секретарь диссертационного совета  
к.х.н., доцент

Коваль В. В.



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Создание препаратов на основе siРНК является перспективным подходом к лечению заболеваний, связанных с нарушением экспрессии определённых генов, которые не поддаются лечению стандартными методами. Однако, доставка siРНК в клетки-мишени *in vitro* и, особенно, *in vivo* остаётся в настоящее время наиболее сложной и актуальной задачей, решение которой необходимо для внедрения результатов биомедицинских исследований в клиническую практику. Введение остатков молекул природного происхождения в состав siРНК путём прямого конъюгирования с siРНК на сегодняшний день является наиболее перспективной технологией доставки, поскольку, в отличие от других подходов (вирусы, доставка с помощью катионных липидов и полимеров), преимуществами использования биоконъюгатов являются специфичность их проникновения в клетки-мишени и отсутствие токсических эффектов. Систематическое исследование структурно-функциональных закономерностей свойств биоконъюгатов siРНК на нескольких моделях может позволить сформулировать принципы конструирования ингибиторов экспрессии терапевтически значимых генов на основе химически модифицированных siРНК, способных эффективно накапливаться в опухоли и оказывать биологический эффект *in vivo*. Поэтому исследования, направленные на изучение управления свойствами биоконъюгатов siРНК являются актуальными. Гемопоэтические клетки считаются наиболее сложными для доставки в них siРНК, при этом разработка систем доставки siРНК в данные клетки впоследствии может способствовать значительному увеличению эффективности антиретровирусной терапии и эффективности лечения опухолевых заболеваний крови. Поэтому оценка возможности использования биоконъюгатов для доставки siРНК в гемопоэтические клетки является актуальной.

**Целью работы** являлось исследование влияния структуры холестеринного конъюгата siРНК на его накопление и биологическую активность в опухолевых клетках различного происхождения и определение накопления и биологической активности выбранного конъюгата *in vivo*. В ходе исследования решались следующие **задачи**:

1. Получить модельные клеточные линии на основе линий K562, KB-8-5 и KB-3-1 для быстрого скрининга биологической активности конъюгатов siРНК направленных на подавление гена *MDR1*.
2. Исследовать влияние природы липофильной молекулы, места присоединения и длины линкера в составе siРНК на их взаимодействие с клетками различного происхождения *in vitro* и *ex vivo*.
3. Исследовать механизм проникновения флуоресцентно-меченого холестеринного производного siРНК в клетки KB-3-1 и K562.
4. Исследовать влияние флуорофора на взаимодействие холестеринных производных siРНК с клетками *in vitro*.

5. Определить влияние стабильности линкера в составе холестериновых конъюгатов siРНК на их биологическую активность *in vitro*.

6. Исследовать биораспределение и биологическую активность холестеринового производного анти-*MDR1* siРНК выбранной структуры *in vivo*.

**Научная новизна и практическая ценность работы.** В данной работе впервые было проведено систематическое исследование влияния структуры липофильных производных siРНК на их доставку и биологическую активность на нескольких моделях. Было показано, что природа липофильной молекулы, место присоединения и длина, но не стабильность линкера в составе конъюгата siРНК влияют на её взаимодействие с клетками при доставке без трансфекционного агента. В ходе скрининга накопления и биологической активности конъюгатов нами впервые было установлено, что конъюгирование флуорофоров с холестерин-содержащими siРНК может влиять на их накопление и биологическую активность при доставке без трансфекционного агента. Для выбранной холестерин-содержащей модифицированной siРНК впервые была исследована способность подавления экспрессии гена-мишени на модели опухолевой прогрессии *in vivo* и определены оптимальные способы её введения. Показано, что независимо от исследуемого способа введения холестерин-содержащая siРНК эффективно подавляет экспрессию гена-мишени в привитой ксенографтной опухоли. Практическая значимость работы состоит в том, что был разработан прототип лекарственного препарата для создания его основе агента для повышения эффективности лечения опухолей с МЛУ.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Природа липофильной молекулы, место присоединения и длина, но не стабильность линкера в составе конъюгата siРНК влияют на её взаимодействие с клетками различного происхождения *in vitro* и *ex vivo* при доставке в клетки без трансфекционного агента.

2. Проникновение флуоресцентно-меченого 5'-холестеринового конъюгата siРНК в клетки KB-3-1 и K562 происходит по нескольким механизмам, вклад которых отличается в зависимости от типа клеток и наличия сыворотки.

3. Присоединение флуорофора к 3'-концу антисмысловой цепи практически не влияет на эффективность накопления 5'-холестеринового конъюгата, однако значительно увеличивает накопление 3'-конъюгата при доставке в клетки без носителя, а так же блокирует проявление биологической активности конъюгатов при доставке в клетки без носителя, что указывает на «непродуктивное» накопление флуоресцентно-меченных конъюгатов.

4. Присоединение холестерина на 5'-конец смысловой цепи анти-*MDR1* siРНК увеличивает время её циркуляции в кровотоке, способствует накоплению в клетках крови, внутренних органах и опухоли после системного введения. Такие конъюгаты способны эффективно подавлять

экспрессию гена-мишени в клетках лекарственно-устойчивой опухоли после внутривенного, интраперитонеального или перитуморального введения.

**Публикации и апробация работы.** По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ. Результаты работы представлены на 9 конференциях: 38-ом Конгрессе FEBS (Санкт-Петербург, 2013), Русско-Британских семинарах «Targeting the RNA World: The Future of Nucleic Acid Therapeutics» (Санкт-Петербург, 2015) и «Targeting the RNA World: Using Chemistry to Understand RNA Biology» (Алтай, 2015), 20-ом Международном круглом столе «Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids» (Париж, 2016), Международной конференции «Targeting the RNA World» (Санкт-Петербург, 2016), «Expanding Frontiers of RNA Chemistry and Biology» (Новосибирск, 2016), «Targeting RNA World» (Санкт-Петербург, 2018), «The 14th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society» (Сизтл, 2018). и «The 15th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society» (Мюнхен, Германия, 2019).

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 162 страницах, содержит 38 рисунков и 7 таблиц. Библиография содержит 400 литературных источников.

**Вклад автора.** Основные результаты, приведенные в диссертации, получены самим автором или при его непосредственном участии. Исследование локализации и накопления siРНК в органах мышей было выполнено совместно с Гладких Д.В.. Автор выражает благодарность своему научному руководителю д.б.н. Черноловской Е.Л. за руководство, анализ и обсуждение полученных результатов.

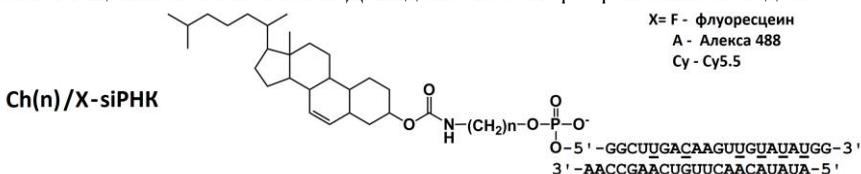
## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**1. Влияние структуры липофильных производных siРНК на их взаимодействие с клетками различного происхождения.**

**1.1. Влияние длины линкера в составе холестериновых производных siРНК на их накопление в клетках различного происхождения *in vitro*.**

Ранее в нашей лаборатории был разработан алгоритм селективной модификации siРНК, который включает в себя защиту нуклеазочувствительных сайтов (UpG, UpA и CpA) путём введения 2'-О-метильных аналогов нуклеотидов с 3' стороны от легко расщепляемой связи. Было показано, что siРНК D-типа (siD) направленная к району 557-577 н. мРНК гена *MDR1* (табл. 1) и её селективно модифицированный аналог, siDm, содержащий 2'-О-метильные звенья в нуклеазочувствительных сайтах способны эффективно ингибировать экспрессию данного гена в клетках KB-8-5 при трансфекции Липофектаминоном 2000 (далее по тексту - Lf). Было показано, что среди исследованных липофильных производных конъюгатов, производное siDm, содержащее холестерин на 5' конце смысловой цепи наиболее эффективно накапливалось в отсутствие трансфекционного агента в

клетках KB-8-5, ингибировало экспрессию гена *MDR1* и восстанавливало чувствительность данных раковых клеток к винбластину. При этом было установлено, что конъюгат siРНК и холестерина с линкером 12 метиленовых звеньев (Ch12-siDm) более эффективно накапливался в клетках KB-8-5, но проявлял меньшую биологическую активность, чем конъюгаты, содержащие линкеры 6 (Ch6-siDm) и 3 (Ch3-siDm) метиленовых звеньев. Было выдвинуто предположение, что холестериновые производные, содержащие линкер длиной 8 или 10 метиленовых звеньев (Ch8-siDm и Ch10-siDm, соответственно) могут обладать более эффективным накоплением и биологической активностью, чем конъюгат Ch6-siDm или Ch12-siDm (рис. 1). Производные были получены в Лаборатории Химии РНК ИХБФМ СО РАН к.х.н. Мещанинова М.И. и к.х.н. Довыденко И.С. Н-фосфонатным методом.

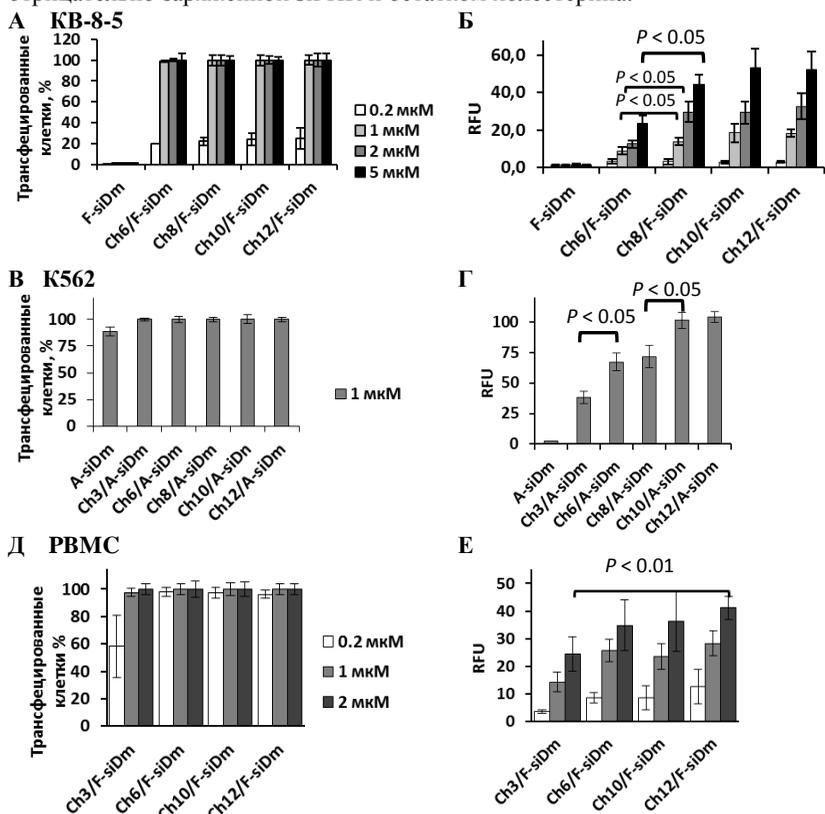


**Рис. 1.** Структура холестериновых производных siРНК, где (n) - число метиленовых звеньев (3, 6, 8, 10 или 12), C и U - 2'-О-метиленые аналоги C и U соответственно.

На первом этапе мы исследовали влияние длины линкера в составе флуорофор-меченых аналогов холестериновых производных siРНК на их накопление в клетках различного происхождения: KB-8-5, K562 и РВМС здорового донора. Выбор именно этих клеточных линий был обусловлен тем, что клетки KB-8-5 представляют интерес, поскольку являются раковыми клетками с *MDR1*-опосредованной лекарственной устойчивостью, K562 являются клетками хронического миелоидного лейкоза, а РВМС представляют собой первичную культуру гемопоэтических клеток. Исследование эффективности накопления меченых флуорофором (Флуоресцеин или Алекса 488) холестериновых производных siРНК проводили методом проточной цитофлуорометрии.

В ходе работы нами было показано, что все исследованные холестериновые конъюгаты эффективно накапливались в клетках: при концентрации 1 мкМ эффективность трансфекции составляла 100 %, тогда как неконъюгированная siРНК не проникала в клетки без Lf (рис. 2). При анализе среднего уровня интенсивности флуоресценции было показано, что эффективность накопления конъюгатов, содержащих линкеры длиной 8, 10 и 12 метиленовых звеньев, во была несколько выше по сравнению с конъюгатом, содержащим линкер длиной 6 метиленовых звеньев (Рис. 2 А, В, Д). Тенденция увеличения эффективности накопления при увеличении длины линкера сохранялась для всех клеточных линий. Липофильная природа холестерина позволяет предположить, что механизм проникновения

холестериновых производных siРНК в клетки на первом этапе включает «заякорение» конъюгатов в мембране, поэтому увеличение длины линкера, может облегчать этот процесс, за счет увеличения расстояния между отрицательно заряженной siРНК и остатком холестерина.



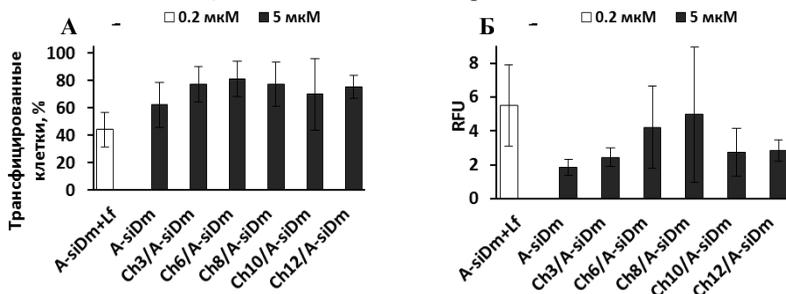
**Рис. 2.** Накопление флуорофор-меченых холестеринных производных siРНК, содержащих линкеры различной длины в клетках KB-8-5 (А, Б), K562 (В, Г) и PBMNC (Д, Е). Исследования проводили при помощи проточной цитофлуорометрии, статистическая значимость ( $P$ ) приведена на рисунке.

### 1.2. Влияние длины линкера в составе холестеринных производных siРНК на их накопление в клетках крови *ex vivo*.

Для того, чтобы оценить влияние сыворотки и электролитов плазмы на накопление холестеринных производных siРНК в клетках крови проводилась инкубация конъюгатов с цельной кровью здорового донора *ex vivo* (рис. 3). К отобранной крови, содержащей антикоагулянт, добавляли конъюгаты siРНК и холестерина до конечной концентрации 5 мкМ. Трансфекцию неконъюгированной siРНК проводили при помощи Lf в концентрации 0.2

мкМ для того, что бы сохранить рекомендуемое производителем соотношение количества Lf и siРНК для эффективного образования комплексов, поскольку более высокая концентрация Lf была бы токсична для клеток. Показано, что доля трансфицированных клеток крови донора после их инкубации с холестерин-содержащими siРНК составила 70-80 %, что превышает это значение для неконъюгированной siРНК (62 %), а также превышает количество клеток, трансфицированных неконъюгированной siРНК при помощи Lf (44 %) (рис. 3А). Анализ средней интенсивности флуоресценции клеток показал, что накопление холестеринных конъюгатов зависит от длины линкера, соединяющего холестерин с siРНК (рис. 3Б), при этом, наибольшую эффективность накопления показали конъюгаты siРНК с линкерами длиной 6 и 8 метиленовых звеньев.

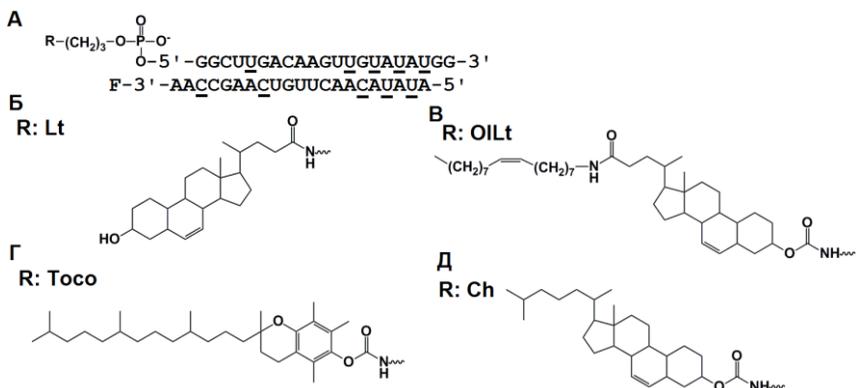
Вероятно, в условиях *ex vivo* из-за наличия компонентов сыворотки конъюгаты с более длинными линкерами (10 и 12 метиленовых звеньев) из-за своей большей гидрофобности эффективнее взаимодействовали с компонентами сыворотки, а не с клетками крови.



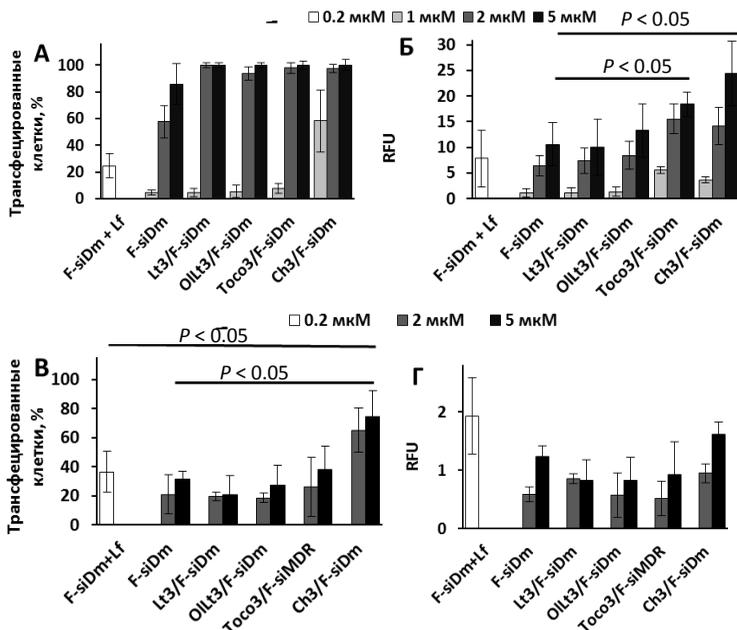
**Рис. 3.** Накопление Alexa 488-меченых холестеринных производных siРНК, содержащих линкеры различной длины в клетках в составе цельной крови здорового донора.

### 1.3. Влияние природы липофильной молекулы в составе производных siРНК на их взаимодействие с гемопоэтическими клетками *in vitro* и *ex vivo*.

Для исследования влияния природы липофильной молекулы на эффективность накопления производных siРНК в гемопоэтических клетках человека, основываясь на литературных данных, были выбраны следующие молекулы: холестерин, α-токоферол, литохоловая кислота и олеиламид литохоловой кислоты. Конъюгаты siРНК и липофильных молекул были синтезированы к.х.н. Мещаниновой М.И. в лаборатории Химии РНК (ЛХРНК) ИХБФМ СО РАН. Показано, что доля клеток, трансфицированных липофильными конъюгатами siРНК в концентрации 2 и 5 мкМ, была выше по сравнению с неконъюгированной siРНК в свободном виде и siРНК, доставляемой при помощи Lf (рис. 5А). При этом эффективность накопления липофильных производных siРНК в клетках РВМС увеличивалась в



**Рис. 4.** Структура липофильных производных siРНК (А), где R – остатки липофильных молекул, введенные с 5'-конца смысловой цепи: литохоловая кислота (Б), олеиламид литохоловой кислоты (В),  $\alpha$ -токоферол (Г), холестерин (Д), связанные с siРНК алифатическим аминоклином с тремя метиленовыми звеньями, F - флуоресцеин, C и U - 2'-O-метильные аналоги C и U соответственно.



**Рис. 5.** Накопление флуоресцентно меченых аналогов липофильных производных siРНК в клетках РВМС (А, Б) и клетках цельной крови человека (В, Г). Доля трансфицированных клеток (А, В) и средние значения флуоресценции популяции клеток (Б, Г) представлены на рисунке.

зависимости от типа липофильной молекулы в ряду литохолевая кислота <олеиламид литохолевой кислоты <токоферол <холестерин и составляла 10, 13, 18 и 24 RFU при 5 мкМ, соответственно (рис. 5Б).

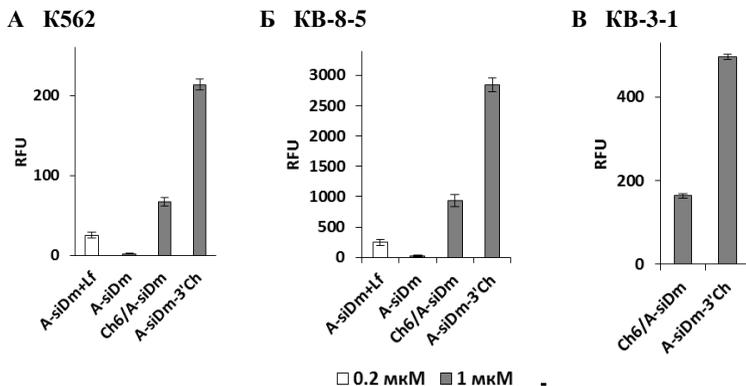
Для того, чтобы оценить влияние сыворотки и электролитов плазмы на накопление липофильных конъюгатов в клетках крови проводили их инкубацию с цельной кровью человека *ex vivo*. Показано, что эффективность накопления конъюгатов зависит от типа липофильной молекулы и так же увеличивается в ряду литохолевая кислота > олеиламид литохолевой кислоты > токоферол > холестерин, доля трансфицированных клеток составила 21, 27, 38 и 74 % при 5 мкМ, соответственно (рис. 5В). Из полученных нами данных видно, что взаимодействие в клетками в составе цельной крови происходит менее эффективно, чем с теми же клетками, находящимися в культуральной среде, поэтому подбор оптимальных средств доставки для этого типа клеток-мишеней особенно важен. Поскольку холестериновые производные накапливались в клетках крови с большей эффективностью, по сравнению с остальными исследованными конъюгатами, можно сделать вывод, что конъюгирование siРНК с холестерином является перспективной стратегией для доставки siРНК в этот тип клеток.

#### 1.4. Влияние места присоединения остатка холестерина в составе производных siРНК на их накопление в клетках различного происхождения.

С химической точки зрения, присоединение лиганда к siРНК может осуществляться практически по любому фосфату, рибозе или азотистому основанию дуплекса. Однако, наиболее оптимальными способами введения холестерина в состав siРНК являются его присоединение к 5' или 3' концам смысловой цепи. Оба типа конъюгатов описаны в литературе, однако, систематического исследования на одной модели проведено не было. Поэтому мы исследовали влияние места присоединения холестерина на накопление производного siРНК в клетках различного происхождения (K562, KB-8-5 и KB-3-1). Показано, что Alexa 488-меченые 3' конъюгаты накапливаются в 3 раза более эффективно, чем 5' конъюгаты во всех исследованных линиях клеток (рис. 6). При этом наблюдается увеличение эффективности накопления как 3', так и 5' конъюгатов в ряду K562 < KB-8-5 < KB-3-1. Несмотря на более короткий линкер в конъюгате siРНК-3'Ch, его накопление во всех исследуемых линиях значительно превышало накопление Ch6-siРНК. Можно предположить, что лиганд на 3' конце более доступен для взаимодействия с клеточной мембраной, что увеличивает эффективность «заякорения» холестеринового производного в мембране клетки.



Рис. 6. Структура 3'-холестериновых производных siРНК, где А – флуорофор Alexa 488.

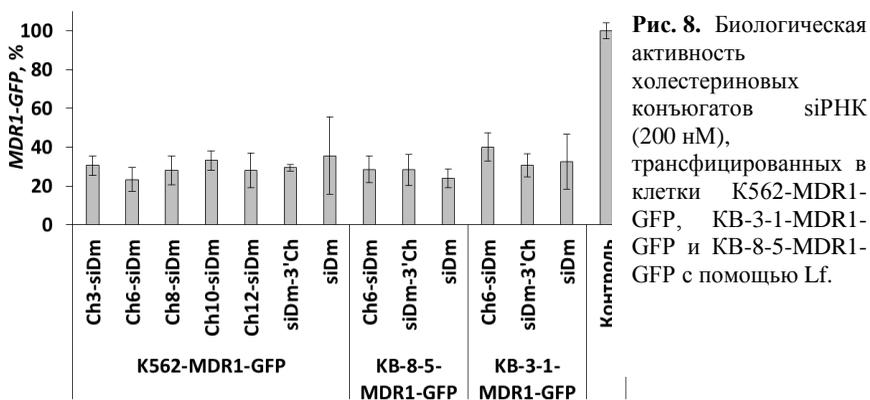


**Рис. 7.** Накопление Alexa-488-меченых 3' и 5' - холестеринowych производных siРНК в клетках K562 (А), KB-8-5 (Б) или KB-3-1 (В). Исследования проводили при помощи проточной цитофлуорометрии (FC 500 (А, В) Novocyte (Б)), в каждом образце анализировали 10,000 клеток.

## 2. Влияние структуры конъюгатов siРНК и холестерина на их биологическую активность.

### 2.1. Влияние структуры конъюгатов siРНК и холестерина на их биологическую активность при трансфекции Липофектаминном.

С целью упрощения скрининга биологической активности в клетках K562, KB-3-1 и KB-8-5 на их основе получены модельные клеточные линии путём трансдукции лентивирусами, несущими химерный ген, содержащий последовательности фрагмента гена *MDR1* и последовательность гена *EGFP*, экспрессирующиеся в составе единого транскрипта. После трансдукции и сортировки доля клеток, экспрессирующих флуоресцентный белок составила практически 100 % для всех клеток.



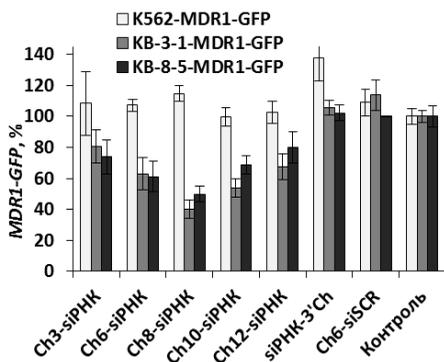
**Рис. 8.** Биологическая активность холестеринowych конъюгатов siРНК (200 нМ), трансфицированных в клетки K562-MDR1-GFP, KB-3-1-MDR1-GFP и KB-8-5-MDR1-GFP с помощью Lf.

Биологическую активность производных siРНК в клетках K562-MDR1-GFP, KB-3-1-MDR1-GFP и KB-8-5-MDR1-GFP оценивали по снижению

уровня флуоресценции популяции клеток, обработанных siРНК по сравнению с контролем. В ходе работы было показано, что во всех исследуемых линиях клеток биологическая активность 5' и 3' холестериновых конъюгатов siDm не отличалась от siDm (рис. 7 А, Б). Следовательно, присоединение холестерина как на 5', так и на 3' конец смысловой цепи не блокирует interfering activity siРНК.

## 2.2. Влияние структуры конъюгатов siРНК и холестерина на их биологическую активность без Липофектамина.

После добавления конъюгатов siРНК клеткам K562-MDR1-GFP, KB-3-1-MDR1-GFP и KB-8-5-MDR1-GFP и анализа их флуоресценции было показано, что наибольшей биологической активностью обладают 5' конъюгаты, содержащие линкеры 6-10 метиленовых звеньев. Интересно, что 3' конъюгат, который накапливался в исследованных клетках в 3 раза эффективнее 5' конъюгата с линкером 6 метиленовых звеньев (рис. 7), не обладал биологической активностью в этих клетках (рис. 9). Вероятно, структура этого конъюгата способствует его «непродуктивному» накоплению в клетках. Биологическая активность холестериновых конъюгатов siРНК в клетках K562-MDR1-GFP при исследуемой концентрации (5 мкМ) не проявлялась, несмотря на эффективное накопление (рис. 7). Полученные данные не согласуются с данными накопления (рис. 2), где было показано, что при увеличении длины линкера происходит увеличение накопления соответствующего конъюгата. При этом увеличение линкера с 6 до 8-10 атомов углерода способствуют значительному увеличению накопления конъюгата, но практически не влияет на его биологическую активность (рис. 9). Дальнейшее удлинение линкера с 10 до 12 приводит к уменьшению его биологической активности.



**Рис. 9.** Биологическая активность холестериновых конъюгатов siРНК при их добавлении к клеткам K562-MDR1-GFP (5 мкМ), KB-3-1-MDR1-GFP (2 мкМ) и KB-8-5-MDR1-GFP (2 мкМ). Измерение уровня экспрессии гена *MDR1-GFP* производили через 72 часа. Полученные результаты были нормированы на флуоресценцию необработанных клеток.

Таким образом, нами было установлено, что присоединение на 5'-конец линкером с 6-10 атомами углерода являются оптимальными для введения остатка холестерина в состав анти-*MDR1* siРНК, для использования их в клетках KB-3-1 и KB-8-5, поскольку обеспечивает баланс между

эффективностью накопления и биологической активностью siРНК. Также, в ходе работы возник вопрос о причинах того, почему 3'-конъюгат (siDm-3'Ch) и 5'-конъюгат содержащий линкер с 12 атомами углерода (Ch12-siDm) обладают низкой биологической активностью несмотря на то, что наиболее эффективно накапливаются в клетках.

### 3. Исследование механизма проникновения холестеринаного производного siРНК в клетки KB-3-1 и K562.

В ходе изучения биологической активности холестеринных производных siРНК в клетках возникли вопросы о том, чем отличается механизм накопления Ch6-siDm в клетках KB-3-1 и а клетках K562 и какой механизм накопления является «продуктивным», поэтому мы изучили механизм проникновения холестеринного производного siРНК в клетки KB-3-1 и K562. Для этого за 30 мин. до добавления Alexa 488-меченой холестерин-содержащей siРНК (Ch6/A-siDm) к клеткам добавляли ингибиторы эндоцитоза до необходимой концентрации и через 4 часа анализировали накопление Ch6/A-siDm. В ходе работы было показано, что накопление Ch6/A-siDm в клетках KB-3-1 происходит преимущественно путём макропиноцитоза, значение интенсивности флуоресценции уменьшилось на 42 и 53 % в среде без сыворотки и в присутствии её, соответственно, в присутствии ЕРА (табл. 1).

**Таблица 1.** Эффективность накопления Alexa-488 меченой Ch6-siРНК в клетках KB-3-1 и K562 в среде с сывороткой (+S) и без неё (-S) через 4 часа после добавления конъюгата и ингибиторов эндоцитоза (данные приведены в %, относительно интенсивности флуоресценции необработанных ингибиторами клеток с Alexa-488 меченой Ch6-siРНК).

		KB-3-1		K562	
Тип эндоцитоза	Ингибитор	-S	+S	-S	+S
-	Без ингибитора	100±2	100±1	100±5	100±6
Клатрин-зависимый эндоцитоз	Хл.	92±3	71±2	63±1	68±2
	МДК	85±2	71±3	42±1	60±7
Липидные рафты	Нистатин	81±1	91±1	74±1	96±6
Макропиноцитоз	ЕРА	58±1	47±1	88±2	101±2

Основным способом накопления Ch6/A-siDm в клетках K562 является клатрин-зависимый эндоцитоз (47 и 36 % в среде без сыворотки и с сывороткой, соответственно, рис. 9Б). Для анализа влияния ингибиторов эндоцитоза на биологическую активность siРНК через 4 часа после их добавления к клеткам KB-3-1-MDR1-GFP и K562-MDR1-GFP их промывали и меняли на свежую среду; через 3 дня после этого проводили анализ биологической активности Ch6-siDm методом проточной цитофлуометрии. Интересно, что биологическая активность Ch6-siDm не зависела от

присутствия ингибиторов эндоцитоза (данные не показаны), поэтому можно предположить, что Ch6-siDm проникает в клетки по нескольким механизмам и, таким образом, при блокировании одного из них биологическая активность не изменяется, либо проникновение Ch6-siDm происходит по механизму на который не влияют данные ингибиторы.

#### 4. Исследования влияния флуорофора на взаимодействие холестерина производных siРНК с клетками.

В ходе работы нами было показано, что 3'-конъюгат (siDm-3'Ch) и 5'-конъюгат содержащий линкер с 12 атомами углерода (Ch12-siDm) наиболее эффективно накапливаются в клетках, однако, при этом возник вопрос о причинах того, почему они обладают низкой биологической активностью при доставке без трансфекционного агента. Возможными причинами этого могут быть: изменение термодинамической стабильности и асимметрии дуплекса; низкая эффективность выхода из эндосом; влияние флуорофора на взаимодействие конъюгата с клеткой; гашение флуорофора в составе 5'-конъюгата с холестерином при их «заякорении» в мембране. Поэтому была поставлена задача изучить накопление в клетках и биологическую активность 5' холестеринных производных содержащих линкер длиной 3, 6 и 12 метиленовых звеньев, 3' производных и их флуорофор-меченых аналогов (рис. 10).

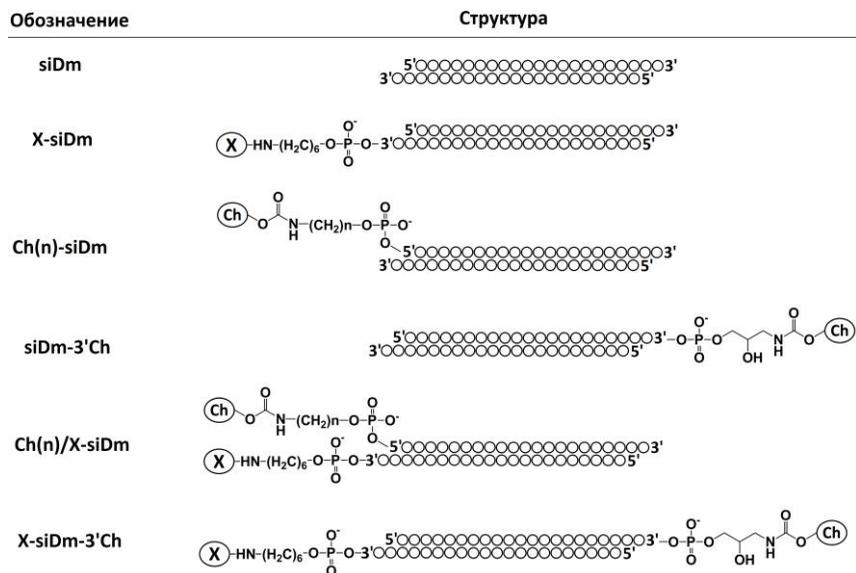
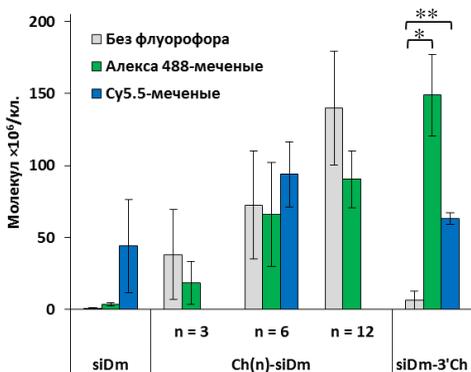


Рис. 10. Структура холестеринных производных siРНК, где (n) - число метиленовых звеньев (3, 6 или 12); Ch - холестерин; X - флуорофор (Alexa-488 или Cy5.5).



**Рис. 11.** Влияние присоединения флуорофоров Су5.5 и Алекса-488 к 5' и 3'-конъюгатам siРНК и холестерина на их накопление в клетках KB-8-5 (1 мкМ). Данные получены stem-loop ПЦР через 4 часа после добавления конъюгатов к клеткам. Статистическая значимость различий (\* $P < 0.05$ ), рассчитанная по результатам трёх независимых экспериментов приведена на рисунке.

Для исследования влияния присоединения флуорофора к конъюгатам siРНК на его накопление в клетках и оценки достоверности данных, полученных методом проточной цитофлуометрии мы использовали stem loop ПЦР, поскольку использование этого метода позволяет оценить накопление конъюгатов siРНК без использования флуоресцентной метки. Сравнение эффективности накопления 5'-холестериновых конъюгатов показало, что Ch6-siDm эффективно накапливается в клетках KB-8-5, причем уровень накопления достигает  $73 \times 10^6$  молекул на клетку (далее – мол./кл.) через 4 часа после добавления к клеткам. Присоединение относительно гидрофильного флуорофора Алекса-488 к этому конъюгату лишь незначительно влияло на накопление полученного конъюгата ( $66 \times 10^6$  мол./кл.), в то время как присоединение гидрофобного флуорофора Су5.5 несколько увеличивало уровень его накопления ( $94 \times 10^6$  мол./кл.) (рис. 11).

В отличие от 5'-холестеринового конъюгата, накопление 3'-холестеринового конъюгата (siD-3'Ch) не содержащего флуорофора в клетках было низким ( $6.3 \times 10^6$  мол./кл.); однако, присоединение флуорофоров Алекса-488 и Су5.5 к siD-3'Ch увеличило его накопление в 23 и 10 раз, соответственно ( $149$  и  $63 \times 10^6$  мол./кл. для A-siDm-3'Ch и Су5.5-siDm-3'Ch, соответственно) (рис. 11). Неконъюгированная siРНК накапливалась в клетках с низкой эффективностью ( $0.8 \times 10^6$  мол./кл.), однако присоединение флуорофоров так же оказывало существенное влияние на ее свойства: Алекса-488 увеличивала накопление siDm в 4.5 раз, тогда как Су5.5 увеличил её накопление в 55 раз. Таким образом, наличие флуорофора может влиять на проникновение холестеринного конъюгата siРНК внутрь клеток.

Присоединение флуорофора может влиять на биологическую активность холестеринных siРНК путём изменения его взаимодействия с белками РНК-интерференции, либо путем изменения его накопления в клетках-мишенях. Чтобы выяснить, влияет ли присоединение флуорофоров на взаимодействие siРНК с белками РНК-интерференции была исследована биологическая активность холестерин-содержащих siРНК и их флуорофор-меченых аналогов

при доставке Lf. Для каждого конъюгата siРНК была найдена концентрация, при которой происходит подавление гена-мишени на 50 % (IC<sub>50</sub>). Было показано, что присоединение Alexa-488 к 3'- и 5'- конъюгатам несколько снижало их биологическую активность - IC<sub>50</sub> Alexa-488-меченных конъюгатов увеличивалась в 1.2- и 1.5 раз для A-siDm-3'Ch и Ch6/A-siDm, соответственно (табл. 2). Присоединение Cy5.5 к холестеринowym конъюгатам siРНК значительно влияло на их биологическую активность: IC<sub>50</sub> были в 2.1 и 2.7 раз выше для Cy5.5-меченых 3' и 5' - холестеринowych конъюгатов, соответственно (табл. 2).

**Таблица 2.** IC<sub>50</sub> конъюгатов siРНК.

Конъюгат <sup>1</sup>	KB-8-5-MDR1-GFP		KB-8-5
	IC <sub>50</sub> (с Lf), нМ	IC <sub>50</sub> (в свободном виде), мкМ	IC <sub>50</sub> (с Lf), нМ
Ch3-siDm	31±12	5.7±0.6	-
Ch6-siDm	26±10	3.3±0.3	38±13
Ch12-siDm	33±12	27.7±2.6	-
siDm-3'Ch	16±12	>> 5	21±6
Ch6/Cy5.5-siDm	72±9	>> 5	-
Cy5.5-siDm-3'Ch	35±12	>> 5	-
Ch6/A-siDm	-	-	58±19
A-siDm-3'Ch	-	-	26±3

Оценка биологической активности холестеринowych конъюгатов siРНК при их добавлении клеткам без Lf, показала, что Ch6-siDm без флуорофора наиболее эффективно подавляет экспрессию гена-мишени. Присоединение Alexa-488 или Cy5.5 к Ch6-siDm практически полностью подавляло биологическую активность холестеринowych конъюгатов, добавляемых к клеткам без Lf (табл. 2). Присоединение Cy5.5 к неконъюгированной siDm так же не приводило к появлению биологической активности при добавлении к клеткам без трансфекционного агента. Таким образом, несмотря на то, что присоединение флуорофора увеличивает накопление в клетках холестерин-содержащей и неконъюгированной siРНК, оно не способствовало их биологической активности, а напротив, ингибировало её.

##### **5. Исследование влияния стабильности линкера в составе холестеринowych конъюгатов siРНК на их биологическую активность.**

Ранее нами было показано, что конъюгат Ch12-siDm обладает высокой эффективностью накопления в клетках (рис. 2), но низкой биологической активностью (рис. 9), поскольку, предположительно, он из-за высокой гидрофобности не эффективно выходит из эндосомного компартмента в цитоплазму. Поэтому было предложено исследовать влияние стабильности линкера в составе холестеринowych конъюгатов siРНК на их биологическую

активность. Для этого в ЛХРНК ИХБФМ СО РАН были синтезированы холестериновые производные siРНК, содержащие фосфамидную, гидразоновую и дисульфидную связи (рис. 12).

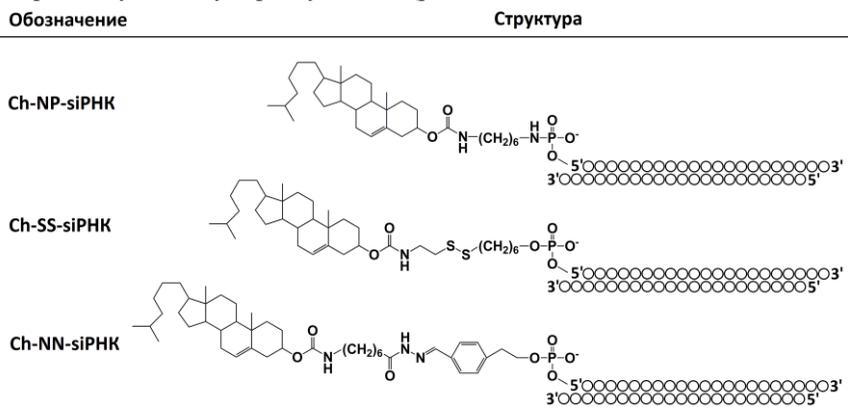


Рис. 12. Структура холестериновых производных siРНК с расщепляемыми линкерами.

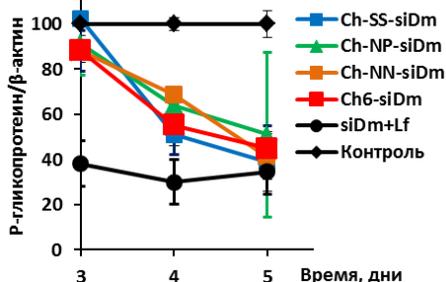


Рис. 13. Кинетика снижения уровня Р-гликопротеина в клетках KB-8-5, обработанных холестериносодержащими анти-*MDR1* siРНК (5 мкМ). Данные получены Вестерн-блотом анализом с последующим количественным анализом уровня белка. Средние значения ( $\pm$ SEM), рассчитанные по результатам трёх независимых экспериментов, приведены на рисунке.

В ходе работы было показано, что биологическая активность холестериновых конъюгатов siРНК, содержащих расщепляемые линкеры достоверно не отличалась от биологической активности холестеринового конъюгата siРНК, содержащего стабильный линкер, при доставке в клетки без носителя (рис. 13). Сочетание простоты синтеза и высокой биологической активности Ch6-siРНК по сравнению с другими исследованными липофильными конъюгатами siРНК делают эту молекулу наиболее перспективным кандидатом для её использования *in vivo*, поэтому дальнейшие эксперименты направлены на изучение терапевтического потенциала этого конъюгата.

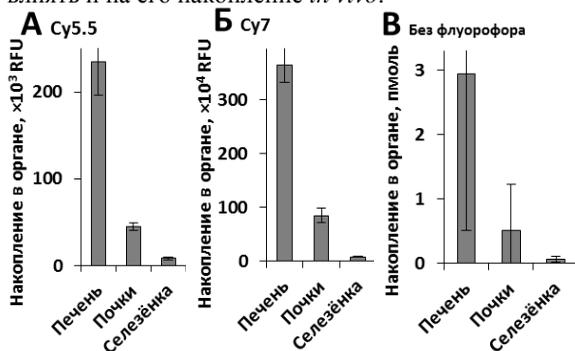
## 6. Биораспределение и биологическая активность холестеринового производного анти-*MDR1* siРНК *in vivo*.

Основными факторами, препятствующими эффективной доставке siРНК в клетки-мишени на уровне организма, являются: деградация в сыворотке,

филтрация почками, элиминация фагоцитарной системой и необходимость преодолевать эндотелиальный барьер. Конъюгирование химически модифицированной siРНК с холестерином может частично преодолеть данные ограничения, поэтому мы исследовали биораспределение и биологическую активность Ch6-siDm в здоровых мышах и в животных с привитой опухолью после внутривенной (i.v.) инъекции.

### 6.1 Исследование влияния флуорофора на биораспределение холестериновой siРНК *in vivo*.

Нами было показано (раздел 4, рис 11), что флуоресцентная метка может влиять на взаимодействие siРНК с клетками *in vitro*, поэтому можно предположить, что наличие флуорофора в составе конъюгата siРНК может влиять и на его накопление *in vivo*.



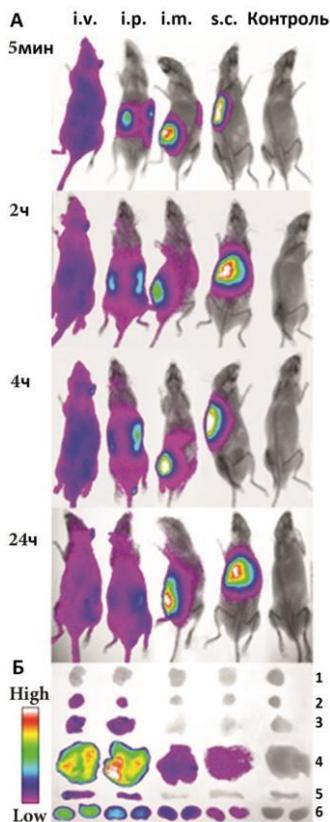
**Рис. 14.** Накопление холестеринового производного siРНК содержащего флуорофор Cy5.5 (А) или Cy7 (Б), и не содержащего (В) флуоресцентную метку в печени, почках и селезёнке мыши через 24 часа после i.v. инъекции (1.7 мкг/г).

Для этого через 24 часа после i.v. введения конъюгатов siРНК оценивали уровень их накопления методом stem-loop ПЦР, а так же по уровню флуоресценции на мультиспектральном анализаторе In-Vivo MS FX PRO Imaging System. Было показано, что соотношение концентраций siРНК в органах детектируемое обоими методами являются сопоставимыми (рис. 14). Поскольку анализ флуоресценции является более простым и удобным методом для оценки накопления в органах, в наших дальнейших экспериментах мы выбрали именно этот метод для изучения Cy5.5 или Cy7-меченого 5'-холестеринового конъюгата siРНК.

### 6.2 Изучение влияния способа введения на биораспределение холестерин-содержащей siРНК.

Для исследования влияние способа введения на характер биораспределения холестерин-содержащей siРНК мышам линии SCID вводили 1.7 мкг/г Ch6/Cy7-siDm путем i.v., внутривенной (i.p.), внутримышечной (i.m.) или подкожной (s.c.) инъекций. Оценка динамики биораспределения Ch6/Cy7-siDm в организме мыши проводилась с использованием мультиспектрального анализатора «In-Vivo MS FX PRO Imaging System». Было показано, что после i.v. инъекции холестериновый конъюгат siРНК быстро распространяется через кровоток по всему организму:

уже через 5 мин после инъекции флуоресцентный сигнал детектировался от всего тела животного (рис. 15А). В дальнейшем распределение изменялось незначительно, через 24 часа после инъекции общая интенсивность флуоресценции тела уменьшалась. Через 5 минут после i.p. инъекции



**Рис. 15.** Влияние типа введения на биораспределение Cy7-меченного

холестеринового конъюгата siРНК в мышцах линии SCID. А) Флуоресцентная визуализация мышей после i.v., i.p., i.m. и s.c. инъекции Ch6/Cy7-siDm через 5 мин, 2, 4 и 24 часа после введения (дорзальная ориентация животных). Б) Изображения органов мышей через 24 ч после введения Ch6/Cy7-siDm: 1 – мозг, 2 – сердце, 3 – легкие, 4 - печень, 5 - селезёнка, 6 – почки.

флуоресценция Ch6/Cy7-siDm наблюдалась в основном в брюшной полости животного, позже медленно распространялась по всему телу. После i.m. и s.c. инъекций Ch6/Cy7-siDm оставалась в месте введения, через 2 часа область флуоресценции немного увеличилась, однако, далее не менялась до 24 часов. Характер биораспределения Ch6/Cy7-siDm во внутренних органах после i.v. и i.p. введения был также сходным: основная часть Ch6/Cy7-siDm накапливалась в печени, некоторое количество накапливалось в почках, и только небольшая часть была обнаружена в сердце, легких и селезенке (рис 15Б). Накопление Ch6/Cy7-siDm во внутренних органах после i.m. и s.c. инъекций было очень низким; слабая флуоресценция наблюдалась только в печени и почках животных, а суммарная флуоресценция в органах после i.m. и s.c. инъекций была ниже,

чем после i.v. инъекции, в 10 и 46 раз, соответственно. Поскольку внутривенное введение Ch6/Cy7-siDm способствует её быстрому распределению по организму и значимому накоплению во внутренних органах для наших дальнейших экспериментов мы выбрали этот способ введения.

### 6.3 Изучение биораспределения холестерин-содержащей siРНК в мышцах линии SCID с ксенографтной лекарственно устойчивой опухолью человека KB-8-5.

Для изучения накопления холестерин-содержащей siРНК использовали модель ксенографтной опухоли на мышцах линии SCID, для инициации

которой им подкожно вводили  $10^6$  клеток KB-8-5. Животным со сформировавшимися опухолями ( $200 \text{ мм}^3$ ) внутривенно вводили Ch6/Cy5.5-siPHK, Cy5.5-siPHK или комплексы Lf с Cy5.5-siPHK, через 24 часа анализировали флуоресценцию внутренних органов.

	Интенсивность флуоресценции органа, $\times 10^3$ RFU					Доля флуоресценции органа относительно флуоресценции всех органов мыши, %				
	Ch6/Cy5.5-siPHK			Cy5.5-siPHK	Cy5.5-siPHK+Lf	Ch6/Cy5.5-siPHK			Cy5.5-siPHK	Cy5.5-siPHK+Lf
	0.5 ч	4 ч	24 ч	24 ч	24 ч	0.5 ч	4 ч	24 ч	24 ч	24 ч
Мозг	7±1	4.3±1.6	0	0	0	2.7±0.5	2.1±0.7	0	0	0
сердце	3.9±1	2.8±0.6	0.6±0.2	0	0	1.4±0.4	1.3±0.3	0.2±0.1	0	0
Легкие	42±8	23±6	0.4±0.3	0	0	15±3	11±3	0.1±0.1	0	0
Печень	189±27	154±20	235±54	2.1±2.1	0.4±0.02	70±10	73±9	76±17	1.6±1.6	6.7±0.4
Почки	26±4	25±4	45±6	122±19	5.6±1.3	9.7±1.5	12±2	15±2	94±14	93±21
Селезёнка	0.5±0.3	0.1±0.1	8.2±2.6	0.2±0.3	0	0.2±0.1	0.04±0.05	2.7±0.9	0.2±0.2	0
Опухоль	1.4±0.5	2±0.7	19±4	5.4±1.8	0	0.5±0.2	0.9±0.3	6.1±1.3	4.1±1.4	0
Всего	270±43	211±32	308±67	130±23	6±1.3	100	100	100	100	100

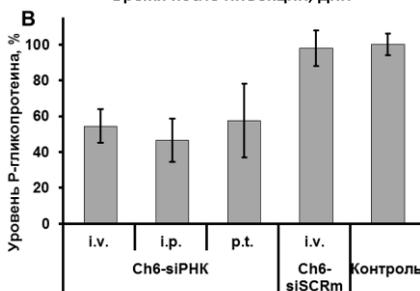
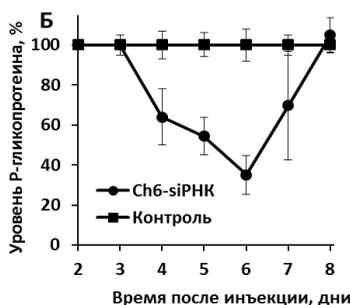
**Таблица 3.** Накопление конъюгата siPHK во внутренних органах мышей линии SCID с привитой опухолью KB-8-5 через 24 часа после i.v. введения.

Показано, что суммарное количество Ch6/Cy5.5-siDm накопленной во внутренних органах было в 2.4 раза выше, чем количество Cy5.5-siPHK и в 50 раз выше, чем количество Cy5.5-siPHK, доставленной при помощи Lf (табл. 3). При этом, несмотря на небольшой размер опухоли относительно массы мыши (~0.4 %), накопление в ней Ch6/Cy5.5-siPHK, составляло 6 % относительно суммарной флуоресценции Ch6/Cy5.5-siPHK внутренних органов (табл. 3). Накопление Cy5.5-siPHK в опухоли было в 3.5 ниже в абсолютных значениях RFU, чем Ch6/Cy5.5-siPHK. Биораспределение Cy5.5-siPHK также отличалось от Ch6/Cy5.5-siPHK: большая часть Cy5.5-siPHK накапливалась в почках (94%), только 4% в опухоли, 1.6% в печени и менее 1% в селезенке (табл. 3). При введении Cy5.5-siPHK в комплексе с Lf её накопление также наблюдалось в основном в почках (93%) и печени (6.7%), однако, флуоресценции в опухоли обнаружено не было. Таким образом, конъюгирование холестерина с siPHK позволило увеличить накопление siPHK в опухоли как в абсолютных значениях флуоресценции (RFU), так и по сравнению с общим количеством siPHK, накопленным во внутренних органах.

#### **6.4 Исследование подавления экспрессии Р-гликопротеина в опухоли холестеринным производным анти-MDR1 siPHK.**

Биологическую активность холестеринного производного siPHK, направленной на ген *MDR1* исследовали на лекарственно устойчивой ксенографтной опухоли KB-8-5 (рис. 16А). Для этого мышам линии SCID подкожно вводили клетки KB-8-5, после чего животным со

сформировавшимися опухолями делали инъекции 10 мкг/г Ch6-siРНК и через 3-8 дней Вестерн блотом оценивали уровень Р-гликопротеина в клетках опухоли. Было показано, что 40% снижение уровня Р-гликопротеина наблюдалось на 4-й день после введения siРНК; далее через 5 и 6 дней после введения уровень продолжал снижаться, достигнув минимума (40% от контроля) на 6-й день (рис. 16Б).



**Рис. 16.** Подавление экспрессии Р-гликопротеина в опухоли холестеринным конъюгатом siРНК. (А) Схема эксперимента. (Б) Кинетика подавления уровня Р-гликопротеина в ксенографтной опухоли KB-8-5 после i.v. инъекции Ch6-siРНК. (В) Уровень Р-гликопротеина в ксенографтной опухоли KB-8-5 через 5 дней после i.v., i.p., или p.t. инъекций Ch6-siРНК; пример анализа Вестерн блотом. β-Актин использовался в качестве внутреннего контроля. Стандартные отклонения ( $\pm$ SD), рассчитанные по результатам трёх независимых экспериментов приведены на графиках.

Затем наблюдалось постепенное повышение уровня Р-гликопротеина и его исходный уровень восстановился к восьмому дню. Влияние способа введения Ch6-siРНК на её биологическую

активность изучали с использованием той же опухолевой мышиной модели. Для этого делали i.v., i.p. или перитуморальную (p.t.) инъекции 10 мкг/г Ch6-siРНК или Ch-siSCRM; через 5 дней после введения siРНК оценивали уровень Р-гликопротеина в опухоли с помощью Вестерн-блота (рис. 16В). Данные показывают, что независимо от способа введения (i.v., i.p или p.t.) Ch6-siРНК эффективно снижала уровень Р-гликопротеина более чем на 50%. При этом, различия в эффективности подавления Р-гликопротеина между i.v., i.p. и p.t. способами введения не были статистически значимыми. Поэтому для введения Ch6-siРНК может быть выбран любой, наиболее удобный и наименее инвазивный метод.

## 7. Выводы

1. Получены клеточные линии K562-MDR1-GFP, KB-3-1-MDR1-GFP и KB-8-5-MDR1-GFP, являющиеся удобной модельной системой для оценки эффективности подавления экспрессии гена *MDR1* под действием siРНК, которая позволяет проводить анализ с помощью флуоцитометрии и сократить время инкубации с siРНК.

2. Исследовано влияние природы липофильной молекулы, места присоединения и длины и типа линкера в составе siРНК на её взаимодействие с клетками различного происхождения *in vitro* и *ex vivo* показано, что:

- 5'-холестериновые конъюгаты siРНК (5'Ch-siРНК) накапливаются в клетках крови человека *in vitro* и *ex vivo* более эффективно чем конъюгаты siРНК, содержащие остаток литохоловой кислоты, олеиламида литохоловой кислоты или  $\alpha$ -токоферола.

- эффективность накопления 5'Ch-siРНК зависит от длины линкера и типа клеток. Конъюгат с линкером C8 наиболее эффективно накапливается в моноцитах, макрофагах и нейтрофилах, а конъюгат с линкером C6 - в лимфоцитах.

- флуорофесцентно-меченые 3'-холестериновые конъюгаты siРНК (siРНК-3'Ch) накапливаются в клетках значительно более эффективно, чем 5'Ch-siРНК, для конъюгатов без флуоресцентной метки наблюдается обратная зависимость.

- 5'Ch-siРНК эффективно подавляют экспрессию гена-мишени в клетках KB-8-5, KB-3-1-MDR1-GFP и KB-8-5-MDR1-GFP, однако, неактивны в клетках K562-MDR1-GFP при доставке без трансфекционного агента, siРНК-3'Ch практически не обладают биологической активностью в этих же условиях. При доставке с помощью трансфекционного агента оба типа конъюгатов активны во всех исследованных клеточных линиях.

- наличие в составе холестеринных конъюгатов siРНК расщепляемых фосфамидной, гидразоновой и дисульфидной связей не влияет на их биологическую активность *in vitro*.

3. Проникновение флуоресцентно-меченого 5'Ch-siРНК в клетки KB-3-1 и K562 происходит по нескольким механизмам, вклад которых отличается в зависимости от типа клеток и наличия сыворотки. Установлено, что в среде без сыворотки основной вклад в накопление конъюгата в клетках KB-3-1 вносит макропиноцитоз и клатрин-зависимый эндоцитоз, а в клетках K562 основной вклад вносит клатрин-зависимый эндоцитоз, при этом ингибиторы разных типов эндоцитоза не снижают биологическую активность конъюгата без флуоресцентной метки.

4. Обнаружено, что присоединение флуорофора к 3'-концу антисмысловой цепи по разному влияет на накопление и биологическую активность холестеринных конъюгатов siРНК, содержащих холестерин на 5'- или 3'-смысловой цепи в клетках KB-8-5:

- присоединение флуорофора практически не снижает биологическую активность конъюгатов при доставки в клетки с помощью трансфекционного агента, и не влияет на эффективность накопления 5'Ch-siРНК, однако значительно увеличивает накопление siРНК-3'Ch при доставке в клетки без носителя.

- присоединение флуорофора блокирует проявление биологической активности конъюгатов при доставке в клетки без носителя, что указывает на их «непродуктивное» накопление.

5. Анализ биораспределения и биологической активности анти-*MDR1* siРНК и её 5'-холестеринового конъюгата в организме мыши *in vivo* показал, что:

- присоединение холестерина к siРНК увеличивает время ее циркуляции в кровотоке и способствует накоплению в макрофагах, моноцитах и нейтрофилах после внутривенного введения.

- <sup>5</sup>Сh-siРНК эффективно накапливается во внутренних органах мыши после внутривенного и интраперитонеального, но не после подкожного или внутримышечного введения. Увеличение накопления наблюдается в ряду: селезёнка, сердце, легкие < почки < печень.

- <sup>5</sup>Сh-siРНК эффективно накапливается и подавляет экспрессию гена *MDR1* в ксенографтной опухоли KB-8-5 после внутривенного, интраперитонеального или перитуморального введения.

#### **Результаты диссертации опубликованы в работах:**

1. Petrova N.S., **Chernikov I.V.**, Meshchaninova M.I., Dovydenko I.S., Venyaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Carrier-free cellular uptake and the gene-silencing activity of the lipophilic siRNAs is strongly affected by the length of the linker between siRNA and lipophilic group // *Nucleic Acids Res.* 2012 V. 40 N.5 P. 2330-2344.
2. **Черников И.В.**, Буланов Д.А., Мещанинова М.И., Черноловская Е.Л. Стабильность связи между siРНК и липофильной транспортной группой не влияет на кинетику и эффективность ингибирующего действия // *Евразийский союз ученых.* 2014. Н. 8-5 Стр. 107-109.
3. **Chernikov I.V.**, Meshchaninova M.I., Venyaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Cholesterol-conjugated siRNA accumulates in the different hematopoietic and lymphoid cells // *Journal of Hematology and Oncology Research.* 2016 V.2 N. 2 P. 13 – 19.
4. **Chernikov I.V.**, Gladkikh D.V., Meshchaninova M.I., Venyaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Cholesterol-Containing Nuclease-Resistant siRNA Accumulates in Tumors in a Carrier-free Mode and Silences *MDR1* Gene // *Molecular Therapy – Nucleic Acids.* 2017. V.6. P. 209 – 220.
5. **Chernikov I.V.**, Gladkikh D.V., Meshchaninova M.I., Karelina U.A., Ven'yaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Fluorophore labeling affects the accumulation and gene-silencing activity of cholesterol-modified siRNAs in cells // *Nucleic Acid Therapeutics.* 2019. V. 29. P. 33-43.
6. **Chernikov I.V.**, Vlassov, V.V., Chernolovskaya, E.L. Current Development of siRNA Bioconjugates: From Research to the Clinic // *Front Pharmacol.* 2019. V. 10. P. 444. doi: 10.3389/fphar.2019.00444.