

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ**

Институт химической биологии и фундаментальной медицины

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Черноловская Е. Л.

Новосибирск – 2019

Содержание

Список сокращений.....	6
Введение.....	11
1. Биоконъюгаты малых интерферирующих РНК (обзор литературы)	15
1.1 РНК-интерференция	15
1.2 Проблемы использования siРНК в биомедицине.....	19
1.3 Способы доставки siРНК	20
1.4 Химические модификаций siРНК	22
1.4.1 Модификации рибозы	23
1.4.2 Модификации фосфата	26
1.4.3 Модификации азотистых оснований	28
1.5 Паттерны химических модификаций siРНК	34
1.6 Биоконъюгаты.....	37
1.6.1 Липофильные производные siРНК	38
1.6.2 Конъюгаты siРНК и пептидов	53
1.6.3 Конъюгаты siРНК и лигандов рецепторов.....	56
1.6.4 Конъюгаты siРНК и аптамеров	57
1.6.5 Конъюгаты siРНК и антител.....	59
1.6.6 Конъюгаты siРНК и CpG олигонуклеотидов.....	61
1.6.7 Динамический поликонъюгат siРНК.....	62
1.7 Конъюгаты siРНК в клинике.....	63
1.8 Заключение	64
2. Материалы и методы.....	66
2.1 Материалы.....	66
2.1.1 Реактивы	66
2.1.2 Оборудование	66
2.1.3 Олигорибонуклеотиды и siРНК, использованные в работе	67
2.1.4 Клеточные линии.....	68
2.1.5 Лабораторные животные и опухолевые модели	69
2.2 Методы	69
2.2.1 Введение флуорофоров в siРНК.....	69
2.2.2 Формирование дуплексов siРНК.....	70
2.2.3 Электрофоретическое разделение дуплексов в ПААГ в нативных условиях	70
2.2.4 Определение температуры плавления siРНК	70

2.2.5 Выделение моноцитарно-лимфоцитарной фракции из периферической крови человека	71
2.2.6 Определение эффективности накопления холестерина производных siРНК в клетках с помощью проточной цитофлуорометрии	71
2.2.7 Определение эффективности накопления холестерина производных siРНК в присутствии ингибиторов эндоцитоза	72
2.2.8 Определение эффективности накопления холестерина производных siРНК в клетках с помощью stem loop ПЦР	72
2.2.9 Определение эффективности накопления холестерина производных siРНК в клетках крови с помощью проточной цитофлуорометрии <i>ex vivo</i>	73
2.2.10 Исследование биологической активности анти- <i>MDR1</i> siРНК методом Вестерн блот	73
2.2.10.1 Приготовление проб для исследования подавления синтеза Р-гликопротеина в клетках KB-8-5 с помощью анти- <i>MDR1</i> siРНК методом Вестерн блота.....	73
2.2.10.2 Приготовление проб для исследования подавления синтеза Р-гликопротеина в ксенографтной опухоли KB-8-5 с помощью холестерин-содержащих анти- <i>MDR1</i> siРНК методом Вестерн блота.....	74
2.2.10.3 Вестерн блот	74
2.2.11 Определение динамики изменения концентрации siРНК и её холестерин-содержащих аналогов в крови мышей после внутривенного введения.....	75
2.2.12 Конфокальная микроскопия.	75
2.2.13 Накопление siРНК и её холестерин-содержащих аналогов в костном мозге и спленocyтaх мыши.	75
2.2.14 Исследование накопления siРНК и её холестерин-содержащих аналогов в клетках крови мыши.....	76
2.2.15 Исследование биораспределения siРНК с помощью мультиспектрального анализатора «In-Vivo MS FX PRO Imaging System»	76
2.2.16 Статистический анализ данных	76
3. Результаты и обсуждение	77
3.1 Липофильные производные селективно модифицированной анти-<i>MDR1</i> siРНК D-типа.	77
3.2. Исследование влияния структуры липофильных производных siРНК на их взаимодействие с клетками различного происхождения.	78

3.2.1. Исследование влияния длины линкера в составе холестеринových производных siРНК на их взаимодействие с клетками различного происхождения.	78
3.2.1.1. Исследование влияния длины линкера в составе холестеринových производных siРНК на их накопление в клетках различного происхождения <i>in vitro</i>	79
3.2.1.2. Исследование влияния длины линкера в составе холестеринových производных siРНК на их накопление в клетках крови <i>ex vivo</i>	81
3.2.2. Исследование влияния природы липофильной молекулы в составе производных siРНК на их взаимодействие с гемопоэтическими клетками.	86
3.2.3. Исследование накопления холестеринového производного siРНК в опухолевых клетках гемопоэтического происхождения.	89
3.2.4. Исследование влияния места присоединения остатка холестерина в составе производных siРНК на их накопление в клетках различного происхождения.	91
3.3. Исследование влияния структуры конъюгатов siРНК и холестерина на их биологическую активность.	93
3.3.1. Трансдукция клеточных линий К562, KB-3-1 и KB-8-5.	93
3.3.2. Исследование влияния структуры конъюгатов siРНК и холестерина на их биологическую активность при трансфекции Липофектамином.	95
3.3.3. Исследование влияния структуры конъюгатов siРНК и холестерина на их биологическую активность без Липофектамина.	97
3.4. Исследование механизма проникновения холестеринového производного siРНК в клетки KB-3-1 и К562.	101
3.4.1. Исследование влияния ингибиторов эндоцитоза на накопление и биологическую активность холестеринového производного siРНК в клетках KB-3-1 и К562.	101
3.4.2. Исследование кинетики накопления холестеринového производного siРНК в клетках KB-3-1 и К562.	104
3.5. Исследования влияния флуорофора на взаимодействие холестеринových производных siРНК с клетками.	106
3.5.1. Исследование влияния структуры siРНК на её термостабильность.	107
3.5.2. Исследование влияния флуорофора на накопление холестеринových производных siРНК в клетках KB-8-5.	108
3.5.3. Исследование влияния флуорофора на биологическую активность холестеринových производных siРНК в клетках KB-8-5.	111

3.6. Исследование влияния стабильности линкера в составе холестеринových конъюгатов siРНК на их биологическую активность.....	115
3.7. Биораспределение и биологическая активность холестеринového производного анти-MDR1 siРНК <i>in vivo</i>.	117
3.7.1. Определение динамики изменения концентрации siРНК и её холестеринového производного в крови мышей после внутривенного введения.	118
3.7.2. Исследование накопления холестеринových производных siРНК в гемопоэтических клетках <i>in vivo</i>	119
3.7.3. Исследование влияния флуорофора на биораспределение холестериновой siРНК <i>in vivo</i>	122
3.7.4. Изучение влияния способа введения на биораспределение холестерин-содержащей siРНК.....	125
3.7.5. Изучение биораспределения холестерин-содержащей siРНК в мышах линии SCID с ксенографтной лекарственно устойчивой опухолью человека KB-8-5.....	128
3.7.6. Исследование подавления экспрессии Р-гликопротеина в опухоли холестеринovým производным анти-MDR1 siРНК.	133
Заключение.....	137
4. Выводы	140
Список литературы.....	142

Список сокращений

2'F	2'-фтор модификация
2'FANA	2'-фтор-β-D-арабинонуклеотид
2'O-Me	2'-О-метильная модификация
2'O-MOE	2'-О-метоксиэтильная модификация
4'S	4'-тио модификация
A	флуорофор AlexaFluor 488
Ago2	белок семейства Argonaute, входящий в комплекс RISC* и обладающий эндорибонуклеазной активностью
ANA	(altritol nucleic acid) алритоловая нуклеиновая кислота
<i>ApoB</i>	ген Аполипопротеина В
ASGPR	(asialoglycoprotein receptor) асиалогликопротеиновым рецептор
ASO	(antisense oligonucleotide) антисмысловый олигонуклеотид
BP	боранофосфатная модификация
CeNA	(cyclohexene nucleic acid) циклогексеновая нуклеиновая кислота
Ch	холестерин
CPP	(Cell-penetrating peptides) пептиды, способные проникать в клетку
Cy	флуорофор Cyanine5.5
Cy7	флуорофор Cyanine7
DMEDAP	диметилэтилен-диаминфосфат
DMEM	(Dulbecco's Modified Eagle Medium) ростовая среда Игла в модификации Дульбеко
dNMP	дезоксирибонуклеотид монофосфат
DsiРНК	(Dicer-substrate siРНК) малая интерферирующая РНК, являющаяся субстратом Дайсера
EPR	(enhanced permeability and retention) эффект повышенной проницаемости и удержания
F	флуоресцеин
<i>F. luciferase</i>	ген люциферазы светляков
F _{ab}	(fragment antigen binding) участок связывания антигена
FBS	эмбриональная бычья сыворотка
GalNac	(N-acetylgalactosamine) N-ацетилгалактозамин
<i>GFP</i>	(green fluorescent protein) ген зелёного флуоресцирующего белка

GNA	(glycol nucleic acid) гликолевая нуклеиновая кислота
HBsAg	(hepatitis B virus surface antigen) белок поверхностной оболочки HBV
HBV	вирус гепатита В
HNA	(hexitol nucleic acid) гекситольная нуклеиновая кислота
HEPES	4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфокислота
i.m.	внутримышечная инъекция
i.p.	интраперитонеальная инъекция
i.v.	внутривенная инъекция
IC ₅₀	концентрация siРНК, при которой происходит подавление гена-мишени на 50 %
IFR-IR	рецептор инсулиноподобного фактора роста 1
IMDM	(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), ростовая среда DMEM в модификации Искова
Lf	Липофектамин 2000
LMNA	ген Ламина А/С человека
LNA	(Locked nucleic acid) бициклическая модификация фуранозного цикла
LSM	(lymphocyte separation medium) среда для разделения лимфоцитов
MC	2'-дезоксиметанокарбануклеозид
MDR1	(multidrug resistance 1) ген множественной лекарственной устойчивости
MID	домен Ago2, ответственный за связывание «направляющей» цепи siРНК в RISC*
MLP	(melittin like peptide) мелитинподобный пептид
ONA	(oxepane nucleic acid) оксепановая нуклеиновая кислота
PASS	(Prediction of Activity Spectra for Substances) программа прогноза биологической активности
PAZ	(PIWI/Argonaute/Zwille), домен Дайсера и Ago2, обладающий специфичностью к выступающим 3'-концевым нуклеотидам siРНК
PBAVE	поли-(бутил-аминовиниловый эфир)
PBMC	(peripheral blood mononuclear cells) мононуклеарные клетки периферической крови человека
PBS	фосфатно-солевой буфер
PDGFR β	(platelet-derived growth factor receptor beta) рецептор тромбоцитарного фактора бета
PIWI	(P-element induced wimpy testis) домен Ago2, ответственный за связывание «направляющей» цепи siРНК в RISC* и расщепление мРНК-мишени

PKR	дцРНК зависимая протеин киназа R
PNA	(peptide nucleic acid) пептидная нуклеиновая кислота
PS	фосфотиатная модификация
PSMA	(prostate specific membrane antigen) простато-специфический мембранный антиген
PVDF	поливинилиденфторидная мембрана
R2D2	белок-компонент RLC у <i>Drosophila melanogaster</i> , обладающий дцРНК связывающей активностью
RFU	(relative fluorescence unit) относительная единица флуоресценции
RISC	(RNA-induced silencing complex) индуцируемый РНК подавляющий комплекс
RISC*	активированный RISC, в состав которого включена «направляющая» цепь siРНК
RLC	(RISC Loading Complex) комплекс сборки RISC
RPMI	(Roswell Park Memorial Institute medium) среда Мемориального института Розуэлла
s.c.	подкожная инъекция
s ² U	2'тиоуридин
SD	(standard deviation) стандартное отклонение
SDS	додецилсульфат натрия
SELEX	(systematic evolution of ligands by exponential enrichment) процедура поиска специфической последовательности аптамера к определённому объекту
SEM	(standard error of the mean) стандартная ошибка среднего
shРНК	(short hairpin РНК) малая шпилечная РНК
siRNN	(small interfering ribonucleic neutral) малая интерферирующая нейтральная рибонуклеиновая кислота
sisiРНК	(small internally segmented interfering РНК) сегментированная малая интерферирующая siРНК
siРНК	(small interfering РНК) малая интерферирующая РНК
SPACE	(skin penetrating and cell entering) пептид, полученный методом фагового дисплея путем отбора пептида на проникновение через эпидермис
TBE	Трис-борат-ЭДТА буфер
<i>t</i> Bu-SATE	Трет-бутил-S-ацил-2-тиоэтил фосфотриэфир
tc-DNA	трицилло-ДНК, трициклическая модификация рибозы
TGB	трис-глициновый буфер
T _{inv}	инвертированный тимидин

TLR3/7/8	(Toll-like receptor 3/7/8) Toll-подобные рецепторы 3, 7 или 8
T _m	температура плавления
TRBP	(TAR RNA binding protein) белок, связывающий транскрибируемую РНК TAR вируса ВИЧ
TRiM	(Targeted RNAi Molecule platform) платформа препаратов от компании Arrowhead Pharmaceuticals основанная на конъюгации siРНК со специфическим лигандом
TS	буфер для переноса
UNA	(Unlocked nucleic acid) «не замкнутая» модификация нуклеиновой кислоты
V	объем
Ψ	псевдоуридин
ВИЧ-1	вирус иммунодефицита человека-1
ГЭБ	гематоэнцефалический барьер
ДМСО	диметилсульфоксид
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
дцРНК	двуцепочечная РНК
ЛПВП	липопротеины высокой плотности
ЛПНП	липопротеины низкой плотности
ЛПОНП	липопротеины очень низкой плотности
МДК	монодансил кадаверин
МЛУ	множественная лекарственная устойчивость
мол./кл.	количество молекул в клетке
мРНК	матричная РНК
н.	нуклеотид
Об./мин	оборотов в минуту
ОЛЛ	острый лимфолейкоз
ОМЛ	острый миелоидный лейкоз
оцРНК	одноцепочечная РНК
п.н.	пара нуклеотидов
ПААГ	полиакриламидный гель
Рис.	рисунок
РНКi	РНК-интерференция
ТЕМЕД	N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин
ФЭУ	фотоэлектронный умножитель
ХМЛ	хронический миелоидный лейкоз

ЭДТА этилендиаминтетрауксусная кислота
PSMA (prostate specific membrane antigen) специфический мембранный антиген простаты

Введение

Открытие в 1998 г. явления РНК-интерференции способствовало развитию нового подхода к лечению заболеваний, связанных с нарушением экспрессии определенных генов [1]. При помощи РНК-интерференции можно выключить любой ген, для этого достаточно ввести в клеточную цитоплазму малые интерферирующий РНК (siРНК) - короткие двуцепочечные молекулы РНК с двумя выступающими нуклеотидами с 3' концов, являющиеся индукторами РНК-интерференции. Однако, использование siРНК в биомедицинских целях ограничено, прежде всего, проблемой их доставки в клетки-мишени: являясь полианионом, молекула siРНК не способна проникать через клеточную мембрану. Так же siРНК обладает низкой биодоступностью, что является следствием наличия факторов, препятствующих доставке siРНК на уровне организма, таких как: фильтрация siРНК почками, расщепление siРНК рибонуклеазами сыворотки, необходимость проникновения через эндотелиальный барьер [2]. Существующие системы доставки siРНК, такие, как вирусы, физические методы, катионные липиды и полимеры частично решают данные проблемы. Однако, они являются токсичными и их применение ограничено в основном экспериментальными целями [3]. Конъюгирование siРНК с молекулами, для которых существуют естественные транспортные механизмы, такие как липофильные молекулы [4-8], антитела [9-12], аптамеры [13], N-ацетилгалактозами [14,15], пептиды [16-18] или другие лиганды может решить проблему токсичности. В качестве одного из первых кандидатов для присоединения к siРНК был предложен холестерин, поскольку в организме существует система его транспорта в клетки [19], кроме того, холестерин входит в состав клеточных мембран [20]. Согласно литературным данным, ковалентное присоединение холестерина к siРНК способствует увеличению эффективности её проникновения в клетки как в отсутствие [4,6], так и в присутствии трансфекционных агентов [21], однако эффективность проникновения холестериновых производных siРНК различной структуры отличается.

Одной из важных терапевтических мишеней для siРНК является мРНК гена *MDR1*. Продукт этого гена – трансмембранный белок Р-гликопротеин, его гиперэкспрессия приводит к появлению у клеток фенотипа множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), который существенно осложняет лечение опухолевых заболеваний [22]. Р-гликопротеин осуществляет АТФ-зависимый транспорт широкого спектра препаратов из клетки, что приводит к снижению их внутриклеточной концентрации, поэтому синдром МЛУ обуславливает нечувствительность опухолевых клеток к цитостатическим препаратам, используемым в химиотерапии. Применение в клинической практике

низкомолекулярных ингибиторов синтеза Р-гликопротеина ограничено их токсичностью, поэтому использование siРНК, направленных на мРНК гена *MDR1*, является перспективным подходом к преодолению МЛУ. Возникновение МЛУ при гемобластозах является особенно актуальной проблемой из-за невозможности использования хирургических подходов для удаления данного вида опухоли. Применение современных трансфекционных агентов для доставки в клетки крови малоэффективно, поэтому оценка возможности использования биоконъюгатов для доставки siРНК в гемопоэтические клетки является актуальной. Поэтому в данной работе мы использовали мРНК гена *MDR1* в качестве мишени для липофильных аналогов и исследовали их взаимодействие с клетками карциномы и клетками крови *in vitro* и *in vivo*.

Ранее в лаборатории биохимии нуклеиновых кислот (ЛБНК) ИХБФМ СО РАН было показано, что структура конъюгата siРНК и холестерина влияет на его накопление и биологическую активность в клетках *in vitro* [23]. Поэтому целью этой 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 К562, 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 К562.
4. Исследовать влияние флуорофора на взаимодействие холестеринных производных siРНК с клетками *in vitro*.
5. Определить влияние стабильности линкера в составе холестеринных конъюгатов siРНК на их биологическую активность *in vitro*.
6. Исследовать биораспределение и биологическую активность холестеринного производного анти-*MDR1* siРНК выбранной структуры *in vivo*.

Научная новизна. 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 ксенографтной опухоли.

Теоретическая и практическая значимость работы. Создание препаратов на основе siРНК является перспективным направлением, поскольку этот подход позволяет лечить не поддающиеся стандартной терапии генетические, вирусные и опухолевые заболевания. Однако, применение siРНК в биомедицине сталкивается с рядом трудностей [2,24]. Теоретическая значимость работы состоит в том, что выявленные структурно-функциональные закономерности химически модифицированной siРНК позволили сформулировать принципы дизайна биоконъюгатов siРНК, которые позволили выбрать оптимальную холестерин-содержащую siРНК, способную эффективно подавлять экспрессию гена-мишени при внутривенном, интраперитонеальном или перитуморальном введении. 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 международных конференциях: 38-ом FEBS конгрессе (Санкт-Петербург, 2013), русско-британском семинаре «Targeting the RNA World: The Future of Nucleic Acid Therapeutics» (Санкт-Петербург, Россия, 2015) и «Targeting the RNA World: Using Chemistry to Understand RNA Biology» (Алтай, Россия, 2015), 20-том международном круглом столе «Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids» (Париж, Франция, 2016), международных конференциях «Targeting the RNA World» (Санкт-Петербург, Россия, 2016), «Expanding Frontiers of RNA Chemistry and Biology» (Новосибирск, 2016), «Targeting RNA World» (Санкт-Петербург, Россия, 2018), «The 14th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society» (Сиэтл, США, 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, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 161 странице, 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.

1. Биоконъюгаты малых интерферирующих РНК (обзор литературы)

1.1 РНК-интерференция

РНК-интерференция представляет собой механизм подавления экспрессии генов, индуцируемый двуцепочечными РНК (дцРНК) [1]. Явление РНК-интерференции было открыто в 1998 г., когда в экспериментах на *Caenorhabditis elegans* Эндрю Файер и Крейг Мелло с коллегами показали, что инъекция в организм нематоды дцРНК приводит к последовательность-специфическому подавлению экспрессии гена, гомологичного этой дцРНК [1]. Позднее РНК-интерференция была обнаружена в клетках других эукариот (грибы, растения, животные) [25]. Индукция РНК-интерференции происходит при попадании дцРНК в клетку, например при её трансфекции или инфицировании РНК-содержащими вирусами [26] или при её эндогенном образовании в клетках - в результате экспрессии транспозонов или некодирующих РНК [27]. Механизм РНК-интерференции разделяют на два этапа – на первом этапе (фаза инициации) происходит расщепление длинной дцРНК эндорибонуклеазой Дайсером на siРНК - короткие дцРНК (21-23 п.н.) с выступающими двумя нуклеотидами на 3'-концах; на втором этапе (эффекторная фаза) происходит образование мультибелкового комплекса RISC (RNA-induced silencing complex), который после активации, осуществляет узнавание и последовательность-специфическое расщепление РНК-мишени (Рис. 1). Было показано, что в большинстве случаев РНК-интерференцию в клетках млекопитающих можно индуцировать химически или ферментативно синтезированными siРНК, имитирующими продукты расщепления дцРНК Дайсером [28], в этом случае, механизм РНК-интерференции состоит только из эффекторной фазы. Рассмотрим этот процесс более подробно на примере РНК-интерференции у *Drosophila melanogaster*.

На первой стадии сборки RISC к siРНК присоединяется белок R2D2, содержащий два домена связывания дцРНК и домен связывания Дайсера. R2D2 узнает термодинамически более стабильный 5' конец дуплекса и связывается с ним, ориентируя дальнейшее присоединение Дайсера [29], дцРНК-связывающий домен которого, обладает специфичностью к выступающим 3'-концевым нуклеотидам [30]. Таким образом формируется промежуточный комплекс RLC (RISC Loading Complex).

После образования RLC, на следующей стадии сборки RISC, предположительно при участии PAZ-доменов и белков шаперонов Дайсер взаимодействует с белком Ago2 [25,31] (рис. 2). Ago2 – белок семейства Argonaute, компонент RISC, ответственный за каталитическое расщепление мРНК-мишени, состоит из четырех доменов: N-концевой, PAZ, MID и PIWI (рис. 3А) [31].

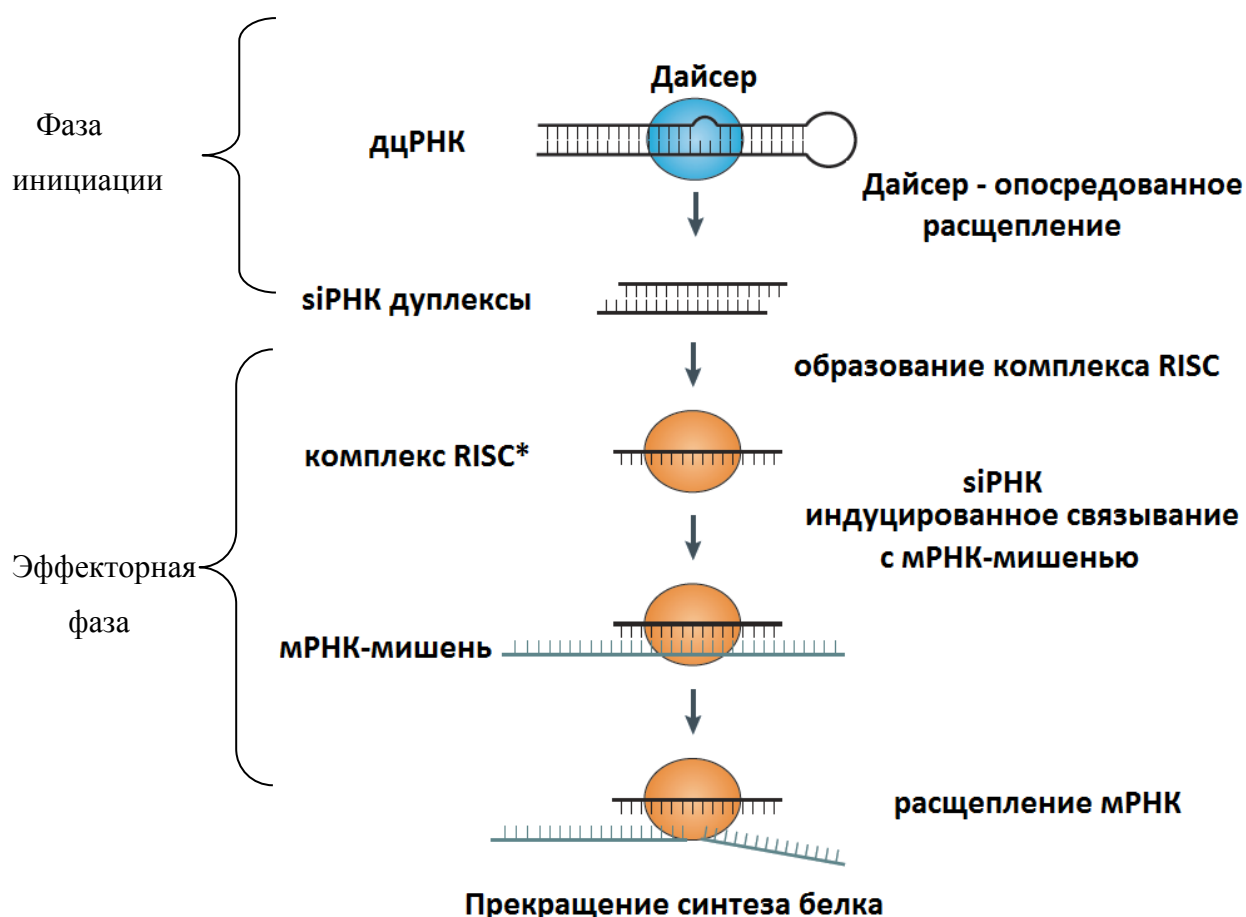


Рисунок 1. Схема РНК-интерференции [32].

Структура последнего домена определяет его эндорибонуклеазную активность, поскольку схожа со структурой РНКазы H [33]. Ago2 замещает Дайсер и R2D2 в комплексе (рис. 2) [34], при этом 5'-концевой фосфат одной из цепей siРНК со стороны Дайсера связывается с PIWI-доменом Ago2, в структуре которого присутствуют ион Mg^{2+} и остатки основных аминокислот [35,36]. Таким образом, наличие фосфата с 5'-конца одной из цепей siРНК необходимо для сборки RISC. Помимо электростатического взаимодействия между фосфатом первого нуклеотида с 5' конца цепи siРНК и ионом Mg^{2+} комплекс siРНК-Ago2 стабилизируется стэкинг взаимодействием азотистого основания этого нуклеотида с ароматическими аминокислотами, находящимися в гидрофобном кармане PIWI домена и водородными связями MID домена [37]. Ориентация водородных связей и форма гидрофобного кармана MID домена определяет то, что он связывается с аденином и урацилом, в 13 и 30 раз, соответственно, более специфично, чем с другими азотистыми основаниями [37]. Таким образом, первый нуклеотид с 5' конца находится в гидрофобном кармане на границе PIWI и MID доменов: сахарофосфатный остов и ароматическая часть азотистого основания взаимодействует с PIWI доменом, а заместители азотистого

основания взаимодействуют с MID доменом [31,38]. Другой конец цепи siРНК закрепляется в PAZ домене без участия иона Mg^{2+} , при этом два нуклеотида с 3' конца стабилизированы стэкинг взаимодействием [39], тогда как фосфатные группы центральной части цепи siРНК электростатически взаимодействуют с положительно заряженными аминокислотами PIWI домена [40,41]. На последней стадии сборки RISC Ago2 разрезает или вызывает диссоциацию одной из цепей siРНК, в результате чего образуется активированный RISC*.

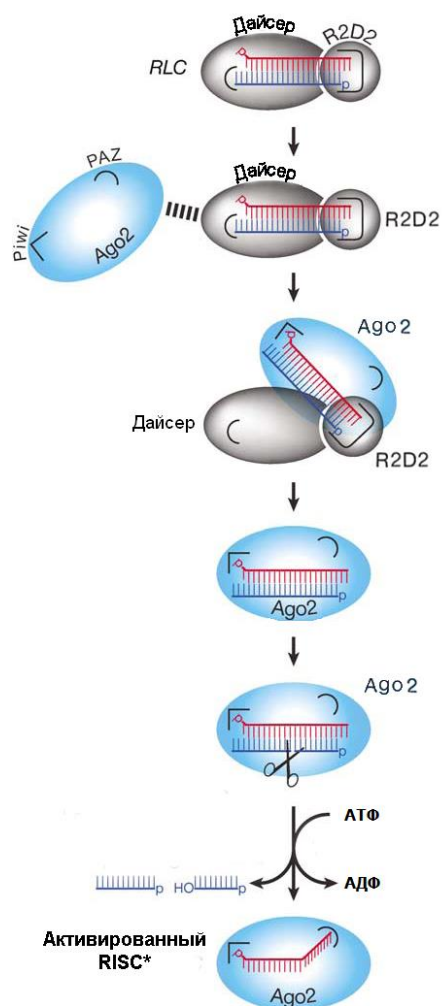


Рисунок 2. Механизм выбора «направляющей» цепи siРНК. RLC-комплекс, состоящий из Дайсера, дц-РНК-связывающего белка, R2D2 и siРНК; взаимодействие Ago2 с RLC; образование RISC* [28].

Ago2 и одна из цепей siРНК являются основными компонентами RISC* (рис. 3 Б) [28,42], однако в состав данного комплекса может входить ряд других белков [43,44]. Ago2 осуществляет разрезание как одной из цепей siРНК, так и мРНК-мишени [45], однако диссоциация цепи siРНК может осуществляться и без её расщепления. Более того, предполагается, что Ago2 человека вызывает диссоциацию цепи, в основном, по

механизму, не требующему её разрезания [46,47], поэтому общая температура плавления дуплекса может вносить вклад в эффективность интерферирующей активности siРНК. Цепь, которая расщепляется и диссоциирует из RISC называется «пассажирской», а оставшаяся в комплексе – «направляющая». Логично, что расщепление мРНК-мишени будет происходить, если в составе RISC* будет находиться комплементарная мРНК-мишени антисмысловая цепь siРНК. Выбор цепи, которая будет входить в RISC* определяется ориентацией гетеродимера Дайсер-R2D2 относительно siРНК, а поскольку R2D2 взаимодействует с термодинамически более стабильным концом дуплекса, то наиболее активными siРНК являются те, у которых 5' конец смысловой цепи более термостабильный, чем 5' конец антисмысловой цепи.

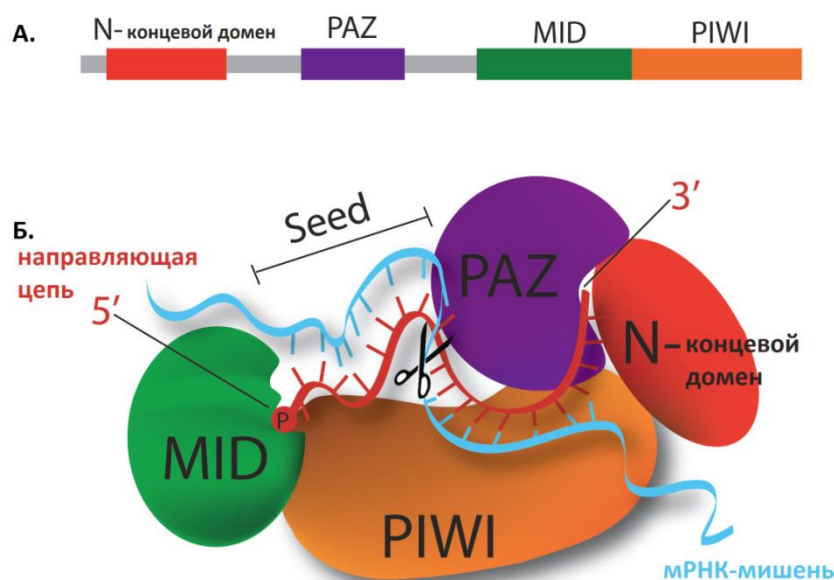


Рис. 3. Схематическое изображение первичной структуры Ago2 (А) и комплекса Ago2 с «направляющей» цепью siРНК и мРНК-мишенью (Б) (по данным [48]).

Процесс распознавания RISC* мРНК-мишени происходит в несколько этапов, при этом важную роль играет «seed» район siРНК (участок siРНК с 2 по 8 нуклеотид с 5' конца). Сначала происходит первоначальный скрининг последовательности по трем нуклеотидам (по 2-4 нуклеотидам с 5' конца цепи siРНК) [49]. После распознавания триплета пятый нуклеотид с 5' конца цепи siРНК комплементарно взаимодействует с мРНК-мишенью, что способствует конформационным изменениям, которые открывают для взаимодействия участки 6-8 и 13-16 [50]. Комплементарное взаимодействие цепи siРНК с мРНК обеспечивает выгодную конформацию для расщепления PIWI доменом мРНК между 10-11 нуклеотидами относительно 5' конца siРНК [51,52]. После разрезания и диссоциации из комплекса, РНК-мишень и «пассажирская» цепь siРНК подвергаются

деградации рибонуклеазами. Высвободившийся RISC* может участвовать в следующих циклах расщепления в каталитическом режиме [28,53]. За счет высокого сродства RISC* к одноцепочечной РНК эффективность связывания RISC* с мРНК-мишенью почти на порядок больше, чем у антисмысловых олигодезоксирибонуклеотидов (ASO) с такой же последовательностью, у которых связывание с мРНК-мишенью происходит только за счет комплементарного взаимодействия [54]. Таким образом, концентрация siРНК, при которой наблюдается эффективное снижение экспрессии гена-мишени на два-три порядка ниже по сравнению с антисмысловыми олигонуклеотидами [55,56]. Поскольку молекулы siРНК являются наиболее эффективными агентами, специфически расщепляющими мРНК-мишень, они нашли широкое применение в экспериментальной биологии и функциональной геномике [57]. Однако, использование siРНК в биомедицине ограничено проблемой её доставки в клетки-мишени [58], поэтому разработка систем доставки siРНК является актуальной задачей.

1.2 Проблемы использования siРНК в биомедицине

Основными проблемами при использовании siРНК в биомедицине являются короткое время ингибирования гена-мишени, нецелевые эффекты и её низкая биодоступность. Первая проблема является следствием биологических факторов на уровне клетки. Поскольку siРНК является полианионом, то она неспособна проникнуть непосредственно через гидрофобную клеточную мембрану и может попасть внутрь клетки только путём эндоцитоза или пиноцитоза. Однако, для того, чтобы оказать биологическое действие, поглощенная siРНК должна проникнуть через мембрану эндосомы и выйти в цитоплазму, в противном случае она подвергнется расщеплению рибонуклеазами [59], либо покинет клетку путем экзоцитоза [60]. Если siРНК проникнет в цитоплазматическое пространство, она может так же подвергаться расщеплению цитоплазматическими рибонуклеазами [61]. Все эти причины вносят вклад в то, что siРНК оказывают лишь кратковременное ингибирование гена-мишени, однако, основной вклад вносят расщепление рибонуклеазами и деление клеток-мишеней и, как следствие, «разбавление» концентрации RISC* [62].

Основным нецелевым эффектом действия siРНК является иммунный ответ на уровне клетки. При взаимодействии с поверхностью мембраны или в эндосоме siРНК может быть узнана Toll-подобными рецепторами (TLR3/7/8) [63,64], индуцирующими выработку интерферонов (α или β) и цитокинов воспаления, активирующих иммунный ответ [65]. Выйдя в цитоплазму, некоторые иммуностимулирующие мотивы siРНК могут запускать иммунный ответ через PKR (дцРНК зависимая протеин киназа R) [66] и MDA-5

белки [67], или активируя 2'-5' олигоденилатсинтетазу приводить к деградации клеточных мРНК [68].

Другими нецелевыми эффектами действия siРНК являются вытеснение эндогенных микро РНК из RISC, что может нарушать естественные пути регуляции белков в клетке и подавление экспрессии нецелевых генов путём введения в RISC смысловой цепи. Также антисмысловая цепь siРНК также может связываться с нецелевыми мРНК, не проявляя своего специфического действия. При этом, полная комплементарность антисмысловой цепи siРНК с нецелевой мРНК не является необходимой для блокирования её трансляции, поскольку этот процесс может не включать расщепление мРНК [69]. Для того, чтобы произошло блокирование трансляции нецелевой мРНК наиболее важным является её комплементарное взаимодействие только «seed» участком siРНК [70]. Таким образом, антисмысловая цепь siРНК может влиять на экспрессию большого числа генов.

Третья проблема использования siРНК в биомедицине является следствием наличия факторов, препятствующих доставке siРНК в клетки-мишени на уровне организма, таких как: фильтрация siРНК почками, захват siРНК клетками иммунной системы, расщепление siРНК рибонуклеазами сыворотки, необходимость проникновения через эндотелиальный барьер [2]. Решения, которые существуют на сегодняшний день частично преодолевают данные ограничения, однако, решение данных проблем остаётся одной из самых сложных и актуальных задач современной науки, поскольку защитные барьеры, предотвращающие проникновение чужеродных нуклеиновых кислот в клетку эволюционировали в течении нескольких миллиардов лет и работают крайне эффективно [71-73]. На сегодняшний день для решения проблемы доставки разработаны различные подходы, основная часть которых будет рассмотрена далее.

1.3 Способы доставки siРНК

Для того, чтобы доставить siРНК в клетки-мишени были разработаны различные методы, которые можно разделить по принципу их действия на биологические, физические и химические. Биологические или вирусные способы для доставки siРНК используют рекомбинантные вирусные частицы, несущие ДНК, кодирующую последовательность малой шпилечной РНК (shРНК), которая действует по механизму РНК-интерференции, как и siРНК [74]. Эти частицы проникают в клетки путём рецептор-опосредованного эндоцитоза, либо, в зависимости от типа вируса, его мембрана может сливаться с клеточной, после проникновения в ядро клетки вирусная ДНК начинает экспрессировать shРНК используя клеточную ферментативную систему. В качестве вирусных векторов используют, главным образом, аденовирусы [75], лентивирусы [76],

ретровирусы [77], аденоассоциированные вирусы [78-81] и бакуловирусы [82]. Вирусные способы эффективны для доставки siРНК в клетки, но из-за риска злокачественной трансформации клеток в результате интегрирования лентивирусов, ретровирусов и аденоассоциированного вируса в геном, их использование ограничено экспериментальными целями [77,83,84]. В свою очередь, применение аденовирусов ограничено их иммуногенностью [85,86] а использование бакуловирусов неэффективно для доставки shРНК в клетки-мишени [87].

Другой тип доставки siРНК, физический, действует по механизму, который заключается в повреждении мембраны клеток, приводящему к проникновению нуклеиновых кислот в цитоплазму или по механизму концентрирования доставляемых частиц в ткани-мишени под действием электромагнитного поля. К таким методам относится электропорация [88-91], сонопорация [92,93], магнитофекция [94,95], оптическая трансфекция [96] и инъекции под высоким давлением [97]. Несмотря на относительную эффективность физических методов при доставке siРНК в организм животных, возникающие при этом повреждения органов и тканей ограничивают их использование в терапии человека [98].

Одним из наиболее перспективных методов, на основе которых разрабатываются препараты, проходящие клинические испытания, являются химические методы: использование дендримеров [99], наночастиц [100-103], катионных [104-107], анионных [108] и нейтральных [109,110] липидов и полимеров. Принцип действия этих методов состоит в том, что они за счет электростатического взаимодействия между положительно заряженными группами в составе катионных липидов или полимеров и фосфатными группами нуклеиновых кислот образуют нековалентные комплексы с нуклеиновой кислотой, нейтрализуя её отрицательный заряд и увеличивая её гидрофобность. Такие агенты должны самопроизвольно образовывать комплексы, достаточно стабильные в биологических средах для того, чтобы доставить siРНК в клетки-мишени [111,112].

С одной стороны, положительный заряд способствует эффективности образования комплексов, с другой, он повышает их токсичность – встраиваясь в мембрану клеток, катионные липиды или полимеры меняют их свойства, а положительно заряженные наночастицы поглощаются фагоцитами [113,114]. Поэтому для маскировки положительного заряда на поверхности наночастиц было предложено использовать анионные и нейтральные липиды. При таком подходе образование частиц происходит поэтапно: ядро частиц формируется путем нейтрализации отрицательного заряда siРНК за счет электростатического взаимодействия с катионными липидами [108] или ионами кальция [115], только затем в состав частиц вводят остальные липиды, присоединение

которых происходит за счет гидрофобных взаимодействий. Интересный подход был предложен авторами работы [116], которые показали, что одноцепочечные siРНК могут взаимодействовать с гидрофобной частью нейтральных липосом. Таким образом, авторы предполагают создать менее токсичные наночастицы избежав использования катионных липидов для нейтрализации отрицательного заряда siРНК.

Однако, несмотря на маскировку положительного заряда на поверхности частиц, анионные и нейтральные липосомы при высоких дозах могут вызывать иммунный ответ и быть токсичными [117]. По этой причине были остановлены клинические испытания наночастиц с siРНК, направленной на ген *ApoB*, для лечения гиперхолестеринемии от компании Tekmira Pharmaceuticals (NCT00927459). В самых последних наночастицах этот эффект снижен, первый коммерчески доступный препарат на основе siРНК от компании Alnylam Pharmaceuticals содержит липиды, не вызывающие сильные токсические или иммуностимулирующие эффекты (NCT01960348) [118-120].

Альтернативой использованию липидов и полимеров является биоконъюгация [6,11,15,121]. С точки зрения использования комплексов siРНК с липидами или полимерами, биоконъюгаты являются идеальными наночастицами, поскольку они менее токсичны, так как им не нужен положительный заряд для формирования комплексов и они менее эффективно распознаются компонентами иммунной системы, потому что обладают достаточно малыми размерами. Этот подход обеспечивает не только эффективное, но и специфическое проникновение siРНК в различные органы и ткани, позволяя избежать токсических эффектов [24]. Однако, при использовании биоконъюгатов, siРНК остается незащищенной к действию рибонуклеаз, поэтому данный подход является эффективным только при одновременном его использовании с химическими модификациями, стабилизирующими siРНК в присутствии рибонуклеаз. Далее мы рассмотрим наиболее часто применяемые химические модификации siРНК.

1.4 Химические модификаций siРНК

Химические модификации могут оказывать влияние на свойства siРНК: её чувствительность к действию рибонуклеаз, узнавание белками системы РНК-интерференции, гидрофобность, токсичность, температуру плавления дуплекса и конформацию спирали РНК [122-124]. По типу их можно разделить на модификации рибозы, фосфатов и азотистых оснований (таблица 1), рассмотрим каждый тип модификации в отдельности.

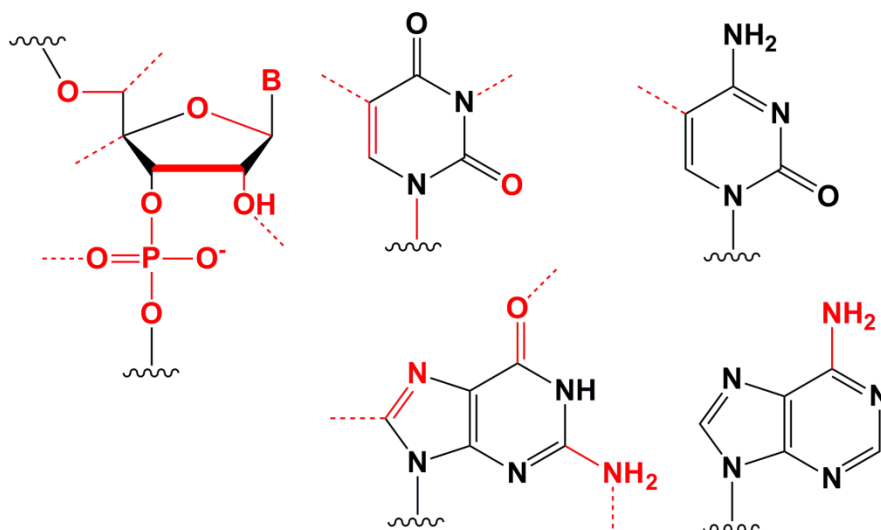


Рисунок 4. Сайты введения химических модификаций siРНК (обозначены красным цветом).

1.4.1 Модификации рибозы

Среди всех модификаций рибозы, замены в 2'-положении наиболее эффективно защищают siРНК от действия нуклеаз сыворотки, поскольку 2'ОН группа участвует в расщеплении РНК эндорибонуклеазами [125,126]. При этом, размер заместителя в 2'-положении рибозы оказывает влияние на свойства модифицированного основания. При замене водорода 2'ОН группы относительно небольшим метильным остатком (2'-О-метильная модификация (2'-О-Me) [127]) происходит стабилизация 3'эндо-конформации рибозы, которая обеспечивает А-тип спирали РНК, необходимый для протекания РНК-интерференции. Введение 2'-О-Me модификаций в состав siРНК способствует её эффективной защите как от нуклеаз *in vitro* [128] и *in vivo* [129,130]. Более того, введение этой модификаций уменьшает иммунный ответ [131]. Эти свойства делают введение 2'-О-Me модификации в siРНК одной из наиболее привлекательных стратегий для внедрения в клинику препаратов на основе siРНК [132,133]. Однако, замена каждого нуклеотида siРНК на 2'-О-метильный аналог приводит к ингибированию процесса РНК-интерференции [134], более того, введение 2'-О-Me в 50 % siРНК может приводить к ингибированию этого процесса. Видимо, наличие гидрофобного остатка в 2' положении изменяет общую структуру siРНК и повышает термостабильность дуплекса, что мешает его эффективному включению в комплекс RISC и диссоциации пассажирской цепи.

Поскольку размер модификации может быть связан с её вкладом в увеличение нуклеазоустойчивости siРНК [135], были предприняты попытки ввести более объемные заместители в 2' положение рибозы (2'-О-метоксиэтильная (2'-О-МОЕ) [136,137], 2'-О-аллильная [83], 2'-О-бензильная [138] и др. модификации), однако, они и в большей мере

могут ингибировать белки системы РНК-интерференции, чем 2'-О-Ме. Среди большого количества объемных заместителей 2' положения рибозы 2'-О-МОЕ является одной из немногих модификаций, которая стабилизирует 3'-эндо-конформацию рибозы и увеличивает температуру плавления дуплекса более эффективно, чем 2'-О-Ме [139]. Введение 2'-О-МОЕ в состав siРНК без ингибирования протекания РНК-интерференции, возможно только по концевым участкам дуплекса и центральной части антисмысловой цепи [136]. Наличие 2'-О-МОЕ в центральной части антисмысловой цепи (9 или 10 нуклеотида), как было недавно показано, даже увеличивает биологическую активность siРНК за счет уменьшения вероятности включения в RISC смысловой цепи [140], хотя прямого доказательства механизма выбора модифицированной цепи не было приведено. Видимо, наличие объемной модификации в этом положении может стерически влиять на взаимодействие с гетеродимером Дайсер-R2D2 или на формирование RISC [141].

В отличие от замены водорода в 2'-ОН группе, замена кислорода на 2'-фтор (2'F) в большей степени соответствует исходной структуре РНК, ещё более эффективно стабилизируя 3'-эндо конформацию рибозы [142]. Введение 2'F во все нуклеотиды дуплекса лишь незначительно уменьшает эффективность РНК-интерференции [143,144]. Данная модификация защищает siРНК от действия нуклеаз *in vitro* и *in vivo* [142,145], однако введение модификации в 50 % нуклеотидов siРНК приводит к появлению токсичности [146,147]. В 2016 году третья стадия клинических испытаний конъюгата siРНК и N-ацетилгалактозамина компании Alnylam, содержащего 50% 2'F, выявила его кардиотоксичность [148]. Поскольку данные эффекты не были обнаружены на предыдущих стадиях клинических испытаний [149] и ранее не была показана токсичность 2'F модифицированной siРНК для сердца, то данные результаты могут носить случайный характер и не относиться к токсичности конъюгата. С другой стороны, *in vitro* было показано, что под действием ASO, содержащего 50 % 2'F в своём составе, изменяются профили экспрессии ряда генов *in vitro* [146] и *in vivo* [150]. В подтверждение гипотезы о токсичности 2'F содержащих siРНК, в другом исследовании было показано, что введение 2'F по концам дуплекса изменяет локализацию siРНК на внутриядерную [151]. Однако, как было недавно показано, увеличение доли 2'F аналогов с 25 % до 50 % не приводило к увеличению гепатотоксичности у крыс и мышей при внутривенном введении высоких доз (100-200 мг/кг) конъюгата siРНК и N-ацетилгалактозамина течением как 2 месяцев [152], так и до двух лет [153]. Следует отметить, что 2'F имеет изомер, 2'-фтор-β-D-арабинонуклеотид (2'FANA), который, в отличие от 2'F, стабилизирует C2'-эндо конформацию рибозы, соответствующую B-типу спирали ДНК [154]. Поэтому 2'FANA в основном используют для модификации ASO [155].

Несмотря на то, что другие положения в рибозе, например 4' углерод, могут быть модифицированы (4'S [156], 4'C-аминометил-2'-О-метиловая [157] модификации, 4'C-О-метил-2'-О-метиловая [158] (таблица 1)) и такие модификации достаточно эффективно защищают siРНК от действия нуклеаз *in vitro*, они существенно ингибируют протекание РНК-интерференции, поэтому такие модификации не нашли широкого применения в биомедицинских исследованиях [159].

Модификации рибозы не ограничиваются заменами в её структуре, аналоги нуклеиновых кислот с изменённой структурой фуранозного цикла, такие как производные, содержащие 6-звенные (гекситольная (HNA) [160], циклогексеновая (CeNA) [161], алтритоловая (ANA) [162] нуклеиновые кислоты) и 7-звенные кольца (оксепановая нуклеиновая кислота (ONA) [163]), бициклические (locked nucleic acids (LNA) [164], 2'-дезоксиметанокарбануклеозиды (MC) [165]), трициклические, (трицилло-ДНК (tc-DNA) [166]) и ациклические (unlocked nucleic acids (UNA) [167,168]) производные, могут защищать siРНК от действия нуклеаз и в некоторых случаях (CeNA, LNA, UNA) не ингибировать процесс РНК-интерференции [159,169]. Из 6-звенных производных нуклеиновых кислот CeNA в наибольшей степени подходит для модификации siРНК, поскольку её комплементарное взаимодействие с РНК стабилизирует дуплекс, увеличивая температуру плавления на 1.5 °С на одно модифицированное звено и увеличивая устойчивость олигорибонуклеотида к деградации в сыворотке [170]. Бициклические производные (LNA) способны ещё более существенно повышать температуру плавления siРНК. В случае LNA сродство к комплементарной цепи увеличивается на 2-8 °С на нуклеотид за счет дополнительного цикла, находящегося между 2' и 4' углеродами, который фиксирует С3'-эндо положение рибозы [171]. Однако, введение данной модификации в siРНК очень сильно отражается на её интерферирующей активности, особенно чувствительна к модифицированию антисмысловая цепь, одна LNA модификация её первого нуклеотида с 5' конца полностью ингибирует РНК-интерференцию [172]. Наоборот, конформационно более гибкие ациклические производные, как например UNA или гликолевая нуклеиновая кислота (GNA), способны дестабилизировать дуплекс, уменьшая температуру плавления на 5-8 и 5-18 °С на нуклеотид, соответственно [173,174].

Поскольку термоасимметрия дуплекса вносит основной вклад в выбор того какая цепь (смысловая или антисмысловая) войдёт в состав RISC* и станет «направляющей» в последовательность-специфическом расщеплении мРНК-мишени (рис. 2), то модификации, стабилизирующие дуплекс, образованный 3' концом антисмысловой цепи и 5' концом смысловой цепи и, наоборот, дестабилизирующие дуплекс, образованный 3'

концом смысловой цепи и 5' концом антисмысловой цепи могут увеличивать эффективность РНК-интерференции обеспечивая благоприятную термоасимметрию дуплекса. Таким образом, введение, LNA, UNA или GNA по разным концам дуплекса может приводить к увеличению эффективности siРНК путём увеличения вероятности нахождения антисмысловой цепи в RISC* [175]. Более того, вследствие такого изменения термоасимметрии siРНК снижается вероятность включения смысловой цепи в RISC* и уменьшается вероятность подавления экспрессии нецелевых генов, имеющих районы, комплементарные смысловой цепи siРНК [176].

Поскольку антисмысловая цепь siРНК также может блокировать трансляцию нецелевых мРНК путём комплементарного взаимодействия с ними «seed» участка, то было показано, что уменьшение температуры плавления этого участка приводит к уменьшению эффективности подавления нецелевых генов [177]. Поэтому, введение UNA или GNA модификаций в «seed» участок антисмысловой цепи siРНК способствует увеличению специфичности её действия [147,178].

Интересной стратегией, увеличивающей специфичность siРНК является введение разрыва фосфодиэфирной связи в середине смысловой цепи siРНК (small internally segmented interfering РНК (sisiРНК)) [179]. Такие siРНК обладают большей специфичностью биологического действия, за счёт того, что RISC*, в состав которой входит смысловая цепь не формируется. Поскольку sisiРНК обладают меньшей стабильностью, по сравнению с siРНК такой же последовательности, то для стабилизации sisiРНК в её состав вводят LNA модификации. Однако, было показано, что такой дизайн дуплекса не способствовал значительному увеличению биологической активности siРНК *in vitro* [180] и *in vivo* [181].

1.4.2 Модификации фосфата

Поскольку фосфат напрямую задействован в механизме расщепления нуклеазами [182], то логично, что такие модификации могут эффективно защищать siРНК от расщепления. Показано, что замена кислорода фосфата на серу (фосфотиатная модификация (PS) [183,184]) или бор (боранофосфатная модификация (BP) [185]) способствует защите siРНК от действия рибонуклеаз *in vitro* и *in vivo* [6]. Введение PS модификаций в обе цепи дуплекса несколько ингибирует протекание РНК-интерференции [186]. Однако, было показано, что введение PS модификаций в олигонуклеотиды способствует их проникновению в клетки в отсутствие трансфекционных агентов за счет неспецифического связывания с рецепторами клетки и проникновения по клатрин-зависимому эндоцитозу [187]. С другой стороны, из-за неспецифического взаимодействия

фосфотиатных олигонуклеотидов с белками сыворотки и рецепторами клеток [188,189], может возникать активация системы комплемента и инфильтрация лейкоцитами соответствующих органов [190]. Поэтому для клинического применения siРНК количество PS модификаций необходимо уменьшать до 5-50 % в зависимости от предполагаемой дозы siРНК.

Фосфотиатные олигонуклеотиды имеют хиральные центры, причём изомеры (Rp и Sp) имеют различные свойства. Было показано, что для siРНК более высокая доля Rp стереоизомера в siРНК коррелирует с более высокой устойчивостью siРНК к нуклеазам сыворотки и её биологической активностью [191], поэтому для модифицирования siРНК стереоизомер Rp является более предпочтительным. Следует отметить, что для ASO изомеры по-другому влияют их нуклеазоустойчивость и биологическую активность [192]. Было показано, что, в отличие от siРНК, их нуклеазоустойчивость обеспечивается Sp изомером, а увеличение сродства к последовательности-мишени изомером Rp [193], поэтому для введения модификаций в ASO больше подходит смесь Sp и Rp изомеров [184].

В отличие от PS, введение BP в центральную часть антисмысловой цепи сильнее ингибирует действие РНК-интерференции, однако, паттерн частичной модификации (25-75 %) может увеличивать эффективность РНК-интерференции и устойчивость к рибонуклеазам [185,194]. При этом, согласно работе Холла с соавторами [194], где упоминаются неопубликованные данные сравнения PS и BP модификации siРНК, BP проявляет примерно в два раза большую эффективность в защите siРНК от нуклеаз. Если это так, то данная модификация могла бы решить часть проблем биомедицинского использования siРНК. Одно из основных ограничений при использовании BP для модифицирования siРНК - это неоптимизированный способ синтеза больших количеств BP производных siРНК, поэтому для оценки их терапевтического потенциала *in vivo* данная проблема должна быть преодолена.

Введение модификаций полностью замещающих фосфодиэфирную связь на амидную связь [195] способствует защите siРНК от действия нуклеаз [196], однако их влияние на эффективность РНК-интерференции различно. Было показано, что введение амидной связи между 10, 11 и 12 нуклеотидами, несмотря на отсутствие фосфодиэфирной связи, может увеличивать эффективность ингибирующего действия модифицированной siРНК, предположительно за счет образования дополнительных водородных связей между амидной группой и Ago2 [197].

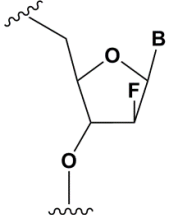
Наличие фосфата с 5' конца «направляющей» цепи siРНК необходимо для протекания РНК-интерференции [37], при этом siРНК с 5'-гидроксилем обладает

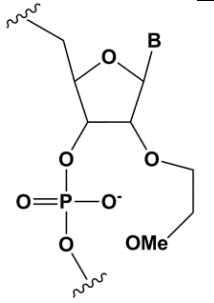
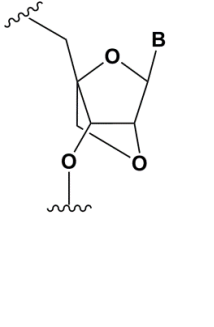
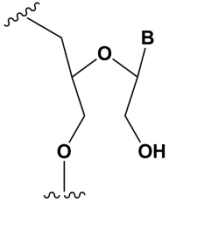
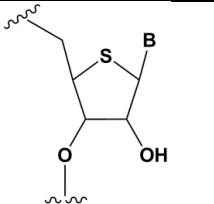
биологической активностью, поскольку такая siРНК эффективно фосфорилируется внутри клеток [198]. При блокировании фосфорилирования 5'-гидроксила siРНК не проявляет интерферирующей активности [199]. Химические модификации первого нуклеотида с 5' конца антисмысловой цепи могут препятствовать внутриклеточному фосфорилированию [138,199,200], однако, при введении химически стабильного фосфата (5'(S)-С-метил [201], 5'-метиленфосфонат [202], 5'(E)-винилфосфонат [203]) на 5' конец цепи, активность siРНК может быть восстановлена [201,202]. Наиболее успешно с этой задачей справляется 5'(E)-винилфосфонат, было показано, что модификация антисмысловой цепи не только в 2 раза улучшает связывание с Ago2 [203], но и приводит к увеличению количества и длительности нахождения конъюгатов siРНК, содержащих холестерин [204] или N-ацетилгалактозамин [203], в органах мыши после подкожной инъекции. Поэтому модификация 5'(E)-винилфосфонатом 5' конца антисмысловой цепи является перспективной стратегией для создания терапевтических препаратов на основе siРНК.

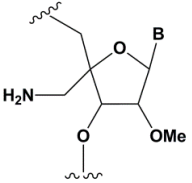
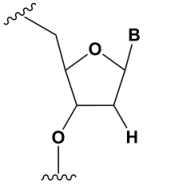
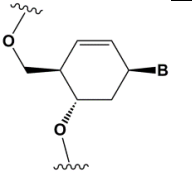
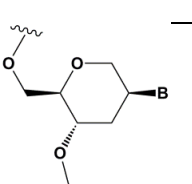
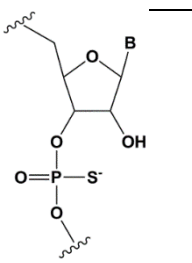
1.4.3 Модификации азотистых оснований

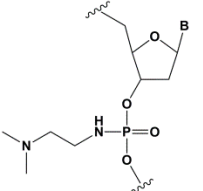
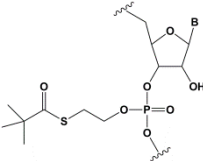
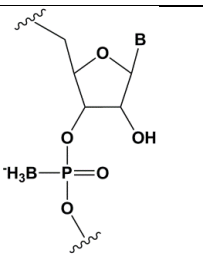
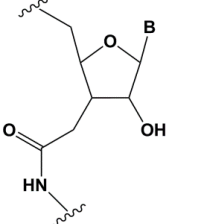
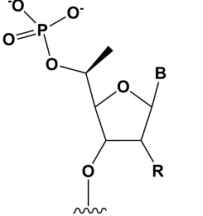
Замены азотистых оснований на различные модифицированные аналоги (псевдоуридин, 2'тиоуридин, дигидроуридин [205], 2,4-дифторбензол [206], 4-метилбензимидазол [207], гипоксантин [42], 7-деазагуанин [208], N²-алкил-8-оксогуанин [209], N²-бензил-гуанин [210], 2,6-диаминопурин [211]) предназначены для повышения термостабильности дуплекса путём увеличения эффективности образования водородных связей с комплементарным нуклеотидом. Однако, такие модификации уменьшают эффективность РНК-интерференции и не способствуют увеличению резистентности siРНК к действию нуклеаз [212]. Преимуществами модификаций азотистых оснований является то, что введенные в небольшом количестве (10 %), они уменьшают иммунные реакции и улучшают термодинамический профиль siРНК [205,213]. Наличие таких модификаций в составе комбинированных паттернов может способствовать оптимизации терапевтических свойств siРНК, однако этот подход пока не нашел широкого применения ввиду того, что аналогичные эффекты могут быть получены при помощи введения модификаций другого типа.

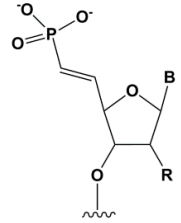
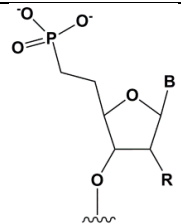
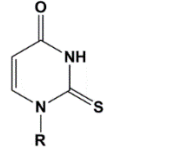
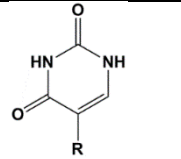
Таблица 1. Влияние химических модификаций на свойства siРНК.

Модификация	Структура	ΔT_m дууплекса на нуклеотид	Влияние на эффективность РНК- интерференции (РНКi)	Другие свойства модификации (влияние на конформацию рибозы, нуклеазоустойчивость, токсичность и др.)
Модификации рибозы				
2'-О-метил (2'-О-Me)		+ 0.5- 1.5 °C	2'-О-Me ингибируют РНКi, если 2 и более модификаций идут подряд [134,136,142,214]. Описаны siРНК, обладающие биологической активностью, содержащие 75-82 % 2'-О-Me [132,215].	Стабилизирует 3' <i>эндо</i> конформацию рибозы. $\geq 5-30\%$ 2'-О-Me повышают нуклеазоустойчивость <i>in vitro</i> [128,157] и <i>in vivo</i> [129,130]. 2'-О-Me аналоги А, G и U уменьшают иммунный ответ [131].
2'-фтор (2'F)		+ 1.5–4 °C	Замена на 2'F аналоги всех нуклеотидов лишь немного уменьшает активность РНКi [143].	Стабилизирует 3' <i>эндо</i> конформацию рибозы. $\geq 50\%$ 2'F повышают нуклеазоустойчивость <i>in vitro</i> [12] и <i>in vivo</i> [142,216] (в комбинации с PS [7]). 2'F аналоги аденина (от 7%) уменьшают иммунный ответ <i>in vitro</i> [145]. > 50% 2'F в siРНК вызывает токсичность [146,148,151].
2'-фтор- β -D-арабинонуклеотид (2'FANA)		+ 1.2 °C	100% 2'FANA в смысловой цепи понижает эффективность РНКi. 30% 2'FANA в антисмысловой цепи ингибирует РНКi [143,217].	Стабилизирует 2' <i>эндо</i> конформацию рибозы. > 50% 2'FANA повышают нуклеазоустойчивость <i>in vitro</i> [143], более эффективно, чем 2'F защищают siРНК от действия экзорибонуклеаз [154].

<p>2'O-метоксиэтил (2'O-MOE)</p>		<p>+0.9 - 1.7 °C</p>	<p>2'O-MOE по концам смысловой цепи и центральной части (6-11) антисмысловой цепи не ингибирует РНКi [136,142]. Замена 9 или 10 нуклеотида с 5' конца на 2'O-MOE аналоги нуклеотидов увеличивает вероятность включения данной цепи в RISC [140].</p>	<p>Стабилизирует 3' <i>эндо</i> конформацию рибозы. ≥ 15% 2'O-MOE по концам смысловой цепи siРНК повышает нуклеазоустойчивость <i>in vitro</i> [202].</p>
<p>LNA</p>		<p>+ 2-8 °C</p>	<p>≥ 40% LNA в смысловой цепи ингибируют РНКi на 5-20% [172]. В антисмысловой цепи от 20% LNA, либо замена первого нуклеотида с 5' конца полностью ингибируют РНКi [164,172,218,219]. LNA могут изменять термоасимметрию дуплекса, увеличивая эффективность действия siРНК [172].</p>	<p>Уменьшает конформационную гибкость нуклеотидов, фиксируя C3' <i>эндо</i> положение рибозы [171]. ≥ 10-20 % LNA в siРНК повышают нуклеазоустойчивость <i>in vitro</i> [172] и <i>in vivo</i> [181].</p>
<p>UNA</p>		<p>-5-8 °C</p>	<p>> 15 % UNA ингибируют РНКi [173]. UNA могут изменять термоасимметрию дуплекса, увеличивая эффективность действия siРНК [175,176,181].</p>	<p>Увеличивает конформационную гибкость нуклеотидов и уменьшает температуру плавления дуплекса. UNA с 3' концов дуплекса защищают siРНК от действия 3' экзорибонуклеаз <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> [173,181,220].</p>
<p>4'-тио (4'S)</p>		<p>+1 °C</p>	<p>≥ 7-15% 4'S в антисмысловой цепи ингибируют РНКi [221-223].</p>	<p>≥ 10-15% 4'S по концам одной из цепей повышают нуклеазоустойчивость <i>in vitro</i> [157,221].</p>

4'С-аминометил-2'-О-метил		-1 °С	> 2 аналогов в смысловой или > 1 аналога в антисмысловой цепях ингибируют РНКi [156].	≥ 2 аналогов по 3' концам дуплекса повышают нуклеазоустойчивость <i>in vitro</i> [156].
Дезоксирибонуклеотид (dNMP)		-0.5 °С	> 50 % dNMP ингибируют РНКi [224-226]. dNMP могут изменять термодинамические параметры siРНК, увеличивая эффективность её действия <i>in vitro</i> [224].	Защищают от экзорибонуклеаз [226].
Циклогексеновая нуклеиновая кислота (CeNA)		+ 1.5 °С	5% CeNA в siРНК не ингибирует РНКi [161,169]. CeNA могут изменять термоасимметрию, увеличивая биологическую активность siРНК <i>in vitro</i> [160,169].	Стабилизирует 3' <i>эндо</i> конформацию рибозы [227]. ≥ 25% CeNA аналогов увеличивают нуклеазоустойчивость в сыворотке [170].
Гекситольная нуклеиновая кислота (HNA)		+ 0.85 °С	15% HNA в siРНК не ингибирует РНКi [160]. HNA могут изменять термоасимметрию, увеличивая биологическую активность siРНК <i>in vitro</i> [169].	Незначительно увеличивает устойчивость siРНК к действию нуклеаз в сыворотке [160].
Модификации фосфатов				
Фосфотиат (PS)		- 0.7 °С	PS ингибируют РНКi только при введении в центральную часть антисмысловой цепи [83,136,184,186,228].	PS защищают siРНК от действия экзорибонуклеаз <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> [6]. > 50 % PS вызывают токсичность <i>in vitro</i> [228] и <i>in vivo</i> [190,229].

Диметилэтиленидиаминфосфат (DMEDAP)		-0.7-3.4°C (показано только для тимидина)	10% DMEDAP в смысловой цепи не ингибируют РНКi [230].	Влияние на нуклеазоустойчивость siРНК не показано.
Трет-бутил-S-ацил-2-тиоэтил фосфотриэфир (tBu-SATE)		Н.д.	25% tBu-SATE не влияют на РНКi [231].	≥ 20-40 % tBu-SATE в siРНК повышает нуклеазоустойчивость <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> [231]. Увеличивает гидрофобность siРНК. Расщепляется тиюэстеразами в цитоплазме клетки до фосфодиэфирной связи [231].
Боранофосфат (BP)		+0.4-1 °C (до 50%) -0.8-2.5°C (более 50% siРНК)	> 50% РВ ингибируют РНКi, наиболее чувствительна к модификациям центральная часть антисмысловой цепи [194].	Примерно в 2 раза более эффективно защищают от рибонуклеаз, чем PS, но не вызывают токсичность <i>in vitro</i> [185,194].
Амидный линкер		-0.3- +0.9°C	В некоторых сайтах siРНК одна замена на амидный линкер не ингибирует РНКi [197].	Введение двух амидных линкеров с 3' концов дуплекса повышает нуклеазоустойчивость siРНК в сыворотке [195,196].
Модификации концевых фосфатов				
5'С-метил (S-изомер)		-3.2 °C	Один 5'С-метил с 5' конца антисмысловой цепи не влияет на РНКi [201].	5'С-метил защищают siРНК от экзонуклеаз в 2 раза эффективнее, чем PS [232].

5' (E)-винилфосфонат		Н.д.	5' (E)-винилфосфонат улучшает эффективность взаимодействия siРНК с Ago2 (в 2 раза) [203].	Стабилизирует 5' фосфат, защищая его от действия фосфатаз и экзонуклеаз. Не влияет на биологическую активность <i>in vitro</i> [204]. Улучшает фармакокинетические показатели конъюгатов siРНК, содержащих данную модификацию [203,204].
5' метиленфосфонат		Н.д.	5' метиленфосфонат с 5' конца антисмысловой цепи уменьшает биологическую активность siРНК примерно в 10 раз [201,202].	Нет данных.
Модификации азотистых оснований				
2' тиюридин (s ² U)		0-2 °С	7% s ² U не влияет на РНКi [205]. Могут изменять термоасимметрию дуплекса, увеличивая эффективность действия siРНК [205,212].	s ² U незначительно повышает нуклеазоустойчивость <i>in vitro</i> .
Псевдоуридин (Ψ)		-1- +1 °С	Одна замена на Ψ не влияет на РНКi [205].	Уменьшает РKR-индуцированный интерфероновый ответ [213].

1.5 Паттерны химических модификаций siРНК

Деградация siРНК *in vivo* происходит за счет её расщепления эндонуклеазами по пиримидинам [233] и экзонуклеазами, как с 3', так и 5' концов [234,235], поэтому для повышения нуклеазоустойчивости siРНК и проявления биологического эффекта биоконъюгатов *in vivo* необходимо, чтобы siРНК содержала химические модификации в сайтах расщепления. Однако, введение многих химических модификаций в siРНК ограничивается ингибированием её интерферирующей активности и токсичностью, поэтому, введение модификаций в siРНК определяется балансом между количеством модификаций, достаточным для того, чтобы siРНК была нетоксична, сохраняла интерферирующую активность и степенью нуклеазоустойчивости. Для 2'-О-Ме модификации было показано, что введение её в состав siРНК может приводить к ингибированию РНК-интерференции, если siРНК содержит более двух 2'-О-Ме модификаций подряд [134,142], при этом, 2'-О-Ме модификации каждого второго нуклеотида не блокируют протекание РНК-интерференции [134]. Таким образом, важным параметром, влияющим на процесс РНК-интерференции, является не только то, какие введены модификации, но и их расположение в дуплексе.

Одним из подходов, позволяющих найти баланс между сохранением интерферирующей активности и нуклеазоустойчивостью siРНК для 2'-О-Ме является метод селективной модификации 2'-О-Ме нуклеазочувствительных сайтов siРНК [128]. siРНК подвергается расщеплению в сыворотке по пиримидинам [233], однако замена всех пиримидинов на 2'-О-Ме аналоги полностью ингибирует интерферирующую способность siРНК [142]. Было показано, что основными сайтами расщепления siРНК в сыворотке, являются не все пиримидины, а примерно 40 % от них, в зависимости от последовательности (CA, UA и UG сайты). Введение 2'-О-Ме по этим сайтам сохраняет интерферирующую активность siРНК, увеличивает нуклеазоустойчивость в сыворотке [128] и обеспечивает длительное подавление экспрессии гена-мишени [236].

Для введения 2'-F модификаций в siРНК основным ограничением является ассоциированная с ними токсичность, несмотря на то, что конъюгаты siРНК, содержащие 2'-F модификации по пиримидинам защищены от действия рибонуклеаз и, в отличие от 2'-О-Ме [142], обладают биологической активностью [7]. Введение PS в siРНК так же ограничено токсичностью получаемых олигонуклеотидов, а поскольку была показана высокая эффективность защиты siРНК PS модификациями против действия экзорибонуклеаз [184,232], их используют только для замены двух или трёх концевых нуклеотидов siРНК [6]. Большинство других химических модификации siРНК по

различным причинам (влияние на белки РНК-интерференции, термоасимметрия, защита от нуклеаз и др.) вводят преимущественно по концевым участкам дуплекса [159]. Важно, что модификации, предназначенные для изменения различных свойств siРНК, значимых для её терапевтического потенциала, могут быть использованы вместе, дополняя друг друга и обеспечивая устойчивость siРНК к нуклеазам и биологическую активность выше, чем каждая модификация по отдельности [143]. Большинство последних исследований используют паттерны, содержащие комбинации химических модификаций, для достижения максимального эффекта *in vivo*, поэтому далее мы рассмотрим наиболее эффективные из них.

Поскольку при замене каждого второго нуклеотида на 2'-О-Ме аналог половина siРНК остаётся незащищенной к действию нуклеаз, было предложено ввести 2'F модификации в немодифицированную часть дуплекса. Было показано, что такая siРНК с паттерном модификаций siРНК, состоящим из чередующихся через один 2'-О-Ме и 2'F модификациями, стабильна в плазме крови мыши и подавляет экспрессию гена-мишени на несколько порядков эффективнее по сравнению с немодифицированной siРНК [200]. Успешное использование полностью модифицированных паттернов на основе чередующихся 2'-О-Ме и 2'F было показано при изучении свойств одноцепочечных siРНК (оцРНК). оцРНК с таким паттерном модификаций, дополнительно содержащим несколько PS, 2'-О-МОЕ модификаций и 5'(E)-винилфосфонат обладала биологической активностью *in vitro* и *in vivo* [201,202], а моделирование её комплекса с Ago2 показало, что исследуемые модификации стерически не блокируют взаимодействие такой оцРНК с Ago2 [237].

Несмотря на то, что наибольший вклад в деградацию siРНК вносит расщепление дуплекса в сыворотке по нуклеазочувствительным сайтам, расщепление siРНК может происходить и по другим местам дуплекса. Было проведено сравнение паттерна, содержащего чередующиеся 2'-О-Ме и 2'F модификации (полностью модифицированная siРНК) с паттерном siРНК, состоящим из комбинации 2'-О-Ме и 2'F, расположенных по пиримидинам и концам дуплекса (частично модифицированная siРНК), оба паттерна содержали PS модификации на выступающих с 3'-концов нуклеотидах [238]. Полностью модифицированная siРНК в составе холестерина конъюгата более эффективно снижала экспрессию гена *Htt* в клетках HeLa по сравнению с частично модифицированной siРНК - концентрация siРНК, при которой происходило подавление экспрессии гена-мишени на 50 % составляла 70 и 170 нмоль/л, соответственно [238].

В отличие от расщепления siРНК в сыворотке, в лизосомальном экстракте гепатоцитов деградация siРНК происходит в основном за счет 5'-экзонуклеаз, поэтому

дополнительная стабилизация PS модификациями 5' концов siРНК в составе конъюгата N-ацетилгалактозамина приводила к увеличению длительности и эффективности его ингибирующего эффекта [239]. Было показано, что подкожное введение приматам 10 мг/кг конъюгата, содержащего полностью модифицированную по 2' положениям рибозы siРНК и N-ацетилгалактозамин, вызывало снижение экспрессии гена-мишени на уровне белка на 30 % в течении 10 дней, тогда как введение конъюгата с дополнительно модифицированными 5' концами снижало уровень белка на 80 % в течении 40 дней.

Полностью модифицированная по 2' положениям рибозы, дополнительно стабилизированная PS модификациями как с 3'-, так и с 5'-концов siРНК была исследована в составе конъюгатов с холестерином и докозагексаеновой кислотой [238]. Было изучено накопление конъюгатов в печени, почках и селезёнке через 24 часа после внутривенной и подкожной инъекций. Накопление для всех конъюгатов с полностью модифицированной по 2' положениям рибозой и PS модификациями с 3' и 5' концов siРНК было на два порядка больше по сравнению с накоплением конъюгатов содержащих частично модифицированную siРНК (2'О-Ме и 2'F модификации, расположенные по пиримидинам и концам дуплекса и PS модификации на выступающих с 3'-концов нуклеотидах). К сожалению, контрольного эксперимента для определения вклада введения PS модификаций с 5' концов в стабильность конъюгатов siРНК в данном исследовании проведено не было.

Поскольку вклад в увеличение нуклеазоустойчивости siРНК 2'О-Ме модификации по сравнению с 2'F модификацией больше [135,240], были предприняты попытки изменения паттерна модификаций siРНК, содержащего 50% 2'О-Ме и 50% 2'F модификаций в сторону увеличения доли 2'О-Ме модификаций [133,215]. Для этого было синтезировано 1890 различных siРНК, направленных на 5 различных генов, отличающихся последовательностями (15 вариантов) и паттернами 2'О-Ме и 2'F модификаций [215]. По результатам *in vitro* анализа на первичных гепатоцитах мыши было определено оптимальное введение 2'О-Ме или 2'F модификаций для каждого положения в siРНК. Затем было выбрано два паттерна модификаций, содержащие 23% и 18% 2'F модификаций, биологическая активность которых была не меньше, чем у исходной siРНК. При анализе биологической активности *in vivo* на трех разных последовательностях siРНК, паттерн модификаций с меньшим содержанием 2'F модификаций (18%) оказался наиболее эффективным. Подкожное введение приматам 1 мг/кг конъюгата siРНК и N-ацетилгалактозамина показало, в отличие от исходной siРНК, подавляющей экспрессию гена-мишени AT на ~40% в течении 40 дней, новая отобранная siРНК (18% 2'F модификаций) снижала уровень белка на ~70% в течении 70 дней. Было

показано, что конъюгат полностью модифицированной, содержащей большое количество 2'-О-Ме модификаций (73%) siРНК и N-ацетилгалактозамина, подавлял экспрессию гена *PCSK9* в печени пациентов после однократного подкожного введения ~6 мг/кг на ~70 % в течении 6 месяцев [132].

Поскольку при доставке siРНК в составе биоконъюгатов она особенно чувствительна к действию нуклеаз, продолжительность биологического действия *in vivo*, доза и частота введения препарата зависит от нуклеазоустойчивости, поэтому при создании терапевтических препаратов на основе биоконъюгатов siРНК именно этому параметру важно уделять особое внимание.

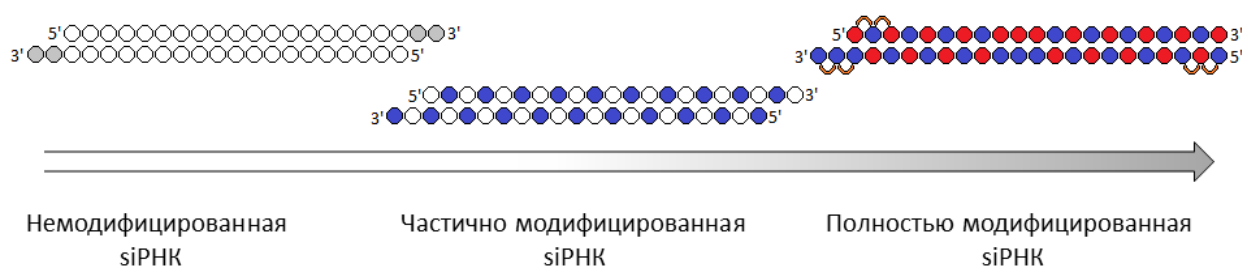


Рисунок 5. Эволюция паттернов химических модификаций siРНК, химические модификации обозначены серым (дезоксирибонуклеотиды), синим (2'-О-Ме), красным (2'-F), и оранжевым (PS) цветами (адаптировано из [121]).

1.6 Биоконъюгаты

Идея использования биоконъюгации как способа доставки siРНК в клетки заключается в формировании конъюгатов siРНК с биомолекулами, способными специфически связываться с рецепторами на клеточной мембране (фолат [14], антитела [9-11], аптамеры [28,241], некоторые пептиды [16,242], углеводы [15]), молекулами, транспорт которых осуществляется самим организмом (холестерин [4], витамины [5]) или молекулами, способными неспецифически взаимодействовать с мембраной клетки (положительный электростатический заряд, гидрофобность [243]) (рис. 6) (Таблица 2) [244]. Кроме природы биогенной молекулы, на эффективность накопления и биологическую активность малых интерферирующих РНК оказывает влияние структура линкера, связывающего siРНК и биомолекулу. В частности, способность линкера расщепляться при попадании конъюгата в клетки позволяет избежать снижения эффективности РНК-интерференции, связанного с ингибированием сборки комплекса RISC. В качестве расщепляющихся связей, в составе линкеров используют дисульфидную [245] и тиоэфирную [231] связи, рН чувствительные связи (гидразоновая [246], карбоксидиметилмалеиновый ангидрид [247] и др.) или фоточувствительные связи (β -[Бис (4-метоксифенил)-фенилметокси]-2-нитробензолэтаноловый линкер [248]). Тем не менее,

в экспериментальной практике широко используют конъюгаты, содержащие линкеры, стабильные в условиях эксперимента [4], в этом случае ключевую роль играет строение конъюгата. Рассмотрим наиболее часто используемые типы биоконъюгатов (рис. 6).

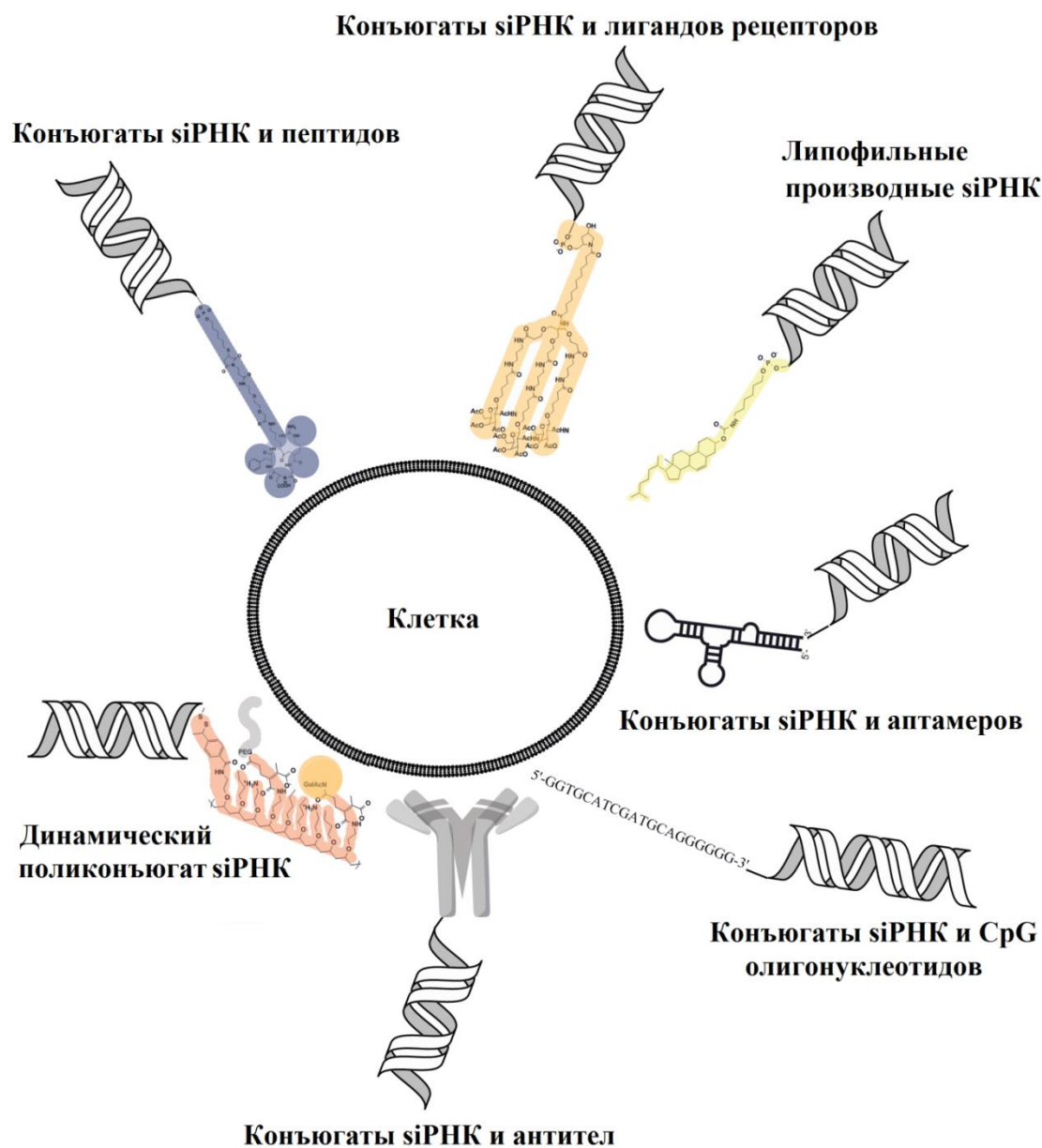


Рис. 6. Схема биоконъюгатов siRNA.

1.6.1 Липофильные производные siRNA

Одними из первых лигандов для конъюгирования с siRNA были предложены липиды и холестерин, поскольку предполагалось, что они будут обеспечивать взаимодействие siRNA с мембраной клетки из-за своих липофильных свойств и поскольку в организме существуют системы их транспорта [249]. Так, холестерин не только входит в состав мембран, но и транспортируется в клетки липопротеинами низкой плотности

(ЛПНП-частицы) и липопротеинами высокой плотности (ЛПВП-частицы) [19], которые связываются с соответствующими рецепторами. Оба типа липопротеинов образованы триглицеридами и аполипопротеинами, однако в составе ЛПНП-частиц доля белков (25 %) меньше, чем в ЛПВП-частицах (55 %) [250]. При этом, в ЛПНП-частицах основным белком является Аполипопротеин В [251], а в ЛПВП-частицах разнообразие белков намного больше (всего более 80 видов [252], основными являются ApoA-I [253] и ApoA-II [254]). Поглощение всех липопротеинов клетками осуществляется через распознавание белковых компонентов частиц по механизму клатрин-зависимого рецептор-опосредованного эндоцитоза, при помощи ЛПНП и SR-BI (Scavenger receptor class B member 1) рецепторов ЛПНП и ЛПВП-частиц, соответственно [255-257].

Было показано, что производные siРНК и холестерина, а также другие липофильные производные siРНК способны при определённых условиях образовывать комплексы с ЛПВП- и ЛПНП-частицами, которые, в свою очередь, могут связываться с соответствующими рецепторами [7]. Было также показано, что гидрофобность липофильной молекулы определяет эффективность связывания липофильного конъюгата с липопротеинами [7]. Так, остаток холестерина, введенный в состав siРНК, обеспечивал наиболее эффективное связывание с ЛПНП- и ЛПВП-частицами и, как следствие, более высокую активность по сравнению с другими липофильными производными. Однако, предположение о проникновении липофильных производных siРНК в составе таких комплексов в клетки по механизму рецептор-опосредованного эндоцитоза подтвердить не удалось [7]. Было показано, что в проникновении липофильных производных siРНК в составе липопротеинов участвует трансмембранный белок SIDT1 [7]. Известно, что SIDT1 облегчает проникновение дцРНК в клетки, либо формируя каналы для диффузии, либо способствуя проникновению дцРНК опосредованно, через взаимодействие с другими белками [7,258]. С другой стороны, было показано, что SIDT1 имеет домен связывания со стероидными молекулами и его локализация в клетке зависит от наличия или отсутствия холестерина в мембране [259]. Для гомолога SIDT1, SIDT2 - также было показано участие в клеточном транспорте как холестерина [259], так и дцРНК без липида [260,261]. Тем не менее, конкретная роль SIDT1 в механизме проникновения комплексов липофильных производных siРНК с липопротеинами не была установлена.

Проникновение холестеринowych производных siРНК в свободном виде было изучено на клетках HeLa [262]. Для этого в клетках подавляли экспрессию значимых для эндоцитоза генов (*DNM1L*, *CLTC*, *CAV1*, *CDC42* и *RAC1*), после чего оценивали накопление флуоресцентно меченого холестеринowego конъюгата. Было показано, что эффективность накопления холестеринowego конъюгата была меньше (на ~40%) по

сравнению с накоплением в необработанных клетках только в случае клеток, в которых ингибированию были подвергнуты гены *DNM1L* и *CLTC*, продукты которых участвуют в клатрин-зависимом эндоцитозе.

В другой работе [263] клатрин-зависимый внутриклеточный транспорт холестеринových конъюгатов исследовали, определяя колокализацию флуоресцентно-меченых белков эндосом и флуоресцентно-меченых лигандов клатрин-зависимого эндоцитоза с флуоресцентно-меченым холестеринovým конъюгатом. В данной работе было показано, что клатрин-зависимый эндоцитоз составляет 25% от общего внутриклеточного транспорта холестеринového производного siРНК в клетке. Следует отметить, что для эндоцитоза характерно наличие механизма сортировки поглощенного эндосомального содержимого по пути рециркуляции или деградации [264]. В зависимости от типа рецептора и содержимого эндосомы сортировка может происходить на разных этапах эндоцитоза (рис. 7), было показано, что сортировка и рециркуляция ЛПНП-рецептора в среднем занимает ~6 минут [265]. При изучении кинетики накопления холестеринových производных siРНК было показано, что в первые 60 минут после добавления холестеринových производных siРНК к клеткам HeLa только 5 % конъюгата подвергалось рециркуляции, остальные 20 % конъюгата сортировались по пути деградации веществ в клетке [263]. Таким образом, можно предположить, что при системном введении холестеринového конъюгата основным путём транспорта является взаимодействие с липопroteинами и проникновение путём рецептор-опосредованного эндоцитоза в клетки, экспрессирующих соответствующий рецептор (ЛПНП- или SR-BI рецептор). Затем, вероятно, на некотором этапе внутриклеточного транспорта происходит диссоциация липопroteинов и холестеринového конъюгата siРНК и siРНК проникает в цитоплазму, где участвует в РНК-интерференции. Действительно, во многих работах было показано, что присоединение холестерина к 3' и 5' концам смысловой цепи и 3' концу антисмысловой цепи обеспечивает проявление биологической активности siРНК при доставке без носителя как *in vitro* [4,16,266,267], так и *in vivo* [6,7,204,268-270]. При этом на большинстве клеточных линий холестеринový конъюгат siРНК демонстрирует более высокую биологическую активность по сравнению с другими липофильными производными siРНК, содержащими производные литохолоевой кислоты, насыщенные жирные кислоты (C12 - C22) [7,201], ненасыщенные жирные кислоты [271,272] или токоферол [5].

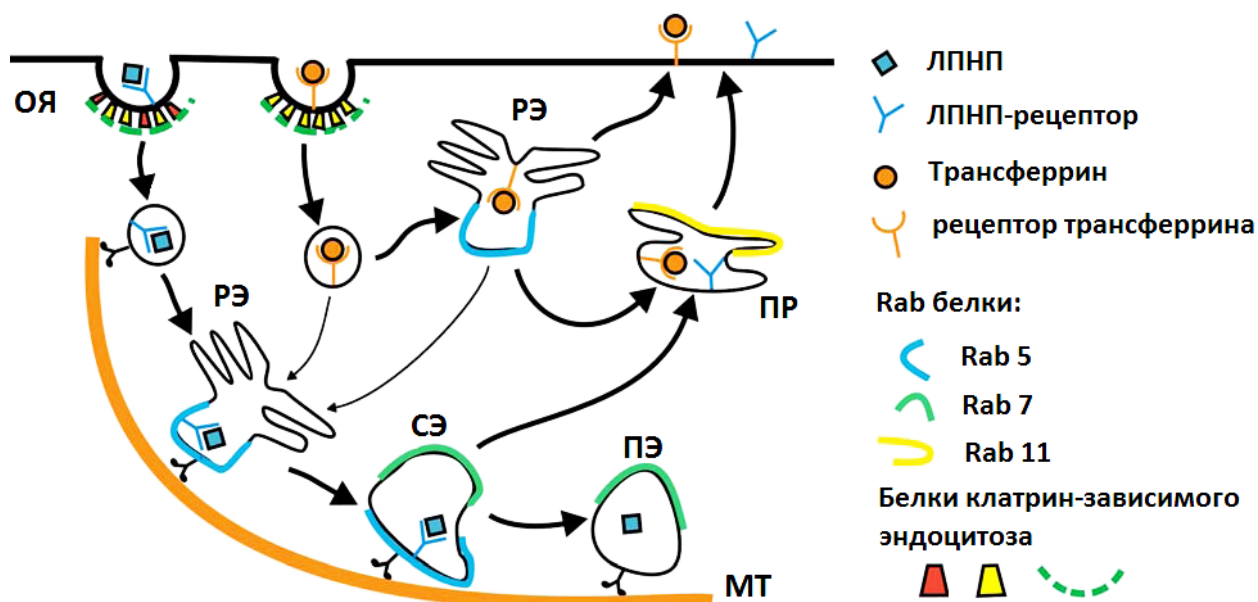


Рис. 7. Модель сортировки молекул, попавших в клетки путём рецептор-опосредованного эндоцитоза: ОЯ – окаймленная ямка, РЭ – ранняя эндосома, СЭ – созревающая эндосома, ПЭ – поздняя эндосома, ПР – пузырек рециклирования, МТ - микротрубочки (адаптировано из [264]).

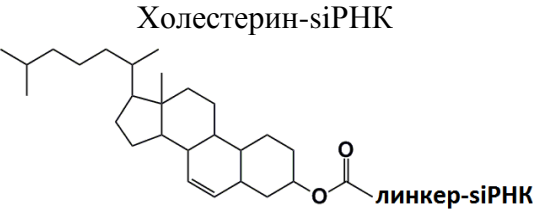

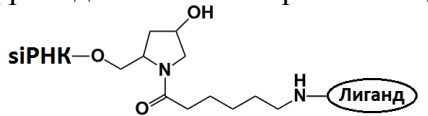


Биораспределение различных липофильных конъюгатов siРНК было подробно исследовано в недавней работе [273]. Было показано, что холестериновые конъюгаты более эффективно задерживаются в организме (62%), чем другие липофильные конъюгаты (27-62%) и после подкожной инъекции накапливаются практически во всех органах: в печени, почках, надпочечниках, селезёнке, поджелудочной железе, в сердце, мышцах, жире, тимусе, лёгких, месте введения, яичниках и семенниках. При этом, наиболее эффективно холестериновые конъюгаты накапливаются в печени, надпочечниках, селезёнке и в коже в месте введения [273]. В остальных органах холестериновые производные накапливаются с такой же или меньшей эффективностью, чем другие липофильные конъюгаты – например, было показано, что конъюгат siРНК и насыщенной жирной кислоты (докозановая, С21) эффективнее, чем холестериновый конъюгат накапливается и подавляет экспрессию гена-мишени (*Htt* или *Ppib*) в мышцах (20% и 30%, *Htt* и *Ppib*, соответственно) и жире (50% и 30%, *Htt* и *Ppib*, соответственно) после подкожной инъекции (20 мг/кг) [273]. В данной работе было показано, что основным фактором, определяющим характер биораспределения конъюгатов является их липофильность. Конъюгаты siРНК, обладающие меньшей липофильностью - производные ретиноевой кислоты, литохолоевой кислоты, докозагексановой кислоты с большей эффективностью, чем холестериновый конъюгат накапливались в почках, мочевом пузыре и легких мыши после подкожной инъекции [273]. Данный факт согласуется с данными,

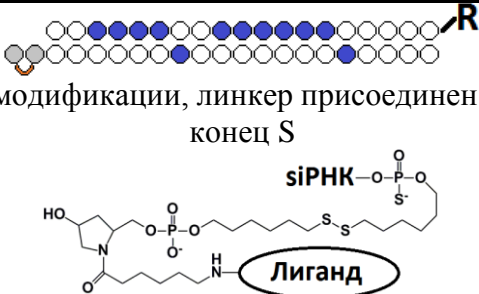
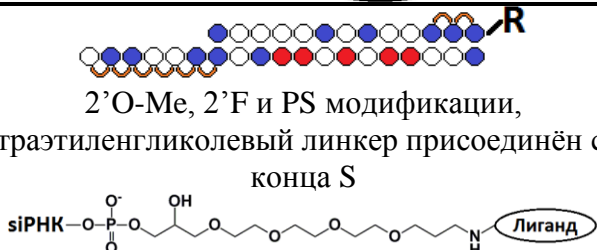

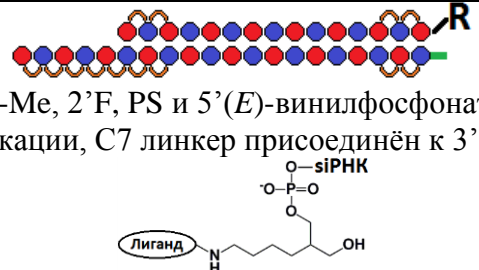
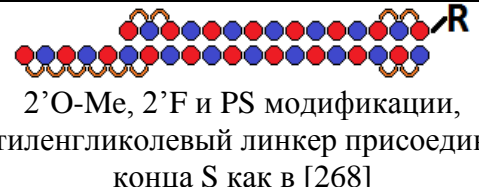
где было показано, что более липофильные конъюгаты эффективнее связываются с компонентами сыворотки, таким образом, не подвергаясь выведению почками [7,274].

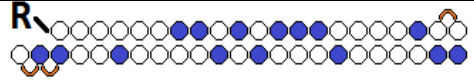
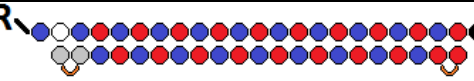
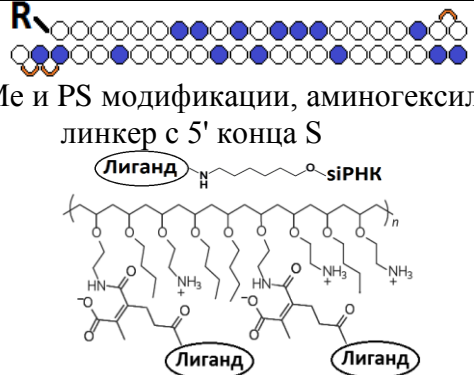
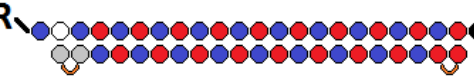
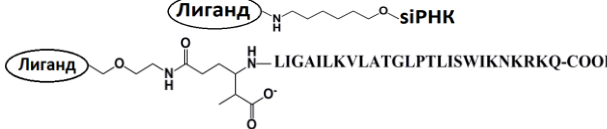
При подкожной или внутривенной инъекциях липофильных производных их проникновение через гематоэнцефалический барьер не осуществляется [273], поэтому для подавления экспрессии генов в мозге были предприняты попытки прямых инъекций полосатое тело мозга мыши [266,271,272]. Поскольку докозагексаеновая кислота является наиболее распространенной полиненасыщенной жирной кислотой в мозге млекопитающих, конъюгирование siРНК с ней наиболее эффективно подавляло экспрессию гена-мишени [271] по сравнению с другими липофильными конъюгатами [266]. Было показано, что после инъекции в полосатое тело мозга мыши (~1.25 мг/кг) конъюгата siРНК и докозагексаеновой кислоты происходит снижение уровня мРНК гена-мишени (*Htt*) не только в полосатом теле (73 %), но и в коре (52 %) соответствующего полушария [271]. Однако, в полосатом теле и коре противоположного полушария снижения уровня мРНК *Htt* при этом не наблюдалось. Оценка токсичности действия изучаемого конъюгата на мозг животного, при использовании в 20 раз большего количества конъюгата, чем в исследовании биологической активности показала, что данное количество не вызывает иммунный ответ или гибель нейронов. Терапевтическая значимость подавления экспрессии гена *Htt* была показана в другой работе на мышинной модели болезни Хантингтона с использованием ASO [275]. Было показано, что подавление экспрессии даже обоих аллелей (мутантного и аллеля дикого типа) приводило к восстановлению здорового фенотипа животного. Поэтому использование докозагексаеновой кислоты для конъюгирования с siРНК можно рассматривать, как перспективный подход для лечения различных наследственных нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Хантингтона.


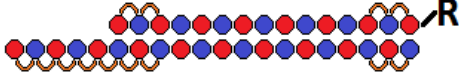
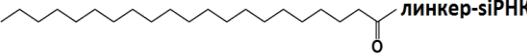
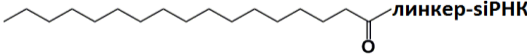
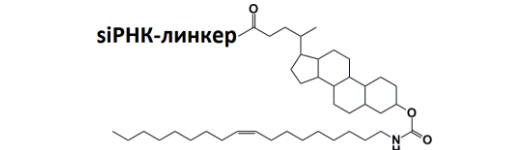
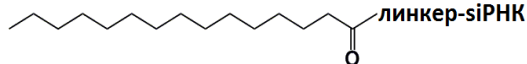

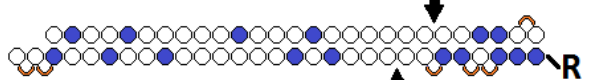
Таким образом, поскольку липофильные производные siРНК способны накапливаться и проявлять биологическую активность во множестве тканях и органах, такие конъюгаты можно рассматривать как универсальную платформу для доставки siРНК по всему организму.

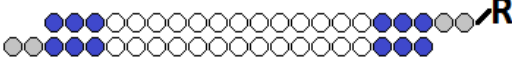
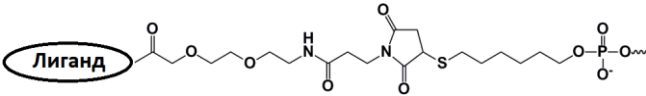
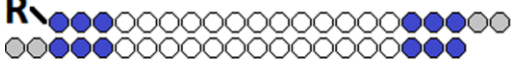
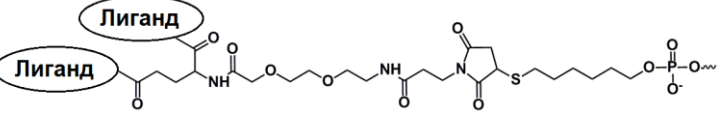
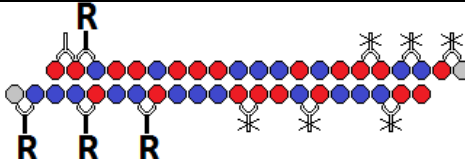
Таблица 2. Биоконъюгаты siРНК.

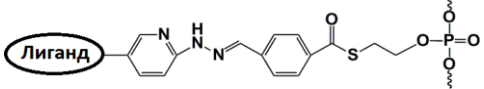
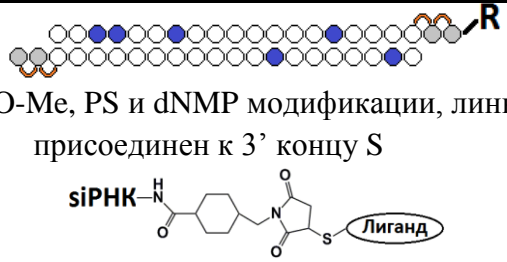
Конъюгат	Линкер, место присоединения к siРНК ²⁾ , паттерн ⁹⁾ химических модификаций siРНК (сверху 5'-3' смысловая цепь (S), внизу антисмысловая (AS) 3'-5')	Клетка или орган-мишень, ген-мишень	Концентрация или доза конъюгатов	Эффективность действия ¹⁾	Ссылка
Липофильные производные siРНК					
<p>Холестерин-siРНК</p> 	 <p>2'О-Ме и PS модификации, аминокaproновый – пирролидиновый линкер с 3' конца S</p> 	Печень мыши (1), тощая кишка (2), <i>ApoB</i>	50 мг/кг, 3 i.v. инъекции.	57 % (1), 42% (2), мРНК ³⁾ (через 24 часа)	[6]
	2'О-Ме и PS модификации, аминокaproновый – пирролидиновый линкер (как в [6])	Печень мыши, <i>ApoB</i>	50 мг/кг, i.v.	50 %, мРНК, (через 48 ч)	[7]
	 <p>Инвертированные тимидины (T_{inv}), дисульфидный линкер с 5' конца S $-(CH_2)_2-S-S-(CH_2)_6-$</p>	Легкие мыши, <i>p38</i>	7.5 мг/кг, интратрахеально	40 %, мРНК, (через 12 ч)	[267]
	н.д. ⁴⁾ , аминокapсильный линкер с 5'-конца S	Клетки Huh-7, <i>β-Gal</i>	50 нМ	55 %, мРНК	[4]
	11 2'О-Ме модификаций, нет данных паттерна, аминокapсильный линкер присоединен через 5'-конец S	Клетки MCF7, <i>IRS1</i>	200 нМ	50 %, белок ⁵⁾	[16]
	 <p>2'О-Ме модификации, аминокapсильный линкер с 5' конца S</p>	Опухоль KB-8-5, <i>MDR1</i>	10 мг/кг, i.v.	60 %, белок, (через 6 дней)	[130]

 <p>2'-O-Me модификации, линкер присоединен через 3'-конец S</p>	Спинальный мозг крысы, <i>CNS</i>	~4 мг/кг (инъекция 10 мкл/ч, в течении трех дней)	60%, мРНК (через 24 ч)	[276]
 <p>2'-O-Me, 2'-F и PS модификации, тетраэтиленгликолевый линкер присоединён с 3' конца S</p>	Глаз крысы, <i>Prib</i>	0.15 мг/кг, внутриглазная инъекция	55%, мРНК (через 2 дня)	[268]
 <p>2'-O-Me, 2'-F и PS модификации, тетраэтиленгликолевый линкер [268] присоединён с 3' конца S</p>	Мозг мыши (стриатум (1) и кора полушария (2)), <i>Htt</i>	~1.25 мг/кг, внутривенная инъекция (i.v.) в полосатое тело	75 % (1), 40 % (2), белок (через 5 дней)	[266]
 <p>2'-O-Me, 2'-F, PS и 5'-(E)-винилфосфонатная модификации, C7 линкер присоединён к 3' концу S</p>	Печень мыши (1), Почки (2), <i>Htt</i> и <i>Prib</i>	20 мг/кг, подкожная (s.c.) инъекция	50 и 70 % (1), ~5 и 30% (2), мРНК (через 7 дней)	[273]
 <p>2'-O-Me, 2'-F и PS модификации, тетраэтиленгликолевый линкер присоединён с 3' конца S как в [268]</p>	Плацента беременных мышей CD1, <i>sFLT1</i>	20 мг/кг, i.v.	25 %, мРНК (через 5 дней)	[277]

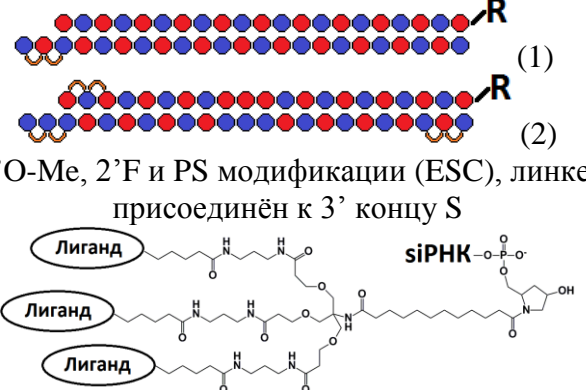
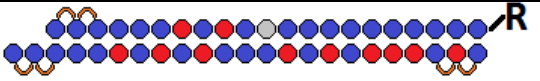
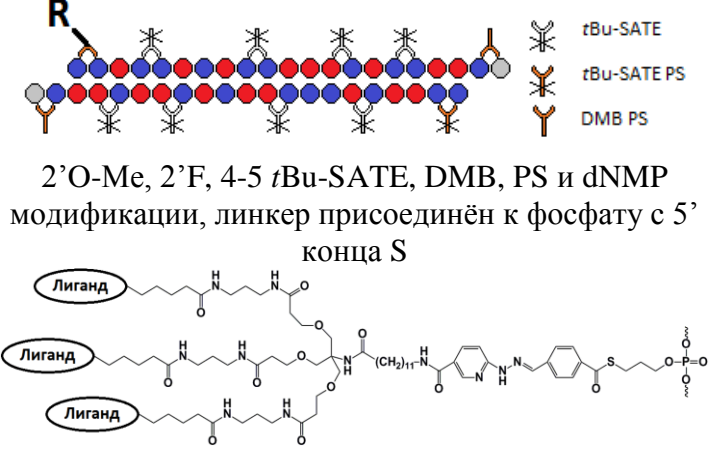
	 <p>2'-O-Me и PS модификации, аминоксильный линкер с 5' конца S</p> <p>Лиганд <chem>NCCCCCCO</chem> siРНК</p>	Печень обезьян рода <i>Macaca, AroB</i>	5 мг/кг siРНК i.v.	0%, уровень белка в крови (через 2 дня)	[278]
	 <p>2'-O-Me, 2'-F, dNMP, PS, T_{inv}, аминоксильный линкер с 5' конца S как в [278]</p> <p>Лиганд <chem>NCCCCCCO</chem> siРНК</p>	Печень обезьян рода <i>Synomolgus</i> , фактор свёртывания крови VII (F7)	10 мг/кг siРНК, i.v.	20 %, белок, (через 2 дня)	[279]
Холестериновый конъюгат siРНК и поликонъюгат (N-ацетилгалактозамин-PBAVE)	 <p>2'-O-Me и PS модификации, аминоксильный линкер с 5' конца S</p> <p>Лиганд <chem>NCCCCCCO</chem> siРНК</p> <p>Лиганд</p>	Печень обезьян рода <i>Macaca, AroB</i>	2 мг/кг siРНК и 15 мг/кг NAG-PBAVE, i.v.	75%, уровень белка в крови (в течении 30 дней)	[278]
Холестериновый конъюгат siРНК и конъюгат N-ацетилгалактозамина и мелитинподобного пептида (GalNAc-MLP)	 <p>2'-O-Me, 2'-F, dNMP, PS, T_{inv}, аминоксильный линкер с 5' конца S как в [278]</p> <p>Лиганд <chem>NCCCCCCO</chem> siРНК</p>	Печень обезьян рода <i>Synomolgus</i> , фактор свёртывания крови VII (F7)	2 мг/кг siРНК и 3 мг/кг NAG-MLP, i.v.	99 %, белок, (в течении 25 дней)	[279]
	 <p>Лиганд <chem>NCCCCCCO</chem> siРНК</p> <p>Лиганд <chem>CC(C)C(=O)NCCNC(=O)CCOC</chem> LIGAILKVLATGLPTLISWIKNKRKQ-COOH</p>	Печень человека, HBV инфекция, HBx, preC-C	4 мг/кг смесь siРНК GalNAc-MLP, i.v.	~90 %, HBsAg (белок поверхностной оболочки HBV), (в течении 50 дней)	[280]


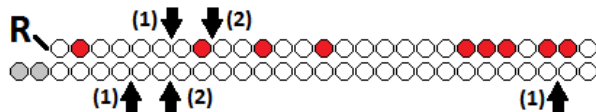

<p>Докозагексаеновая кислота-siРНК</p> 	 <p>2'-O-Me, 2'-F и PS модификации, C7 линкер присоединён к 3' концу S как в [273]</p>	<p>Мозг мыши (стриатум (1) и кора полушария (2)), <i>Htt</i></p>	<p>~1.25 мг/кг, i.c. инъекция в полосатое тело</p>	<p>73 % (1), 51 % (2), белок (через 7 дней)</p>	<p>[271]</p>
<p>Докозанил-siРНК (C22)</p> 	<p>2'-O-Me и PS модификации как в [6], аминокaproновый – пирролидиновый линкер с 3' конца S [6]</p>	<p>Печень мыши, <i>ApoB</i></p>	<p>50 мг/кг, 3 i.v. инъекции</p>	<p>50 %, мРНК (через 24 ч)</p>	<p>[7]</p>
<p>Стеароил-siРНК (C18)</p> 				<p>30 %, мРНК (через 24 ч)</p>	
<p>Остаток олеиламида литохоловой кислоты-siРНК</p> 				<p>35 %, мРНК (через 24 ч)</p>	
<p>Гексадекановая ssРНК (C16)</p> 	 <p>2'-O-Me, 2'-O-MOE, 2'-F, PS и 5'-(E)-винилфосфонатная модификации одноцепочечная siРНК, аминогексильный линкер присоединён к 5' концу антисмысловой цепи через 2' положение рибозы</p>	<p>Печень трансгенной мыши, <i>ApoC III</i> (Human)</p>	<p>14 мг/кг, s.c. (IC50~10 мг/кг)</p>	<p>65%, мРНК, (через 2 дня)</p>	<p>[201]</p>
<p>α-Токоферол-DsiРНК (Dicer-substrate siРНК)</p>	 <p>2'-O-Me и PS модификации, α-Токоферол присоединён через фосфат⁸⁾ 5' конца AS</p>	<p>Печень мыши, <i>ApoB</i></p>	<p>32 мг/кг, i.v. (IC50~2 мг/кг)</p>	<p>80 %, мРНК, (через 2 дня)</p>	<p>[5]</p>

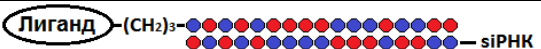
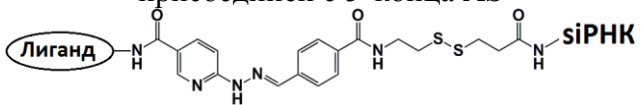
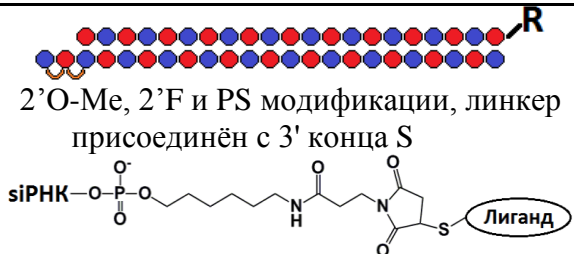
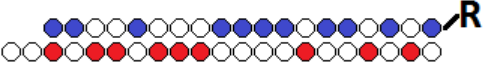
Конъюгаты siРНК и пептидов					
SPACE-siRNA «ACKTGSHNQCG»-siРНК	Все нуклеотиды 2'О-Ме (1), либо без модификаций (2), амидный линкер присоединён с 3' конца AS	Мышиный эпидермис, <i>IL10</i>	Нанесение на кожу, 3 см ² , ~12 мг/кг	23 % (1), 28% (2), белок, (через 24 ч)	[281]
cRGD-siРНК «RGDFK»-siРНК (циклический пептид)	 <p>2'О-Ме и dNMP модификации, линкер присоединен к 3' концу S</p> 	Ксенографтная опухоль A549, <i>VEGFR2</i>	0.753 мг/кг, 6 i.v. инъекций каждые 3 дня	55%, мРНК 60%, белок, уменьшение роста опухоли	[129]
2×cRGD-siРНК 2×«RGDFK»-siРНК (два циклических пептида)	 <p>2'О-Ме и dNMP модификации, линкер присоединен к 5' концу S</p> 	Ксенографтная глиобластома U87MG, <i>PIK3CB</i>	0.752 мг/кг 12 i.v. инъекции	55%, мРНК 40%, белок	[282]
TAT-siРНК «YGRKKRRQRRR»-siРНК	Нет модификаций, -N-концевой Cys-HN-(CH ₂) ₃ -, линкер с 3' конца AS	HeLa, <i>GFP</i>	400 нМ	60 %, Белок	[283]
	T _{inv} как в [267], линкер с 3' конца AS -C-концевой Cys -S-(CH ₂) ₆ -	Легкие мышцы, <i>MAPK14</i>	7.5 мг/кг, интратрахеально	40 %, мРНК (через 12 ч)	[267]
TAT-siRNN (TAT-малая интерферирующая нейтральная рибонуклеиновая кислота)	 <p>2'О-Ме аналоги пуринов, 2'F пиримидинов, dNMP по 3' концам, по 3 tBu-SATE в каждой цепи, линкер</p>	Клетки H1299-dGFP, <i>GFP</i>	50 нМ	85 %, белок	[231]

	<p>присоединен к фосфатам обеих цепей</p> 				
<p>Пенетратин-siPHK «CRQIKIWFQNRRMKWKK»-siPHK</p>	<p>Нет модификаций, N-концевой Cys-S-(CH₂)₆-, линкер присоединён к 5'-концу S</p>	<p>Клетки C166-GFP (1), EOMA-GFP (2), GFP</p>	<p>25 нМ</p>	<p>80 % (1), 95 % (2), белок</p>	<p>[284]</p>
	<p>T_{inv} как в [267], линкер -C-концевой Cys-S-(CH₂)_x-, присоединён к 5'-концу S</p>	<p>Легкие мышцы, MAPK14</p>	<p>7.5 мг/кг интратрахеально</p>	<p>20 %, мРНК (через 12 ч)</p>	<p>[267]</p>
<p>Транспортан-siPHK «CLIKKALAALAKLNIKLLYGASNLTWG»- siPHK</p>	<p>Нет модификаций, N-концевой Cys-S-(CH₂)₆-, линкер присоединён к 5'-концу S</p>	<p>Клетки COS-7, F. luciferase</p>	<p>25 нМ</p>	<p>50 %, белок</p>	<p>[284]</p>
		<p>Клетки C166-GFP, EOMA-GFP, GFP</p>	<p>25 нМ</p>	<p>68 %, 97 %, белок</p>	
<p>«Пептид расщепляющийся каспазой 4»-siPHK «LEVDG»-siPHK</p>	<p>Нет модификаций, аминоксильный линкер присоединён к 5'-концу AS</p>	<p>Клетки Jed-3, STAT3</p>	<p>200 нМ</p>	<p>70 %, белок</p>	<p>[17]</p>
<p>«Пептид имитирующий ИФР-1»-siPHK «CSKC»-siPHK</p>	<p>11 2'-O-Me, нет данных паттерна модификаций, аминоксильный линкер присоединен с 5'-конца S</p>	<p>Клетки MCF7, IRS1</p>	<p>200 нМ</p>	<p>65 %, белок</p>	<p>[16]</p>
<p>Альбумин-siPHK</p>	<p>2'-O-Me, PS и dNMP модификации, линкер присоединен к 3' концу S</p> 	<p>Сердце мыши, линии BALB/c, IGF-IR</p>	<p>5 мг/кг, i.v.</p>	<p>35 %, мРНК (через 3 дня)</p>	<p>[242]</p>

Конъюгаты siРНК и N-ацетилгалактозамина

<p>N-ацетилгалактозамин-siРНК</p>	 <p>(1) (2) 2'-O-Me, 2'-F и PS модификации (ESC), линкер присоединён к 3' концу S</p>	<p>Печень мыши, транстиретин (<i>TTR</i>)</p>	<p>5 мг/кг, s.c.</p>	<p>55 % (1), 85% (2), мРНК (в течении более, чем 40 дней)</p>	<p>[15]</p>
	 <p>2'-O-Me, 2'-F, PS и dNMP модификации (Advanced ESC), линкер как в [15] присоединён с 3' конца S</p>	<p>Печень человека, <i>PCSK9</i></p>	<p>~6 мг/кг (500 мг), s.c.</p>	<p>70 %, (в течении 6 месяцев)</p>	<p>[132]</p>
<p>N-ацетилгалактозамин-нейтральная рибонуклеиновая кислота</p>	 <p>2'-O-Me, 2'-F, 4-5 <i>t</i>Bu-SATE, DMB, PS и dNMP модификации, линкер присоединён к фосфату с 5' конца S</p>	<p>Печень мыши, <i>ApoB</i></p>	<p>25 мг/кг, i.v.</p>	<p>60 %, мРНК (в течении 12 дней)</p>	<p>[231]</p>

Конъюгаты siРНК и аптамеров					
<p>«РНК аптамер (A10) к PSMA»-siРНК</p> 	<p>Нет модификаций, аптамер присоединен через аденин с 5'-конца S⁷⁾</p>	<p>Клетки LNCaP, <i>PLK1</i></p>	<p>400 нМ</p>	<p>85 %, мРНК</p>	<p>[241]</p>
<p>«РНК аптамер (A10-3) к PSMA»-shРНК</p>	<p>Нет модификаций, аптамер присоединен через урацил с 5'-конца S⁷⁾</p>	<p>Ксенографтная опухоль LNCaP, <i>PLK1</i></p>	<p>0.3 мг/кг (200 пмоль), 10 внутриопухолевых инъекций (i.t.) в течении 20 дней</p>	<p>Регрессия опухоли</p>	
<p>«РНК аптамер (A-1) к gp120»-DsiРНК</p>	 <p>Аптамер и смысловая цепь siРНК содержат 2'F аналоги пиримидинов, аптамер присоединен через два урацила с 5'-конца S⁷⁾</p>	<p>Клетки LNCaP, <i>PRKDC</i></p>	<p>400 нМ</p>	<p>85 %, мРНК</p>	<p>[286]</p>
<p>«РНК аптамер (Gint4.T) к рецептору тромбоцитарного фактора роста бета (PDGFRβ)»-siРНК</p>	 <p>2'F модификации, линкер – дуплекс, содержащий 2'О-Ме и 2'F модификации и (CH₂)₃, комплементарно соединяется с 3' концом AS</p>	<p>Ксенографтная опухоль LNCaP, <i>PRKDC</i></p>	<p>0.3 мг/кг (200 пмоль), 2 i.t. инъекции, совместно с ионизирующим излучением</p>	<p>65 %, мРНК, регрессия опухоли</p>	
<p>«РНК аптамер (A-1) к gp120»-DsiРНК</p>	<p>Модель HIV-1 инфекции-гуманизированные мыши RAG-hu, <i>Tat, Rev</i></p>	<p>0.38 мг/кг (250 пмоль), 8 i.v. инъекций в течении 4 недель</p>	<p>90 %, мРНК (в РВМС), уменьшение количества HIV-1 частиц в плазме на 5 порядков (на 4 недели)</p>	<p>[286]</p>	<p>[287]</p>
<p>«РНК аптамер (Gint4.T) к рецептору тромбоцитарного фактора роста бета (PDGFRβ)»-siРНК</p>	<p>Ксенографтная опухоль U87MG, <i>STAT3</i></p>	<p>2.6 мг/кг (1.6 нмоль), 5 интрапетитонеальных (i.p.) инъекций в</p>	<p>60 %, мРНК 77 %, белок (через 3 дня), замедление роста опухоли</p>	<p>[287]</p>	<p>[287]</p>

			течении 9 дней		
«ДНК аптамер (aptNCL) к нуклеофилину»-siРНК	Нет модификаций, ДНК аптамер имеет два поли-Т хвоста, присоединённые через сульфидрильную группу к сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидофенил) бутирату к 3' концу S	Ксенографтная опухоль CL1-5, <i>SLUG, NPR1</i>	0.1 мг/кг (50 пмоль), 15 i.t. инъекций в течении 5 недель	95 %, белок, замедление роста опухоли	[288]
Конъюгаты siРНК и антител					
«АТ к рецептору инсулина»-siРНК	Нет модификаций, биотин-стрептавидиновый линкер присоединён через 5'-конец S	Клетки НЕК 293, <i>F. luciferase</i>	115 нМ	90 %, белок	[11]
«АТ (hu3S193) к белку Льюиса Y»-siРНК	Два dNMP с 3' конца смысловой цепи, линкер присоединён с 5' конца AS 	Клетки A431, <i>STAT3</i>	300 нМ (1), 300 нМ и 100 мкМ хлорокина (2)	0 % (1), 60 % (2), мРНК	[289]
«АТ (TfRMAb) к рецептору трансферрина»-siРНК	Нет модификаций, тетраэтиленгликолевый биотин-стрептавидиновый линкер присоединён с 5'-конца S	Модель глиобластомы крысы (CD344) с внутречерепным введением RG-2, <i>F. luciferase</i>	0.27 мг/кг, i.v.	81 %, белок (через 2 дня)	[290]
«АТ (F _{ab} фрагмент RI7 217) к CD71»-siРНК	2'-O-Me, 2'F и PS модификации, линкер присоединён с 3' конца S 	Мыши C57BL/6J, модель заболевания периферических артерий, <i>MSTN</i>	~3.6 мг/кг, 4 внутримышечные инъекции в течении 4 недель	72 %, мРНК, увеличение расстояния пробега на 24 %	[291]
«АТ к TENB2»-siРНК	2'-O-Me и 2'F модификации, линкер как в [242] присоединён с 3' конца S 	Ксенографтная опухоль PC3-TENB2-high, <i>PPIB</i>	24 мг/кг, 3 i.v. инъекции	~33%, мРНК, (через 2 дня)	[12]

Другие конъюгаты siРНК					
<p style="text-align: center;">CpG-DsiРНК TCCATGACGTTTCCTGATGCT- DsiРНК</p>	<p style="text-align: center;">Нет модификаций, углеводородный линкер (CH₂)₁₅ присоединён к 5' концу AS</p>	<p style="text-align: center;">Модель острого миелоидного лейкоза, <i>Cbfb-MYH11/Mpl</i>⁺ клетки введенные мышам <i>NOD/SCID/IL- 2RγKO, STAT3</i></p>	<p style="text-align: center;">5 мг/кг, 6 i.v. инъекций в течении 6 дней</p>	<p style="text-align: center;">45%, мРНК (в лейкозных клетках через 24 ч)</p>	<p style="text-align: center;">[292]</p>
<p style="text-align: center;">Динамический поликонъюгат</p>	<p style="text-align: center;">2'O-Me, 2'F, dNMP, PS и T_{inv} линкер с 5' конца S</p>	<p style="text-align: center;">Печень шимпанзе, Фактор свёртывания крови VII (F7)</p>	<p style="text-align: center;">5 мг/кг, i.v.</p>	<p style="text-align: center;">99 %, белок, (в течении 80 дней)</p>	<p style="text-align: center;">[293]</p>

¹⁾ Эффективность действия биоконъюгатов, показана доля снижения уровня мРНК гена-мишени или уровня целевого белка.

²⁾ «R» - лиганд и линкер

³⁾ В данной работе исследовали снижение уровня мРНК.

⁴⁾ н.д. – нет данных распределения модификаций по siРНК.

⁵⁾ В данной работе исследовали снижение уровня белка.

⁶⁾ В ходе исследования не определяли (н.о.) биологическую активность конъюгата.

⁷⁾ Конъюгат siРНК с аптамером был получен транскрипцией *in vitro* (линкера нет).

⁸⁾ Предполагаемые места расщепления Дайсером обозначены стрелками

⁹⁾ Белым цветом обозначены немодифицированные РНК нуклеотиды, 2'О-Me аналоги обозначены синим, 2'F - красным, dNMP - серым, PS - оранжевым, инвертированные тимидины (T_{inv}) - черным, 2'О-МОЕ – фиолетовым, 5'(E)-винилфосфонат – зеленым цветом.

1.6.2 Конъюгаты siРНК и пептидов

Некоторые белки и пептиды способны проникать в клетку за счет природных механизмов транспорта, а так же переносить в клетку другие молекулы. Основные механизмы транспорта пептидов включают связывание с поверхностными белками, гликоконъюгатами (адресные пептиды [294,295]) или анионными липидами клетки с последующим поглощением их эндоцитозом, проникновение через мембрану (CPP, cell penetrating peptide [296-302]), либо лизирование мембраны или формирование в ней пор (литические пептиды [303]). Существует два основных способа получения таких пептидов: при помощи фагового дисплея, либо использование частей белков, выполняющих сходные функции. В данной главе мы рассмотрим основные подходы для доставки пептидами siРНК.

Способность пептидов специфически взаимодействовать с определёнными белками на поверхности клетки за счет специфических элементов третичной структуры была использована для адресной доставки siРНК. Различные адресные пептиды были конъюгированы с siРНК и такие конъюгаты обладали биологической активностью *in vitro* [16,295,304] и *in vivo* [129]. Например, конъюгат siРНК и пептида «CSKC», имитирующего инсулиноподобный фактор роста-1 (ИФР-1) эффективно проникал в клетки MCF7, экспрессирующие рецептор, специфичный к ИФР-1, и подавлял экспрессию гена-мишени *IRS1* на 60 % без помощи трансфекционных агентов [16].

Одним из наиболее успешных примеров адресных пептидов является циклический пептид cRGD. Данный пептид является частью iRGD пептида, полученного при помощи отбора фаговой библиотеки циклических пептидов на связывание с ксенографтной опухолью PC-3 [305]. cRGD связывается с $\alpha_v\beta_{3/5}$ интегринами, которые экспрессируются на высоком уровне в опухолевых клетках и клетках эндотелия сосудов опухоли [306,307]. Конъюгирование siРНК с этим пептидом способствовало накоплению и проявлению биологической активности siРНК как в опухолевых клетках в культуре [304], так и *in vivo* после 6 внутривенных инъекций животным с ксенографтной опухолью A549 (снижение мРНК гена *VEGFR2* на 55 %), что сопровождается уменьшением роста опухоли [129] (таблица 2). Были предприняты попытки увеличения количества cRGD пептида в составе конъюгата с siРНК, однако введение дополнительных молекул этого пептида не оказывало прямого дозозависимого действия на биологическую активность. Оценка биологической активности по подавлению экспрессии гена *GFP* в клетках M21⁺GL₃ показала, что конъюгат siРНК с двумя cRGD пептидами обладал незначительной активностью (20 %), конъюгат с четырьмя cRGD пептидами проявлял среднюю биологическую активность

(37 %), в то время как конъюгат с тремя cRGD обладал наибольшей биологической активностью (73 %) [304].

Ковалентное присоединение пептидов может не только увеличивать эффективность накопления siРНК в клетках, но и обеспечивать специфичность их действия в клетках-мишенях. Было показано, что пептид с последовательностью «LEVDG» в составе siРНК блокирует сборку RISC [17], однако, данная последовательность специфически узнается и расщепляется каспазой-4, экспрессирующейся в клетках хориокарциномы Jeg-3. Таким образом, при введении конъюгата анти-*STAT3* siРНК и пептида «LEVDG» в клетки Jeg-3, наблюдалось эффективное (до 70 %) подавление экспрессии гена-мишени (таблица 2), тогда как в контрольных клетках HEK 293, не экспрессирующих каспазу-4, подавления экспрессии гена *STAT3* не происходило [17].

За счет наличия положительно заряженных аминокислот в своём составе и вторичной структуры CPP пептиды, такие как пенетратин [267], транспортан [284] и Tat (trans activator of transcription) [298] способны проникать через мембрану клеток, а также доставлять ковалентно присоединённые молекулы нуклеиновых кислот внутрь клеток [283,284]. При этом, в ряде работ было показано [16,284], что конъюгаты siРНК и CPP обладают биологической активностью при их добавлении к клеткам. Однако, к сожалению, применение таких конъюгатов *in vivo* ограничено, поскольку они достаточно токсичны, кроме того могут вызывать иммунный ответ [267,308,309].

Другим ограничением для использования CPP в качестве агентов доставки siРНК является образование комплексов положительно заряженных CPP с siРНК, что препятствует взаимодействию siРНК с компонентами RISC. Для того, чтобы избежать этого эффекта, было предложено нейтрализовать и экранировать отрицательный заряд siРНК за счет введения химических модификаций (трет-бутил-S-ацил-2-тиоэтил фосфотриэфир (*t*Bu-SATE), (таблица 1), (таблица 2)) [231,310]. Введение в состав конъюгата siРНК *t*Bu-SATE модификаций позволило конъюгировать siРНК с несколькими катионными пептидами без ингибирования РНК-интерференции. При этом, биологическая активность таких конъюгатов зависела от количества молекул CPP пептида Tat (trans activator of transcription) в нём [231]. Конъюгат, содержащий четыре Tat пептида более эффективно подавлял экспрессию гена-мишени в клетках, чем конъюгат, содержащий два или три Tat пептида. Однако, несмотря на многообещающие результаты *in vitro* [231,311], данный конъюгат siРНК пока не применялся в исследованиях *in vivo*.

Другим успешным примером использования CPP в качестве лиганда для конъюгации с siРНК является пептид SPACE (skin penetrating and cell entering),

полученный методом фагового дисплея путем отбора пептида на проникновение через эпидермис [281,312]. Присоединение SPACE пептида к siРНК способствовало проникновению siРНК через эпидермис и дерму после нанесения на поверхность кожи. Было показано, что однократное нанесение ~12 мг/кг конъюгата siРНК и SPACE пептида приводило к подавлению экспрессии генов *IL10* или *GAPDH* в эпидермисе на 28 % или 47 %, соответственно. Включение такого конъюгата в состав липоплексов, обогащенных SPACE пептидом вызывает ещё более эффективное снижение уровня гена-мишени *GAPDH* - нанесение липоплексов в дозе ~12 мг/кг приводило к снижению уровня *GAPDH* на 80%.

Для решения проблемы эффективного накопления siРНК *in vivo* был предложен интересный подход, в котором использовали siРНК, содержащую химическую модификацию на 3' конце смысловой цепи, способную образовывать ковалентную связь между siРНК и альбумином после внутривенного введения siРНК [242]. Для этого к siРНК присоединяли сукцинимидил 4-[N-малеимидометил] циклогексан-1-карбоновую кислоту при помощи аминогруппы на 3' конце смысловой цепи, образованная молекула («активированная» siРНК) могла взаимодействовать с альбумином с образованием дисульфидной связи. При введении мышам линии BALB/c, «активированной» siРНК, соединявшейся с альбумином, наблюдалось более эффективное накопление siРНК в миокарде, по сравнению с немодифицированной siРНК, а также снижение уровня мРНК гена-мишени *IGF-IR* на 35 % (Таблица 2). Однако, токсическое действие «активированной» siРНК на организм в данной работе не было исследовано, поэтому вопрос применения такой siРНК остаётся открытым.

Другим подходом для доставки siРНК в клетки-мишени является её конъюгирование с литическими пептидами, способствующими выходу siРНК из эндосомы [59]. Основными механизмами, увеличивающими эффективность выхода siРНК из эндосомы, является образование пептидами трансмембранных пор за счет их амфифильности и способности образовывать сложные комплексы (мелитин, цитолитический пептид из пчелиного яда [303], рицин, рибосом-инактивирующий белок из клещевины [313]); протонирование основных групп пептидов при понижении pH эндосомы с последующим увеличением осмотического давления внутри неё и разрывом её мембраны (полигистидин [314]); либо локальная дестабилизация мембраны за счет фьюзогенных свойств белков и проникновение через мембрану эндосомы (гликопротеин Н из вируса герпеса [315], домен гемагглютинаина-2 вируса гриппа [316,317], домен дифтерийного токсина [318]). Несмотря на эффективность действия литических пептидов, основной проблемой при их использовании является токсичность,

поскольку образование пор и увеличение осмотического давления внутри эндосомы предполагает её разрушение. При этом, подход, при котором мембрана локально дестабилизируется является менее токсичным, поскольку он не приводит к значительным повреждениям эндосомы и поэтому является наиболее перспективным. Однако, на сегодняшний день на основе этих пептидов не создано эффективного и нетоксичного эндосомолитического агента.

Таким образом, использование конъюгатов siРНК и пептидов для доставки siРНК является одним из перспективных подходов, однако, в настоящий момент эффективность и специфичность доставки, обеспечиваемая пептидами не достигает уровня, при котором они не проявляют токсических и иммуногенных эффектов.

1.6.3 Конъюгаты siРНК и лигандов рецепторов

Основными факторами, влияющими на эффективность специфической доставки в клетки-мишени являются эффективность связывания лиганда с рецептором и степень экспрессии рецептора на поверхности мембраны. Как правило, для взаимодействия лиганда с рецептором характерна высокая специфичность, поэтому введение таких молекул способствует эффективной адресной доставке ковалентно присоединённых к ним молекул [319]. Наиболее успешным к настоящему моменту примером применения лиганда для доставки siРНК является N-ацетилгалактозамин – поскольку его взаимодействие с асиалогликопротеиновым рецептором (ASGPR) происходит с высокой эффективностью ($K_d=2.48$ нМ) и этот рецептор экспрессируется в гепатоцитах на высоком уровне ($0.5 \cdot 10^6$ молекул на клетку) [320]. Конъюгирование siРНК с N-ацетилгалактозамином способствует эффективной доставке siРНК и подавлению экспрессии гена-мишени *PCSK9* на 70 % после введения пациентам однократной подкожной инъекции ~6 мг/кг [132] (таблица 2). Количество ASGPR в гепатоцитах настолько большое, что снижение его экспрессии на 50 % не приводит к уменьшению эффективности биологической активности конъюгата siРНК и N-ацетилгалактозамина и только более значительное подавление до 95 % блокирует действие конъюгата [321]. По этим причинам и из-за недорогого синтеза конъюгаты siРНК с N-ацетилгалактозамином являются одними из наиболее перспективных препаратов для введения в медицину лекарств на основе siРНК для лечения заболеваний печени. Например, последнее поколение препаратов от Arrowhead Pharmaceuticals - TRiM (Targeted RNAi Molecule) представляет собой конъюгат siРНК и N-ацетилгалактозамина [280]. Внутривенное введение мышам с моделью HBV инфекции 4 мг/кг препарата ARO-HBV, состоящего из эквимольного количества двух конъюгатов siРНК (анти-*HBx* и анти-

preC-C) и N-ацетилгалактозамина уменьшало уровень белка поверхностной оболочки HBV (HBsAg) на ~98 % в течении 40 дней. В настоящий момент ARO-HBV проходит 1/2 стадию клинических испытаний (NCT03365947).

Для специфического накопления siРНК в опухолевых клетках было предложено конъюгирование её с фолиевой кислотой [14]. Фолиевая кислота является предшественником тетрагидрофолата, который необходим для синтеза нуклеотидов *de novo*, поэтому она необходима делящимся клеткам. Проникновение фолиевой кислоты в клетки происходит путём рецептор-опосредованного эндоцитоза, при помощи гликопротеинового рецептора фолиевой кислоты, высокоспецифично связывающегося с фолатом ($K_d=10^{-10}$ М). Было показано, что его экспрессия в опухолевых клетках различного происхождения значительно выше по сравнению с уровнем экспрессии в обычных клетках [322,323]. Предположительно, проникновение производных siРНК, содержащих фолат, также происходит по механизму рецептор-опосредованного эндоцитоза [324], поэтому эффективность проникновения фолат-содержащих siРНК в опухолевые клетки значительно выше по сравнению с эффективностью проникновения конъюгатов в нормальные клетки. *In vivo* было показано более эффективное накопление флуоресцентно-меченого конъюгата siРНК и фолата в опухоли мыши, по сравнению с немодифицированной siРНК [14]. Однако, из-за сложного синтеза применение конъюгатов siРНК и фолата ограничено экспериментальными целями.

1.6.4 Конъюгаты siРНК и аптамеров

Аптамеры представляют собой синтетические олигорибонуклеотиды (молекулярная масса около 6–30 кДа), имеющие сложную третичную структуру, благодаря которой они обладают способностью специфически нековалентно связываться с определёнными антигенами [325]. Было показано, что присоединение аптамеров к siРНК способствует её специфическому накоплению в определённых типах клеток [326]. Так, конъюгирование siРНК с аптамером A10, специфичным к PSMA (Prostate specific membrane antigen), способствовало специфической доставке siРНК в клетки опухоли простаты, а биологическая активность конъюгата была сопоставима с активностью, наблюдаемой при использовании липоплексов [241]. На мышинной модели ксенографтной опухоли простаты LNCaP было показано, что такие конъюгаты обладают биологической активностью (85 % и 90 %, гены *PKL1* и *Bcl2*, соответственно), при этом, после 10 внутриопухолевых (i.t.) инъекций наблюдалось уменьшение роста опухоли и её регрессия [241] (Таблица 2). На такой же ксенографтной опухолевой модели другой конъюгат shРНК и аптамера к PSMA A10-3 так же обладал биологической активностью (65 %, ген

PRKDC), однако регрессия опухоли происходила после двух *i.t.* инъекций только в комбинации с ионизирующим излучением [285] (таблица 2).

В качестве противовирусного препарата было предложено синтезировать конъюгат siРНК и аптамера, специфичного к поверхностному белку gp120 капсида вируса иммунодефицита человека 1 (HIV-1)[286]. На модели гуманизированных мышей *Rag2^{-/-}γс^{-/-}* (RAG-hu) через 3 недели после инфицирования их HIV-1 было показано, что еженедельное введение (*i.v.*) такого конъюгата siРНК снижает концентрацию вирусной РНК в плазме животных на 5 порядков. Однако, через несколько недель после прекращения курса лечения количество вирусной РНК в плазме восстанавливалось почти до исходного уровня [286] (таблица 2).

Другим интересным свойством некоторых аптамеров является их способность проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Так, было показано, что аптамеры Gint4.T и GL21.T, специфичные к рецептору тромбоцитарного фактора бета (PDGFRβ), могут проникать через *in vitro* модель ГЭБ [327]. При этом, их конъюгаты siРНК способны накапливаться в ксенографтной глиобластоме после нескольких *i.v.* инъекций, подавлять в ней экспрессию гена-мишени *STAT3* на 60 % и снижать скорость её роста [287].

Помимо РНК аптамеров специфической способностью связываться с определёнными антигенами обладают и ДНК аптамеры [288]. Было показано, что образующий G-квадруплекс G-богатый дезоксирибонуклеотид AS1411 специфически связывается с нуклеолином – белком, экспрессирующимся на высоком уровне в клетках многих типов онкологических заболеваний и являющимся онкогеном [328]. ДНК аптамер aptNCL, созданный на основе AS1411, конъюгированный с siРНК способствует её доставке и биологической активности в клетках рака лёгкого как *in vitro*, так и *in vivo* [288].

При относительно высокой эффективности действия конъюгатов siРНК и аптамеров в экспериментальной практике их применение для клинического использования ограничено такими факторами, как расщепление нуклеазами, фильтрация почками, полианионные эффекты и иммунный ответ. Процедура поиска специфической последовательности аптамера к определённому объекту (SELEX, systematic evolution of ligands by exponential enrichment) хоть и быстра, но полученные аптамеры не всегда обладают высокой специфичностью к целевому антигену [329]. Тем не менее, в большинстве случаев конъюгация siРНК с аптамерами обеспечивает воспроизводимую специфическую доставку siРНК в клетки-мишени, а возможность получения аптамеров, направленных к любым белкам на поверхности клеточной мембраны указывает на перспективность данного подхода. Поэтому использование модифицированного

протокола SELEX для поиска химически модифицированных аптамеров и конъюгирование с полностью модифицированными siРНК может способствовать значительному увеличению эффективности и продолжительности терапевтического действия препаратов на основе конъюгатов siРНК и аптамеров и их введению в клиническую практику [330].

1.6.5 Конъюгаты siРНК и антител

Конъюгирование siРНК с антителами успешно использовалось для адресной доставки siРНК в специфические типы клеток, экспрессирующих рецепторы-антигены, однако, эффективность действия конъюгатов в работах сильно отличаются. Например, было показано, что конъюгат siРНК и антитела к рецептору инсулина подавляет экспрессию гена-мишени на 90 % в клетках НЕК 293 при концентрации 115 нМ (Таблица 2) [11]. Другой конъюгат siРНК и антитела к белку Льюиса Y, подавлял экспрессию гена-мишени на 60 % при концентрации 300 нМ только при обработке клеток хлорокином – агентом, ингибирующим созревание эндосом (Таблица 2) [289]. При этом, нековалентный комплекс siРНК и того же антитела к белку Льюиса, образованный при помощи электростатического взаимодействия олиго-аргинина и siРНК проявлял биологическую активность (60 %, 300 нМ) в отсутствие хлорокина. Вероятно, эффективность эндосомного выхода, опосредуемая хлорокином или олиго-аргинином является одним из важных факторов для биологической активности конъюгатов siРНК и антител.

Биологическая активность как ковалентных конъюгатов, так и нековалентных комплексов siРНК и антител, была показана *in vivo* в ряде работ [10,290,291,331,332]. Однако, системное сравнение эффективности биологической активности конъюгатов siРНК и антител, отличающихся антигенами-мишенями было проведено только в работе [12]. Было показано, что помимо уровня экспрессии рецептора-антигена на интерферирующую активность конъюгата влияет тип внутриклеточного транспорта рецептора, однако прямой корреляции между типом поглощения комплекса антитела с рецептором-антигеном и биологической активностью конъюгата найдено не было. При этом такой фактор, как наличие расщепляемой связи не влиял на интерферирующую активность конъюгатов. Поскольку в данной работе не было проведено сравнения эффективности связывания антител с соответствующими рецепторами, то оценить эффективность их диссоциации и степень выхода конъюгатов из эндосом нельзя. Однако, возможно, что этот фактор является наиболее значимым для биологической активности конъюгатов siРНК и антител.

Наиболее эффективное подавление экспрессии гена-мишени в данной работе наблюдалось в случае конъюгата siРНК и антитела к белку TENB2, для которого был изучен механизм его проникновения в клетки [12]. Было показано, что подавление экспрессии генов, связанных с клатрин-зависимым рецептор-опосредованным эндоцитозом приводило к уменьшению эффективности действия конъюгата, однако, подавление экспрессии генов *RAB5C* и *HPS4*, связанных с внутриклеточным транспортом, увеличивало его эффективность. Продукт гена *RAB5C*, вероятно, обеспечивает сортировку содержимого эндосом по пути рециркуляции [333], в то время как продукт гена *HPS4* участвует в регуляции протекания РНК-интерференции в клетке. Было показано, что продукт гена *HPS4* способствует уменьшению количества RLC и RISC белков в клетке путём увеличения частоты сливания лизосом с мультивезикулярными тельцами, где, предположительно, расположены белки РНК-интерференции [334]. Таким образом, при подавлении экспрессии гена *HPS4* повышение эффективности действия конъюгата siРНК и антитела к TENB2 связано с увеличением эффективности протекания РНК-интерференции в клетках-мишенях. Эффективность снижения уровня гена *PP1D* конъюгатом siРНК и антитела к TENB2 после трех внутривенных инъекций 24 мг/кг в ксенографтной опухоли PC3-TENB2-high составила всего 33 % (таблица 2) [12].

В другой работе [291] для конъюгирования с siРНК авторы использовали F_{ab} фрагмент антитела - участок молекулы иммуноглобулина, связывающий антиген, который имеет меньшую, чем у антитела аффинность к рецептору-мишени. После четырёх еженедельных внутримышечных инъекций (~3.6 мг/кг) конъюгата siРНК и F_{ab} фрагмента к рецептору трансферрина наблюдалось снижение уровня мРНК гена-мишени *MSTN* на 72 %, что способствовало увеличению средней продолжительности бега на 24 % мышцей с моделью заболевания периферических артерий [291]. При этом внутримышечное введение всего ~0.05 мг/кг конъюгата siРНК и F_{ab} фрагмента к рецептору трансферрина приводило к подавлению гена-мишени *HPRT* в месте введения на 55 %. Эффективная биологическая активность в клетках мышц при внутривенной инъекции конъюгата siРНК и F_{ab} фрагмента была получена компанией Avidity Bioscience. Снижение уровня мРНК гена-мишени *MSTN* достигло 90% и продолжалось в течении 20 дней после одной внутривенной инъекции этого конъюгата, при этом антигеном для F_{ab} фрагмента также являлся рецептор трансферрина. Вероятно, из-за меньшей эффективности связывания с рецептором и небольшой молекулярной массы (55 кДа) F_{ab} фрагменты более эффективно выходят из эндосом в цитоплазматическое пространство после поглощения их клетками, чем антитела. Поэтому такой подход является более перспективным для адресной

доставки siРНК в клетки, однако прямого сравнения таких конъюгатов на одной модели пока не было проведено.

Конъюгирование siРНК с антителами для доставки siРНК в клетки-мишени имеют ряд преимуществ по сравнению с конъюгированием siРНК с другими молекулами, такие как высокая эффективность связывания с лигандом ($Kd < 10^{-9-10}$) и длительное нахождение в крови из-за большой молекулярной массы (~150 кДа). Однако, иммунный ответ и низкая эффективность эндосомного выхода являются основным недостатком данного подхода, поэтому его дальнейшая оптимизация, как, например, использование гуманизированных антител, эндосомолитических агентов и полностью модифицированных siРНК требуется для эффективного использования конъюгатов siРНК и антител в клинике.

1.6.6 Конъюгаты siРНК и CpG олигонуклеотидов

В качестве альтернативного способа доставки siРНК в клетки-мишени используют системы, обеспечивающие эффективный выход siРНК из эндосом в цитоплазму. Например, при небольшом неспецифическом накоплении DsiРНК в различных типах клеток, её конъюгирование с CpG-содержащими олигодезоксирибонуклеотидами приводит к появлению интерферирующей активности DsiРНК в некоторых клетках, экспрессирующих TLR9 рецептор за счет эндосомного выхода, опосредованным TLR9 [335]. Таким образом, конъюгат обладает биологической активностью только в клетках, экспрессирующих TLR9 рецептор, таких как клетки иммунной системы: В-лимфоциты, дендритные клетки и макрофаги, а также некоторых типов опухолевых заболеваний [336]. Терапевтическое действие конъюгата siРНК и CpG олигонуклеотида было показано на различных мышинных моделях опухолей при системном введении конъюгата в течение нескольких недель [292,336,337]. Однако, поскольку введение CpG олигонуклеотидов приводит к активации цитокинов и интерлейкинов, их применение ограничено. Также, несмотря на терапевтический потенциал данного конъюгата, из-за быстрой деградации в сыворотке, его использование на людях ограничено локальными инъекциями. Введение химических модификаций в такие конъюгаты DsiРНК для увеличения резистентности к действию нуклеаз, вероятно, может изменить взаимодействие конъюгата с Дайсером [335].

В дальнейшем для подавления экспрессии гена-мишени *STAT3* авторы данных работ конъюгировали CpG олигонуклеотид с ДНК дуплексом, являющимся частью промотора гена *STAT3*, при попадании в ядро клетки-мишени такой дуплекс связывается с соответствующим транскрипционным фактором и блокирует его транскрипцию [338]. Данный конъюгат показал терапевтический эффект на мышинной модели острого

миелоидного лейкоза после нескольких внутривенных инъекций (5 мг/кг) [339]. Первая стадия клинических испытаний этого конъюгата для лечения В-клеточной неходжкинской лимфомы запланирована на 2019 год.

1.6.7 Динамический поликонъюгат siРНК

Для увеличения эндосомного выхода siРНК компанией Arrowhead Pharmaceuticals был разработан динамический поликонъюгат siРНК, содержащий два типа расщепляемых связей [247]. Поликонъюгат представляет собой амфифильный полимер, состоящий из поли-(бутил-аминовинилового эфира) (PBAVE) к которому присоединены остатки полиэтиленгликоля и молекулы адресного лиганда (N-ацетилгалактозамин) при помощи расщепляемого в кислых условиях карбокси дималеимидного ангидридного линкера. Молекулы siРНК соединены с PBAVE линкером, содержащим дисульфидную связь, которая расщепляется в цитоплазме клетки. Таким образом, после проникновения динамического поликонъюгата рецептор-опосредованным эндоцитозом в клетку и попадания в кислые условия эндосомы карбокси дималеимидные ангидридные связи расщепляются и N-ацетилгалактозамин и полиэтиленгликоль диссоциируют из состава поликонъюгата. После этого образовавшиеся аминогруппы на PBAVE протонируются, что приводит к понижению pH в эндосоме, увеличению осмотического давления внутри неё и разрыву её мембраны. Конъюгат PBAVE и siРНК проникает в цитоплазму, с последующим расщеплением дисульфидной связи и высвобождением siРНК из полимера [247]. Из-за эффективного эндосомного выхода динамический поликонъюгат обладает высокой биологической активностью – после одной внутривенной инъекции (5 мг/кг) подавление гена-мишени (*F7*) в печени шимпанзе наблюдалось с 99% эффективностью в течении 80 дней [293]. Другой препарат на основе динамического поликонъюгата представляет собой PBAVE полимер, так же конъюгированный с остатками полиэтиленгликоля или N-ацетилгалактозамина, но без siРНК (GalNAc-PBAVE) [278]. При этом, инъекции GalNAc-PBAVE осуществляются вместе с введением холестерина конъюгата siРНК. Поскольку при внутривенной инъекции конъюгат siРНК и холестерина накапливается преимущественно в печени, в этом органе происходит накопление и другого компонента – GalNAc-PBAVE. Такая система введения в несколько раз увеличивает биологическую активность холестерина конъюгата - после одной внутривенной инъекции препарата (2 мг/кг siРНК и 15 мг/кг GalNAc-PBAVE) подавление гена-мишени (*ApoB*) в печени шимпанзе с 75% эффективностью наблюдалось в течении 30 дней [278] (таблица 2).

Другой препарат, разрабатываемый компанией Arrowhead Pharmaceuticals, так же представляет собой холестеринный конъюгат siРНК, однако его введение осуществляется вместе с конъюгатом N-ацетилгалактозамина и мелитинподобного пептида (GalNAc-MLP) [279]. Мелитиноподобный белок является эндосомолитическим порообразующим пептидом, способным увеличивать эффективность выхода холестеринного конъюгата из эндосом и, соответственно, его биологическую активность. Было показано, что после одной внутривенной инъекции холестеринного конъюгата siРНК (1 мг/кг) вместе с GalNAc-MLP (6 мг/кг) подавление экспрессии гена-мишени *F7* в печени мыши происходило с 99% эффективностью, в то время как холестеринный конъюгат siРНК (10 мг/кг) без GalNAc-MLP снижал экспрессию гена *F7* только на 20 % [279]. Такая система введения была применена для лечения хронического гепатита В (HBV) у пациентов на второй стадии клинических испытаний этого препарата. Было показано, что после однократного введения 4 мг/кг смеси двух конъюгатов siРНК (анти-*HBx* и анти-*preC-C*) и холестерина и GalNAc-MLP происходит снижение концентрации белка поверхностной оболочки HBV (HBsAg) на 90 % в течении 50 дней. К сожалению, клинические испытания нескольких препаратов на основе РВАЕ и мелитина для лечения заболеваний печени были прерваны из-за их высокой токсичности [340]. Следующее поколение препаратов от Arrowhead Pharmaceuticals - TRiM представляет собой конъюгат siРНК и N-ацетилгалактозамина, однако, конкретная структура препарата пока не разглашается (см. главу про конъюгаты siРНК и лигандов рецепторов) [280].

1.7 Конъюгаты siРНК в клинике

Onpattro (Патисиран) - является первым коммерчески доступным препаратом на основе siРНК, этот препарат был выпущен для лечения наследственной амилоидной полинейропатии в августе 2018 года компанией Alnylam Pharmaceuticals [341-343]. Onpattro представляет собой анти-*TTR* siРНК, содержащую несколько 2'-О-Ме модификаций, в комплексе с катионным липидом, фосфолипидом, холестерином и конъюгатом полиэтиленгликоля и липида. Его введение каждые 3 недели в течении 18 месяцев способствует значительному уменьшению симптомов болезни по сравнению с пациентами, принимавшими плацебо. Однако, тот факт, что его использование необходимо сочетать с кортикостероидами, ацетаминофеном и антигистаминами, является свидетельством провоспалительного эффекта липидов, используемых в составе Onpattro. Более того, побочные эффекты этого препарата включают покраснение, тошноту, боль в спине, животе и голове и затрудненное дыхание. Из-за этих причин следующие препараты в линейке разработок Alnylam Pharmaceuticals не включают в себя катионные липиды для

доставки, а представляют собой конъюгаты siРНК и N-ацетилгалактозамина [15]. На сегодняшний день таких препаратов шесть, из них три проходят третью стадию и три препарата вторую и первую стадии клинических испытаний [344]. При этом все эти конъюгаты обладают одинаковой структурой и химическими модификациями (2'О-Ме, 2'F и PS) и отличаются только последовательностями siРНК и паттернами химических модификаций. Последние разработки продуктов других компаний (Dicerna Pharmaceuticals, Arrowhead Pharmaceuticals, Silence Therapeutics), подавляющие экспрессию генов в гепатоцитах, также являются ковалентными конъюгатами siРНК и N-ацетилгалактозамина [319,345,346]. Таким образом, доставка siРНК в клетки печени считается решённой задачей, неосвещённые вопросы остаются только в поиске новых мишеней для siРНК и в дозе, необходимой для терапевтического эффекта [3,347]. Разработка систем доставки в другие органы является развивающейся областью, следующим органом, проблема доставки в который будет решена, будут, вероятно, почки [121].

1.8 Заключение

Введение остатков молекул природного происхождения в состав siРНК путём прямого конъюгирования с siРНК на сегодняшний день является наиболее практичной технологией доставки и в отличие от других подходов (вирусы, доставка с помощью катионных липидов и полимеров), преимуществами использования биоконъюгатов являются: специфичность их проникновения в клетки и отсутствие токсических эффектов [58]. Особенностью данного подхода является необходимость выбора подходящей модификации для конкретной задачи в силу специфичности взаимодействий лиганд-рецептор. С этой точки зрения, использование липофильных конъюгатов siРНК менее специфично, поскольку ЛПНП-рецепторы экспрессируются на высоком уровне клетками различных типов, однако является более выгодным, если в рамки поставленной задачи не входит доставка siРНК только в определённый тип клеток [277].

Использование терапевтических нуклеиновых кислот для лечения заболеваний, связанных с гемопоэтическими клетками является одной из наиболее важных задач, поскольку такие клетки считаются наиболее сложными для доставки в них siРНК и разработка систем доставки siРНК в данные клетки впоследствии может способствовать значительному увеличению эффективности антиретровирусной терапии и эффективности лечения опухолевых заболеваний, имеющих гемопоэтическое происхождение.

Систематическое исследование структурно-функциональных закономерностей свойств siРНК на одной модели может позволить разработать универсальную платформу

для создания препаратов на основе siРНК, поэтому исследования, направленные на изучение управления свойствами siРНК являются актуальными.

2. Материалы и методы

2.1 Материалы

2.1.1 Реактивы

В работе использовали: ксиленцианол («Serva», Германия); акриламид, N-N'-метиленбисакриламид, мочевины, персульфат аммония, ТЕМЕД, ЭДТА, «Stains-all», винбластин, мочевины, борную кислоту, LSM, флуоресцеинизотиоцианат изомер I (FITC I), трипсин, антибиотики (пенициллин, стрептомицин и амфотерицин), PBS («MP Biomedicals», США), N-гидроксисукцинимидный эфир Cyanine5.5, N-гидроксисукцинимидный эфир Cyanine7 («Люмипроб», Россия), сульфодихлорфеноловый эфир Alexa Fluor-488, буфер для лизиса RIPA («Thermo Fisher», США), Triton X-100 («PanReac AppliChem», США) трис, формамид, формальдегид, бромфенол, SDS, буфер для лизиса, моноклональные антитела мыши к Р-гликопротеину и β -актину человека («Sigma-Aldrich», США); среда для заморозки «Tissue-Tek O.C.T.» («Sacura Finetek», США), перегнанный этанол и ДМСО («Реахим», Россия); эмбриональная бычья сыворотка (FBS) («Hyclone», США), культуральные среды IMDM, RPMI, DMEM и Opti-Mem, трипсин, трансфекционный агент Липофектамин 2000 (далее по тексту, Липофектамин), обезжиренное сухое молоко, поликлональные антитела к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные со щелочной фосфатазой («Invitrogen», США); субстрат для пероксидазы хрена («Abscam», США) маркер молекулярного веса белка 10-250 кДа («Fermentas», США), мембрану Immobilon-P PVDF («Millipore», США). В работе использовали культуральный пластик фирмы «Costar» и «ТТР» (США).

2.1.2 Оборудование

ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе «Alliance» («Waters», США), используя колонку «Nova-Pak C – 18 4 мкм» 3.9x150 мм. В работе использовали инвертированный микроскоп Биолам П2-1 («ЛОМО», Россия); проточные цитофлуориметры «Cytomics FC500» («Beckman Coulter», США) и «Novocyte» («Acea Bioscience», США); прибор для электропереноса «Criterion Blotter» («Bio-Rad», США); спектрофотометр «BioMate 3» («Thermo», США). Также использовали вакуумную сушилку для гелей («Labconco», США), миксер «REAX top» (Heidolph, Германия), термостат «Бис» («ООО Бис-Н», Россия), центрифуги MiniSpin Plus Eppendorf 5453 R и 5810 R («Eppendorf», Германия), криотом «Microm HM 505N cryostat» («Microm», США), pH-метр («Orion 410A», США), амплификатор в режиме реального времени «iCyler iQ5» («Bio-Rad», США), счетчик клеток и анализатор их жизнеспособности «TC20» («Bio-Rad»,

США), мультиспектральный анализатор «Versadoc 4000 MP» («Bio-Rad», США) и систему флуоресцентной визуализации «In-Vivo MS FX PRO Imaging System» («Bruker», США). Фотографии гелей были сделаны с помощью системы для документации гелей «Bio-Vision» («Vilber Lourmat», Франция).

2.1.3 Олигорибонуклеотиды и siРНК, использованные в работе

Олигорибонуклеотиды (смысловые и антисмысловые цепи siРНК) были синтезированы в Лаборатории Химии РНК (ЛХР) ИХБФМ СО РАН фосфитамидным методом [348] на автоматическом синтезаторе. Для синтеза антисмысловых цепей siРНК, содержащих 3'-аминогексильный линкер, использовали 3'-PT-amino-modifier C6 CPG («GlenResearch», США). Выделение целевых продуктов проводили с помощью препаративного гель-электрофореза в 20 % полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях, с последующей элюцией продуктов 0.3 М раствором NaClO₄. Выделенные продукты обессоливали на картридже «Tet-Pac C18» фирмы «Waters» и осаждали 2 % раствором NaClO₄ в ацетоне. 3'-Холестериновые конъюгаты siРНК были получены с использованием модифицированного холестерина полимера [270], синтезированного по аналогии с [349,350]. Введение липофильных остатков на 5' конец проводили Н-фосфонатным методом, используя полимер-связанный олигонуклеотид и Н-фосфонаты липофильных соединений [351]. Выделение проводили методом гель-электрофореза в 20 % ПААГ в денатурирующих условиях, олигонуклеотиды элюировали 0.3 М раствором NaOAc (pH 4.8) с добавлением 0.1 % SDS и осаждали этанолом. Синтез и выделение проведено к.х.н. Мещаниновой М.И., последовательности siРНК приведены в таблице 3.

Таблица 3. siРНК, использованные в работе.

мРНК-мишень (по М14758)	siРНК ¹⁾	Последовательность ²⁾
557-577 н.	siDm	5' -GGCUUGACAAGUUGUAUAUGG-3' 3' -AACCGAACUGUUCAACAUAUA-5'
	X-siDm	5' -GGCUUGACAAGUUGUAUAUGG-3' X-3' -AACCGAACUGUUCAACAUAUA-5'
	siDm-3'Ch	5' -GGCUUGACAAGUUGUAUAUGG-3'-Ch 3' -AACCGAACUGUUCAACAUAUA-5'
	X-siDm-3'Ch	5' -GGCUUGACAAGUUGUAUAUGG-3'-Ch X-3' -AACCGAACUGUUCAACAUAUA-5'
	Ch(n)-siDm	Ch (n) -5' -GGCUUGACAAGUUGUAUAUGG-3' 3' -AACCGAACUGUUCAACAUAUA-5'
	R/X-siDm	R-5' -GGCUUGACAAGUUGUAUAUGG-3' X-3' -AACCGAACUGUUCAACAUAUA-5'

411-431	Ch6-siBm	Ch 6-5' -GCGCGAGGUCGGGAUGGAUCU-3' 3' -CUCGCGCUCCAGCCCUACC UA-5'
-	siSCRm	5' -CAAGUCUCGUAUGUAGUGGUU-3' 3' -UUGUUCAGAGCAUACAUCACC-5'
	Ch-siSCRm	Ch-5' -CAAGUCUCGUAUGUAGUGGUU-3' 3' -UUGUUCAGAGCAUACAUCACC-5'

¹⁾ R – остаток липофильной молекулы (остаток литохолевой кислоты, олеиламида литохолевой кислоты, α -токоферола или, холестерина), Ch – остаток холестерина, (n) – число метиленовых звеньев алифатического аминолинкера, соединяющего siРНК и липофильную молекулу (3, 6, 8, 10 или 12), X – флуорофор (Cy5.5, Cy7, Алекса 488 или флуоресцеин).

²⁾ C и U – 2'-О-метильные аналоги C и U соответственно.

Таблица 4. Растворы и буферы, использованные в работе.

Буфер L (2x)	4% SDS, 20% глицерин, 10% β -меркаптоэтанол, 0.004% бромфенол, 0.125 М Трис-НСl (рН 6.8)
Буфер LE (10x)	1.5 М NH ₄ Cl, 100 мМ NaHCO ₃ , 1 мМ ЭДТА (рН 7.5)
Буфер T	137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na ₂ HPO ₄ , 1.8 мМ, KH ₂ PO ₄ (рН 7.4), 0.25 % Triton X-100
Буфер TBE (20x)	0.9 М Трис-НСl (рН 8.3), 0.9 М H ₃ BO ₃ , 10 мМ ЭДТА
Буфер TGB (5x)	125 мМ Трис (рН 8.3), 1.25 М глицин, 0.5 % SDS
Буфер TS	47.9 мМ Трис (рН 8.3), 38.6 мМ глицин, 0.1 % SDS, 10 % этанол
Буфер W	137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na ₂ HPO ₄ , 1.8 мМ, KH ₂ PO ₄ (рН 7.4), 0.1 % Tween 20
Буфер А	30 мМ HEPES-КОН (рН 7.4), 100 мМ ацетат калия, 2 мМ ацетат магния
Раствор «Stains-All»	0.1 % «Stains-All» в 50 % формамиде
Раствор F	15 % Фиколл-400, 0.05 % бромфенол
Раствор M	8 М мочевины, 0.025 % бромфенол, 0.025 % ксиленцианол

2.1.4 Клеточные линии

HL60 (клетки промиелоцитарной лейкемии), K562 (клетки миелогенной лейкемии) MOLT-3 (клетки Т-лимфобластной лейкемии), KB-3-1 (цервикальная карцинома) были получены из банка клеточных культур Института Цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки линии KB-8-5 (цервикальная карцинома человека), обладающие фенотипом

множественной лекарственной устойчивости [352] и способные расти в присутствии 300 нМ винбластина, были любезно предоставлены профессором M. Gottesman (НИН, США). Клетки культивировали в среде DMEM или RPMI, содержащей 10 или 20 % FBS, антибиотики (100 ед./мл пенициллина, 0.1 мкг/мл стрептомицина) и антимикотик (0.25 мкг/мл амфотерицина), в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С. Клетки пересевали раз в 3-4 дня для поддержания экспоненциального роста. Для наблюдения за клетками использовали инвертированный микроскоп.

2.1.5 Лабораторные животные и опухолевые модели

В работе использовали 10-14-недельных мышей линии C57BL/6 разведения вивария ИХБФМ СО РАН и 6-8-недельных мышей линии SCID (SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}) разведения SPF вивария ИЦиГ СО РАН (идентификатор RFMEFI62114X0010). Животных содержали по 8 - 10 особей в клетке, мыши имели свободный доступ к еде и воде.

Для получения опухолевой модели 10⁶ клеток KB-8-5 в 100 мкл физраствора подкожно прививали в правый бок мышам линии SCID. Когда опухоли достигали объема 50-200 мм³, мышей случайным образом распределяли по экспериментальным или контрольным группам. Все операции с животными проводили в соответствии с ЕСС директивой 86/609/ЕЕС, протокол 22.11 был утверждён комиссией по биоэтике СО РАН.

2.2 Методы

2.2.1 Введение флуорофоров в siРНК

Присоединение флуоресцеина проводили в реакционной смеси объемом 150 мкл по аналогии с [353]. К 30 мкл 0.9 мМ антисмысловой цепи siDm с амиолинкером-С6 на 3'-конце, добавляли 7.5 мкл триэтиламина, 97.5 мкл свежеперегнанного ДМСО и 15 мкл свежеприготовленного 0.3 М FITC I в ДМСО, после чего смесь инкубировали при комнатной температуре 1 час при непрерывном перемешивании. По окончании реакции продукт осаждали добавлением 1/10 V реакционной смеси NaOAc (3 M), 4 V этанола (96 %) и инкубировали при -20 °С в течении ночи.

Конъюгирование AlexaFluor-488 (далее по тексту Алекса 488) проводили в реакционной смеси объемом 250 мкл. К 45 мкл антисмысловой цепи siDm с амиолинкером-С6 на 3'-конце, в концентрации 0.5 мМ добавляли 165 мкл тетрабората натрия (рН 8.5) и 40 мкл свежеприготовленного 10 мМ сульфодихлорфенолового эфира Алекса 488 в ДМСО, после чего смесь инкубировали при комнатной температуре 3 часа при непрерывном перемешивании. По окончании реакции продукт осаждали добавлением 1/10 V 3 M NaOAc, 4 V этанола (96 %) и инкубировали при -20 °С в течении ночи.

Конъюгаты выделяли с помощью ВЭЖХ в линейном градиенте ацетонитрила (0 - 30 %) в 50 мМ перхлорате лития. Скорость элюции составляла 1 мл/мин, спектр пиков записывали в диапазоне длин волн: 220-600 нм. После хроматографии, фракции, содержащие конъюгат, концентрировали в вакуумном концентраторе при 30°C и осаждали 2% перхлоратом лития в ацетоне. Осадок отделяли центрифугированием (13000 об./мин, 5 мин), промывали ацетоном, высушивали и растворяли в 20 мкл воды, хранили в темноте при -20°C. Анализ конъюгата проводили с помощью электрофореза в 20 % нативном ПААГ в стандартных условиях.

Конъюгирование N-гидроксисукцинимидных эфиров Cyanine5.5 и Cyanine7 с антисмысловой цепью siDm с амиолинкером-С6 и выделение продуктов реакции было проведено к.х.н. Мещаниновой М.И., в соответствии с протоколом фирмы-производителя в 0.1 М Трис (pH 8.4), выделение проводили методом гель-электрофореза в 20 % ПААГ в денатурирующих условиях.

2.2.2 Формирование дуплексов siРНК

Смесь, содержащую смысловой и антисмысловый олигорибонуклеотиды в эквимольной концентрации (200 мкМ) в буфере А, инкубировали при 85°C в течение 5 мин, после чего оставляли в остывающем выключенном термостате на 1 ч. Анализ полученных дуплексов проводили с помощью электрофореза в ПААГ в нативных условиях. Полученные дуплексы хранили при -20°C, для использования размораживали во льду.

2.2.3 Электрофоретическое разделение дуплексов в ПААГ в нативных условиях

Электрофорез проводили в 12 % ПААГ (соотношение акриламид: N,N,N',N'-метиленабисакриламид 30:1) в нативных условиях в буфере TBE×1 при напряженности электрического поля 10-15 В/см. Перед нанесением на гель к пробам добавляли 1/5 V раствора F. После разделения флуоресцентно-меченых siРНК гель фотографировали в УФ-свете, затем окрашивали раствором «Stains-all» в течение 15 мин, отмывали от красителя дистиллированной водой на свету. После этого гель высушивали и сканировали для получения изображения в цифровом формате.

2.2.4 Определение температуры плавления siРНК

Для определения температуры плавления siРНК дуплексов проводили их термическую денатурацию, используя прибор Cary-BioMelt-300 («Varian», США). Измерения были проведены к.ф.-м.н. Ломзовым А.А. (Лаборатория биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН). Для этого 2 мкМ раствор siРНК в буфере А нагревали в кювете,

соединенной с УФ детектором. Скорость нагрева составляла 0.5 °С/мин, диапазон температур 5-95 °С. Измерение оптической плотности проводили на длинах волн 260 и 270 нм. Значения температуры плавления siРНК соответствовали максимуму графиков первой производной интегральных кривых плавления.

2.2.5 Выделение моноцитарно-лимфоцитарной фракции из периферической крови человека

Периферическую кровь здорового донора, либо пациента с миелофиброзом с добавлением антикоагулянта – до концентрации 0.05 М ЭДТА (рН 8.0), разбавляли стерильным PBS в 4 раза. Разведенную кровь (5 мл) наслаивали на 2 мл среды для разделения лейкоцитов LSM с плотностью 1.077 – 1.080 г/мл и центрифугировали в течение 15 мин при 800 G. Белое кольцо лейкоцитов собирали пипеткой и переносили в чистую пробирку. Лейкоциты промывали 2 раза, для этого добавляли 5 мл среды IMDM без сыворотки и антибиотиков, ресуспендировали, центрифугировали 10 мин при 800 G, отбিরали супернатант и повторяли процедуру. Клетки высевали на чашки Петри и культивировали в среде IMDM с 10 % FBS, пенициллином (10 ед./мл), стрептомицином (100 мкг/мкл) и амфотерицином (0.25 мкг/мкл) (5% CO₂, 37 °С). Образцы периферической крови здоровых доноров были предоставлены лабораторией генной диагностики ЦНМТ. Образцы периферической крови пациентов были предоставлены городским гематологическим центром, г. Новосибирск.

2.2.6 Определение эффективности накопления холестеринаных производных siРНК в клетках с помощью проточной цитофлуориметрии

Клетки высевали на 48-луночные планшеты (KB-8-5 и KB-3-1 – за день до трансфекции, 5×10⁴ клеток/лунку, PBMC, HL60, K562, MOLT-3 - 2-4×10⁵ клеток/лунку) в ростовой среде (KB-8-5 и KB-3-1 – DMEM, PBMC – IMDM, HL60, K562, MOLT-3 - RPMI) и добавляли к ним холестеринные производные siРНК в Opti-Mem до конечной концентрации в лунке 0.2-5 мкМ, трансфекцию siРНК при помощи Липофектамина проводили в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Через 4 ч готовили препараты для анализа методом проточной цитофлуориметрии.

Для приготовления препаратов удаляли ростовую среду и дважды промывали клетки раствором PBS, после чего клетки снимали трипсином и переносили в 1.5 мл пробирки. После этого клетки осаждали центрифугированием при 200 G в течение 5 мин, удаляли супернатант и суспендировали осадок в PBS. Суспензию клеток вновь центрифугировали в течение 5 мин при 200 G, супернатант удаляли, суспендировали клетки в 250 мкл PBS и фиксировали клетки добавлением 250 мкл свежеприготовленного

4 % раствора формальдегида в PBS. Полученные данные анализировали на проточном цитофлуориметре, используя программное обеспечение «Cytomics FC 500 CXP» («Beckman Coulter», США) или Novocyte («ACEA Bioscience», США). Интенсивность флуоресценции клеток в RFU (относительные единицы флуоресценции) измеряли на длине волны возбуждения лазера 488 нм. Для каждого препарата проводили измерение 8000 клеток, количество Алекса 488-положительных клеток оценивали с помощью ФЭУ, оснащенного длинноволновым оптическим фильтром 530 ± 30 нм. За эффективность трансфекции принимали количество клеток (%), уровень флуоресценции которых превышал максимальный уровень автофлуоресценции клеток в контроле. Кроме того, оценивали средний уровень флуоресценции (в RFU) популяции клеток в образцах, трансфицированных siРНК, в качестве контроля использовали необработанные клетки.

2.2.7 Определение эффективности накопления холестеринowych производных siРНК в присутствии ингибиторов эндоцитоза

Клетки высевали на 48-луночные планшеты (КВ-3-1 – за день до трансфекции, 5×10^4 клеток/лунку, К562 - 4×10^5 клеток/лунку) и в ростовой среде с сывороткой, либо без неё добавляли ингибиторы эндоцитоза (хлоропромазин – 8 мкМ, монодансил кадаверин (МДК) – 40 мкМ, нистатин – 65 нМ и 5-(N-этил-N-изопропил) амилорид (EIPA) – 30 мкМ («Sigma», США). Через 30 минут к клеткам добавляли холестеринowych производные siРНК в Opti-Mem до конечной концентрации в лунке 1 мкМ. Через 4 ч готовили препараты для анализа методом проточной цитофлуориметрии (раздел 2.2.6).

2.2.8 Определение эффективности накопления холестеринowych производных siРНК в клетках с помощью stem loop ПЦР

За день до трансфекции клетки КВ-8-5 высевали на 48-луночные планшеты (5×10^4 клеток/лунку) в ростовой среде DMEM и добавляли к ним холестеринowych производные siРНК в Opti-Mem до конечной концентрации в лунке 1 мкМ. Через 4 часа клетки промывали PBS, ресуспендировали в буфере Т и нагревали до 95°C в течении 10 мин. После этого образцы охлаждали на льду (10 мин) и центрифугировали (10 мин, 4°C , 12000 G). Отобранный супернатант нагревали до 95°C (10 мин) и сразу добавляли в готовую смесь для ОТ ПЦР («Биолабмикс», Россия) из расчета 2 мкл супернатанта на 38 мкл мастермикса с использованием праймера 5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATT CGCACCAGAGCCAACTTGGCT-3'. Реакционную смесь инкубировали в течение 1 часа при температуре 42°C . Полученную кДНК использовали для проведения ПЦР в режиме реального времени, используя готовую смесь «HS-qPCR SYBR Blue» («Биолабмикс»,

Россия) и праймеры 5'-GTTGGGGATATACAACCTTGTCA-3' (прямой) и 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' (обратный) при помощи амплификатора в режиме реального времени «iCycler iQ5» («Bio-Rad», США). Нормировку проводили путём построения калибровочных кривых с использованием известного количества siРНК (10, 1 и 0.1 пмоль), добавляемых к такому же количеству клеток KB-8-5 как в пробах. Данные анализировали с помощью программного обеспечения Bio-RadiQ5 v.2.0.

2.2.9 Определение эффективности накопления холестеринаных производных siРНК в клетках крови с помощью проточной цитофлуориметрии *ex vivo*

К периферической крови человека с антикоагулянтom добавляли флуоресцентно меченые конъюгаты siРНК до конечной концентрации в лунке 2-5 мкМ. Трансфекцию неконъюгированной siРНК проводили при помощи Липофектамина в концентрации 0.2 мкМ в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Через 3.5 часа после начала трансфекции к клеткам добавляли конъюгаты антител и флуоресцентных красителей для идентификации различных популяций клеток (CD14-Phycoerythrin («Invitrogen», США), CD66-Phycoerythrin/Cy5, CD3-Phycoerythrin и CD19-Phycoerythrin («Abcam», США)). По истечению времени трансфекции (4 ч) эритроциты лизировали добавлением 40 объемов свежеприготовленного буфера LE в течении 7 мин, затем клетки центрифугировали (5 мин, 200 G), отмывали PBS и фиксировали 2 % раствором формальдегида в PBS. Далее проводили анализ флуоресценции методом проточной цитофлуориметрии (раздел 2.2.6) с использованием каналов флуоресценции 530±30 нм, 572±30 нм или 675±30 нм.

2.2.10 Исследование биологической активности анти-MDR1 siРНК методом Вестерн блот

2.2.10.1 Приготовление проб для исследования подавления синтеза Р-гликопротеина в клетках KB-8-5 с помощью анти-MDR1 siРНК методом Вестерн блота

Клетки KB-8-5 высевали в четыре 48-луночных планшета (в первый – по 12×10^3 клеток/лунку, во второй и третий – по 8×10^3 клеток/лунку, в четвертый – по 7.5×10^3 клеток/лунку) в среде DMEM с 10 % FBS. Через 24 ч ростовую среду заменяли на DMEM без сыворотки и добавляли к клеткам холестеринные производные siРНК до конечной концентрации в лунке 5 мкМ, как описано в п. 2.2.4. По истечению 4 ч в лунки добавляли 1/2 V среды DMEM с 30 % сывороткой. Клетки инкубировали в течение 3-8 дней. Оценку уровня Р-гликопротеина осуществляли через 3-8 суток. Клетки в первом и втором планшете через 3 и 4 суток промывали PBS, лизировали в 60 мкл буфера для лизиса L (1x), затем пробирки прогревали в течение 15 мин при 95 °С, после чего проводили

белковый электрофорез и Вестерн блот (раздел 2.2.10.3). 1/3 от всего количества клеток из третьего и четвертого планшетов через 5 и 6 суток пересаживали в новые 48-луночные планшеты для экспериментальных точек 7 и 8 суток соответственно. Оставшиеся клетки осаждали при 1000 об./мин в течение 10 мин, удаляли супернатант и готовили препараты для белкового фореа лизированием в 60 мкл буфера для лизиса L (1x) и прогреванием, как описано выше. Посаженные клетки экспериментальных точек 7 и 8 суток лизировали, как описано выше.

2.2.10.2 Приготовление проб для исследования подавления синтеза Р-гликопротеина в ксенографтной опухоли KB-8-5 с помощью холестерин-содержащих анти-MDR1 siРНК методом Вестерн блота

Мышам линии SCID с привитой опухолью KB-8-5 внутривенно вводили 10 мг/г холестерин-содержащей siРНК, через 3-8 дней после введения мышей умерщвляли, образцы опухоли (100 мг) гомогенизировали в буфере RIPA (300 мкл) с 1 мМ фенолметилсульфонил фторидом. Через 10 минут после гомогенизирования образцы центрифугировали при 10000 G в течении 10 минут, супернатант отбирали и хранили при -80°C. Затем пробы размораживали, для нанесения на гель к полученному лизату (10 мкл) добавляли буфер L (1x, 20 мкл), прогревали в течении 15 мин при 95°C и проводили белковый электрофорез и Вестерн блот (раздел 2.2.10.3).

2.2.10.3 Вестерн блот

Разделение белков осуществляли в 10 % ПААГ, содержащем додецилсульфат натрия, в присутствии буфера TGB (1x) в течении 1 часа (10 В/см). После электрофореза белки переносили на мембрану Immobilon-P PVDF в буфере TS с помощью мокрого электропереноса «Criterion Blotter». Для уменьшения неспецифического связывания мембрану после переноса инкубировали в течение 1 ч в 1 % обезжиренном сухом молоке, растворенном в буфере W. Мембраны, содержащие Р-гликопротеин и β-актин, инкубировали с первичными моноклональными антителами к Р-гликопротеину или β-актину в разбавлениях 1:900 и 1:6000, соответственно, в 1 % обезжиренном сухом молоке в буфере W в течение 18 ч при комнатной температуре. Мембрану отмывали 3 раза по 10 мин буфером W и инкубировали 1 час со вторичными поликлональными антителами кролика к иммуноглобулинам мыши, конъюгированными со пероксидазой хрена. По истечению времени инкубации мембрану отмывали 3 раза по 10 мин буфером W. Люменесцентную детекцию проводили с помощью готового раствора субстрата для пероксидазы хрена («Abcam», США) на приборе «Versadoc 4000 MP». Анализ

интенсивности полос определяли с помощью программы Gel Pro Analyser 4.0 («Media Cybernetics», США).

2.2.11 Определение динамики изменения концентрации siРНК и её холестерин-содержащих аналогов в крови мышей после внутривенного введения

После введения 0.5 мкг/г siРНК или её холестеринового производного в объеме 100 мкл в хвостовую вену мышей линии C57BL/6 проводили забор крови из ретроорбитального синуса через 5 минут, 2, 3 и 24 часа. Кровь центрифугировали (5 мин при 500 G), образцы плазмы разбавляли в 10 раз в буфере T, далее проводили выделение siРНК, как описано в разделе 2.2.7. Нормировку проводили путём построения калибровочных кривых с использованием одинакового объема отбираемой крови и известного количества siРНК (10, 1, 0.1 пмоль).

2.2.12 Конфокальная микроскопия.

Мышам линии SCID с привитой опухолью KB-8-5 проводили инъекции 1.7 мкг/г флуоресцентно меченой siРНК, через 24 часа после этого мышей умерщвляли, образцы органов замораживали в Tissue-Tek O.C.T. при помощи жидкого азота. Срезы (7 мкм) нарезали криотомом «Micom HM 505N cryostat» при -20°C и фиксировали при комнатной температуре в 2% параформальдегиде в течении 15 минут. Затем срезы окрашивали DAPI («Invitrogen», США) и Фаллоидин-TRITC («Sigma-Aldrich», США) по 10 минут с двумя промывками PBS между инкубациями. Окрашенные срезы покрывали раствором «Fluoromount/Plus» («Diagnostic BioSystems», США) и покровным стеклом. Визуализацию siРНК проводили при 20× увеличении на конфокальном микроскопе «LSM 750» («Carl Zeiss», Германия) в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>). Изображения обрабатывали с помощью программы «Zeiss LSM Image Browser» («Carl Zeiss», Германия).

2.2.13 Накопление siРНК и её холестерин-содержащих аналогов в костном мозге и спленоцитах мыши.

Мышам линии C57BL/6 проводили i.v. инъекции 9 мкг/г siРНК или её конъюгата с холестерином. Через 6 часов после этого животных подвергали эвтаназии методом дислокации шейных позвонков и проводили выделение костного мозга и спленоцитов. Для этого извлекали бедренные и большие берцовые кости. Концы костей удаляли, диафизы дважды промывали 3 мл буфера PBS. Клетки суспендировали, лизирование эритроцитов осуществляли, как описано в пункте 2.2.8, после этого готовили препараты и

анализировали их методом проточной цитофлуометрии как описано в пункте 2.2.6. Для получения спленоцитов извлекали селезенку и гомогенизировали её раздавливанием между стеклами. Гомогенат смывали со стекла 3-4 мл буфера PBS. Лизирование эритроцитов в клеточной суспензии осуществляли, как описано в разделе 2.2.8, после этого готовили препараты и анализировали их методом проточной цитофлуометрии как описано в разделе 2.2.6.

2.2.14 Исследование накопления siРНК и её холестерин-содержащих аналогов в клетках крови мыши

Мышам линии C57BL/6 внутривенно вводили 1.7 и 9 мкг/г флуоресцентно-меченой siРНК, через 0.5, 1 и 4 часа после инъекции у мышей отбирали кровь из ретроорбитального синуса. Популяции клеток окрашивали соответствующими антителами с флуоресцентными метками (CD11b-Phycoerythrin/Cy5 («Invitrogen», США), CD20-Phycoerythrin/Cy5 и CD3-Phycoerythrin («Abcam», США)) в течении 20 минут. Затем проводили лизирование эритроцитов (раздел 2.2.9) и анализ флуоресценции клеток методом проточной цитофлуометрии (раздел 2.2.6).

2.2.15 Исследование биораспределения siРНК с помощью мультиспектрального анализатора «In-Vivo MS FX PRO Imaging System»

Мышам линии SCID проводили i.v., i.p., i.m. или s.c. инъекции 1.7 мкг/г флуоресцентно меченой siРНК и через промежутки времени 5 мин, 2, 4 и 24 часа проводили визуализацию флуоресценции тела мыши. Для этого мышам i.p. вводили авертин (150 мкг/кг) и через 5 мин сканировали флуоресценцию при помощи мультиспектрального анализатора «In-Vivo MS FX PRO Imaging System». Через 24 часа после введения siРНК мышей умерщвляли, флуоресценцию органов анализировали при помощи мультиспектрального анализатора «In-Vivo MS FX PRO Imaging System».

2.2.16 Статистический анализ данных

Для получения статистически достоверных результатов экспериментальные точки повторяли минимум трехкратно, результаты измерений представляли в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (SD) или стандартная ошибка среднего (SEM), для оценки достоверности результатов использовали критерий Стьюдента.

3. Результаты и обсуждение

3.1 Липофильные производные селективно модифицированной анти-*MDR1* siРНК D-типа.

Повышенная экспрессия Р-гликопротеина в клетках опухолей является неблагоприятным прогностическим фактором в клинической практике и коррелирует с устойчивостью опухолей к лекарственным средствам [354]. Повышенная экспрессия Р-гликопротеина была обнаружена при различных опухолевых заболеваниях человека [355], причем нередко его экспрессия значительно повышается после одного или нескольких циклов химиотерапии. Особенно часто такая активация наблюдается при остром миелогенном лейкозе и лимфомах [356]. Даже достаточно низкий уровень Р-гликопротеина, который трудно обнаружить в опухолевой ткани, значительно влияет на чувствительность клеток к лекарствам. Несмотря на то, что за лекарственную устойчивость *in vivo* ответственны множественные механизмы [357], именно повышенная экспрессия Р-гликопротеина является наиболее частой причиной формирования МЛУ [358]. Клинические испытания низкомолекулярных специфических ингибиторов Р-гликопротеина последнего поколения (dofequidar, zosuquidar, tariquidar, elacridar или biricodar) показали, что они обладают цитотоксичностью и лишь незначительно улучшают эффективность лечения пациентов [358-360]. Поэтому создание специфических и нетоксичных агентов для подавления экспрессии гена *MDR1* на основе siРНК является важной задачей [361].

Ранее в нашей лаборатории был разработан алгоритм селективной модификации siРНК, который включает в себя защиту нуклеозочувствительных сайтов (UpG, UpA и CpA) путём введения 2'-О-метильных аналогов нуклеотидов с 3' стороны от легко расщепляемой связи [128]. Было показано, что siРНК D-типа (siD) направленная к району 557 – 577 н. мРНК гена *MDR1* (табл. 3) и её селективно модифицированный аналог, siDm, содержащий 2'-О-метильные звенья в нуклеозочувствительных сайтах способна эффективно ингибировать экспрессию данного гена в клетках KB-8-5 при трансфекции Липофектамином [362-364]. В качестве контролей специфичности действия были использованы siРНК - siSCR, не имеющей гомологии с мРНК человека, крысы или мыши (табл. 3). 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, а так же ингибировало экспрессию гена *MDR1* и восстанавливало чувствительность данных раковых клеток к винбластину [23,351]. Поэтому целью этой работы являлось

исследование влияния структуры холестеринаного конъюгата на биологическую активность и определение терапевтического потенциала выбранного конъюгата *in vivo*.

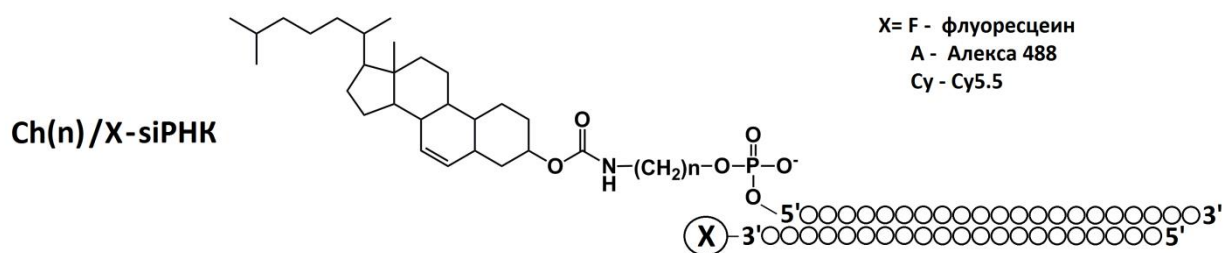


Рис. 8. Структура холестеринных производных siРНК, где (n) - число метиленовых звеньев (3, 6, 8, 10 или 12).

3.2. Исследование влияния структуры липофильных производных siРНК на их взаимодействие с клетками различного происхождения.

3.2.1. Исследование влияния длины линкера в составе холестеринных производных siРНК на их взаимодействие с клетками различного происхождения.

Ранее было установлено, что структура линкера в составе холестеринных производных siРНК, в частности, его длина, влияет на эффективность накопления конъюгатов в клетках и, как следствие, биологическую активность siРНК [351]. Так конъюгат siРНК и холестерина с линкером 12 метиленовых звеньев (Ch12-siРНК) наиболее эффективно накапливался в клетках KB-8-5, но проявлял меньшую биологическую активность, чем конъюгаты, содержащие линкеры 6 (Ch6-siРНК) и 3 (Ch3-siРНК) метиленовых звеньев. Было выдвинуто предположение, что холестеринные производные, содержащие линкер длиной 8 или 10 метиленовых звеньев (Ch8-siРНК и Ch10-siРНК, соответственно) могут обладать более эффективным накоплением и биологической активностью, чем конъюгат Ch6-siРНК или Ch12-siРНК. Поэтому была поставлена задача исследовать накопление и биологическую активность холестеринных конъюгатов siРНК, содержащих линкеры длиной 8 или 10 метиленовых звеньев и сравнить эффективность их накопления и ингибирующего действия их с конъюгатами Ch6-siРНК и Ch12-siРНК. Для этого Н-фосфонатным методом проводили введение холестерина на 5' конец смысловой цепи siDm, используя полимер-связанный олигонуклеотид и Н-фосфонаты холестерина [351]. Все конъюгаты siРНК и холестерина были синтезированы к.х.н. Мещаниновой М.И. и к.х.н. Довыденко И.С. (Ch8-siРНК и Ch10-siРНК) в ЛХР ИХБФМ СО РАН.

3.2.1.1. Исследование влияния длины линкера в составе холестеринowych производных siРНК на их накопление в клетках различного происхождения *in vitro*.

На первом этапе мы исследовали влияния длины линкера в составе флуорофор-меченых аналогов холестеринowych 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) холестеринowych производных siРНК проводили методом проточной цитофлуорометрии, основанном на детекции эмиссии и светорассеяния клеток при облучении их лазером в коротковолновой области излучения. Данный метод позволяет проводить количественную оценку интенсивности флуоресценции клеток в образце. Эффективность накопления производных siРНК оценивали с помощью двух параметров: доли трансфецированных клеток (в %) – той доли клеток, уровень флуоресценции которых превышал автофлуоресценцию контроля (клетки, необработанные конъюгатами), в качестве второго параметра определяли средний уровень интенсивности всей популяции клеток флуоресценции в относительных единицах флуоресценции (RFU).

Конъюгаты добавляли к клеткам до конечной концентрации 0.2-5 мкМ. Трансфекцию неконъюгированной siРНК проводили при помощи Липофектамина в концентрации 0.2 мкМ для того, что бы сохранить рекомендуемое производителем соотношение количества Липофектамина и siРНК для эффективного образования комплексов, поскольку более высокая концентрация Липофектамина была бы токсична для клеток. Время инкубации siРНК с клетками (4 ч) было выбрано исходя из ранее полученных нами данных [351]. В ходе работы нами было показано, что все исследованные холестеринowych конъюгаты эффективно накапливались в клетках: при концентрации 1 мкМ эффективность трансфекции составляла 100 %, тогда как немодифицированная siРНК не проникала в клетки без Липофектамина (рис. 8 А). При анализе среднего уровня интенсивности флуоресценции было показано, что эффективность накопления конъюгатов, содержащих линкеры длиной 8, 10 и 12 метиленовых звеньев, во всех клетках была выше по сравнению с конъюгатом, содержащим линкер длиной 6 метиленовых звеньев (Рис. 8 А, В, Д). Тенденция увеличения эффективности накопления при увеличении длины линкера сохранялась для всех клеточных линий: 9, 14, 18, 18 RFU (KB-8-5) и 67, 71, 65, 101 RFU (K562) для

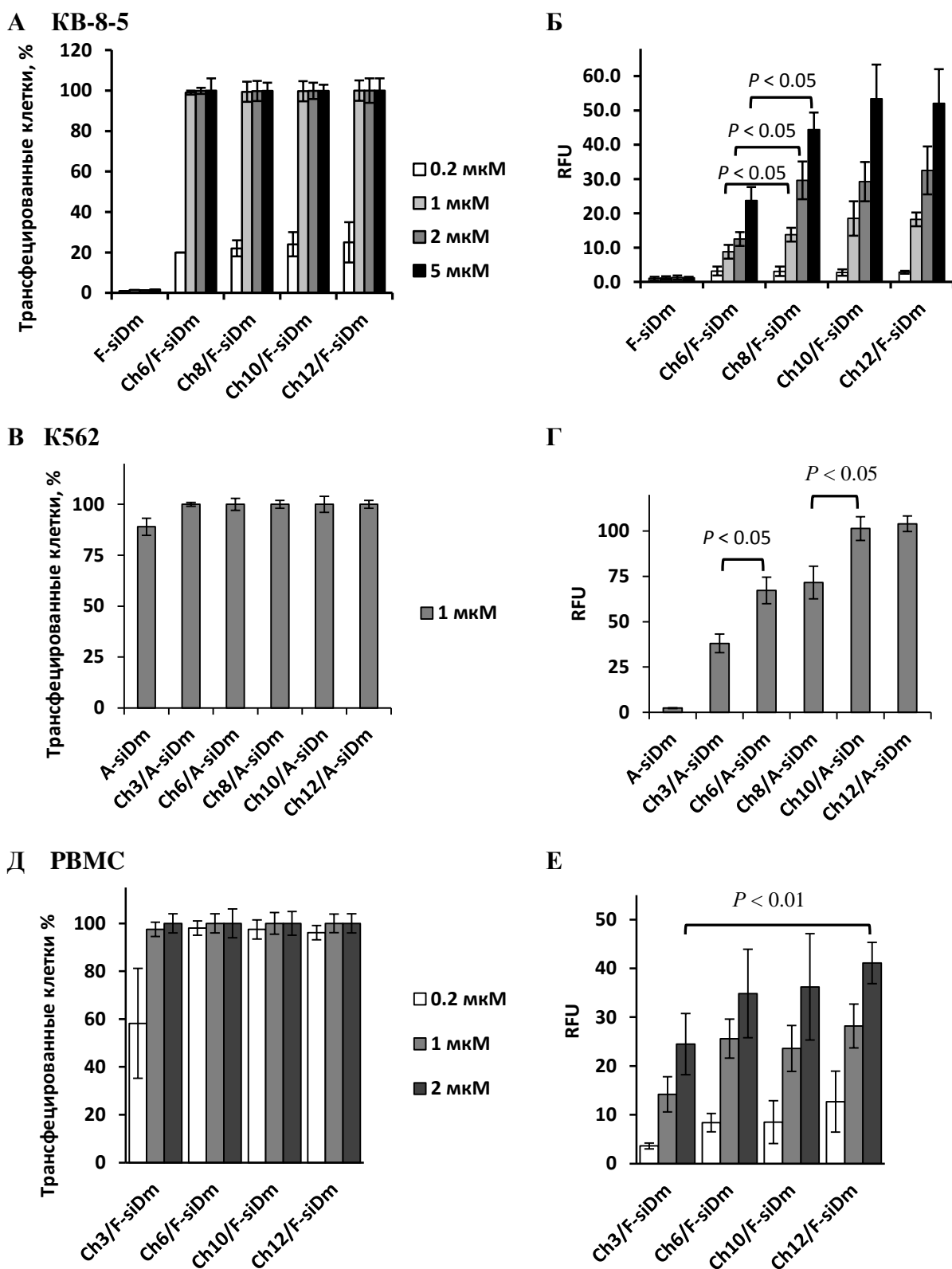


Рис. 9. Накопление флуорофор-меченых холестериновых производных siRNA, содержащих линкеры различной длины в клетках KB-8-5 (А, Б), K562 (В, Г) и РВМС (Д, Е). Исследования проводили при помощи проточной цитофлуориметрии, в каждом образце анализировали 10,000 клеток. Средние значения (\pm SD), рассчитанные по результатам трёх независимых экспериментов и статистическая значимость (P) приведены на рисунке.

холестериновых конъюгатов с линкером длиной 6, 8, 10 и 12 метиленовых звеньев, соответственно и 24, 35, 36, 41 RFU (РВМС) для конъюгатов с линкером длиной 3, 6, 10 и 12 атомов углерода, соответственно (рис. 9 Б, Г, Е). Однако, характер увеличения накопления конъюгатов в разных типах клеток отличался: так в клетках KB-8-5 значительное увеличение накопления происходило при увеличении линкера с 6 до 8 метиленовых звеньев ($p < 0.05$ при сравнении Ch6/F-siDm и Ch8/F-siDm, рис. 9 Б), а в клетках K562 значительное увеличение накопления происходило при увеличении линкера с 3 до 6 и с 8 до 10 ($p < 0.05$ при сравнении Ch3/A-siDm с Ch6/A-siDm и Ch8/A-siDm с Ch10/A-siDm рис. 9 Г). Более плавное увеличение накопления холестеринowego конъюгата наблюдается в клетках РВМС, достоверные отличия в эффективности накопления были найдены только между конъюгатами, содержащими 3 и 12 метиленовых звеньев ($p < 0.01$ при сравнении Ch3/F-siDm с Ch12/F-siDm, рис. 9 Е).

В связи с тем, что при исследовании этих клеточных линий РВМС и KB-8-5 использовались отличающиеся настройки напряжений и коэффициентов усиления флуоресценции, показатели общей интенсивности флуоресценции сравнивать некорректно, в случае клеток K562 использовались не флуоресцеин, а Алекса 488-меченые аналоги холестеринowych конъюгатов, поэтому абсолютные значения флуоресценции этих клеток так же сравнивать нельзя.

Таким образом, для каждой клеточной линии мы наблюдали различные зависимости увеличения эффективности накопления конъюгатов при увеличении длины линкера. Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными в нашей лаборатории ранее [23]. Липофильная природа холестерина позволяет предположить, что механизм проникновения холестеринowych производных siРНК в клетки на первом этапе включает «заякоревание» конъюгатов в мембране [263], поэтому увеличение длины линкера, может облегчать этот процесс, за счет увеличения расстояния между отрицательно заряженной siРНК и остатком холестерина.

3.2.1.2. Исследование влияния длины линкера в составе холестеринowych производных siРНК на их накопление в клетках крови *ex vivo*.

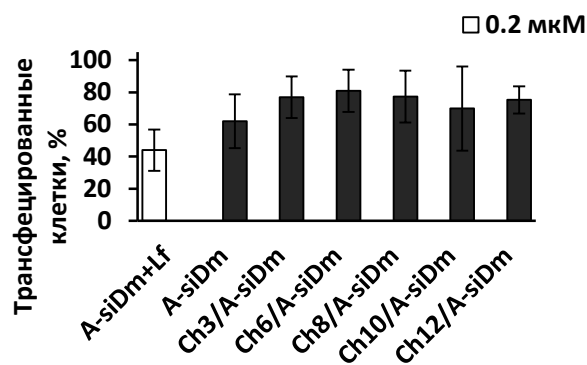
Для того, чтобы оценить влияние сыворотки и электролитов плазмы на накопление холестеринowych производных siРНК в клетках крови проводилась инкубация конъюгатов с цельной кровью здорового донора и цельной кровью пациента с хроническим миелоидным лейкозом *ex vivo* (рис. 10, 11). Для этого к отобранной у донора крови, содержащей антикоагулянт, добавляли конъюгаты siРНК и холестерина до конечной

концентрации 5 мкМ, чтобы сравнить эффективность накопления конъюгатов с ранее полученными результатами было выбрано время инкубации 4 ч.

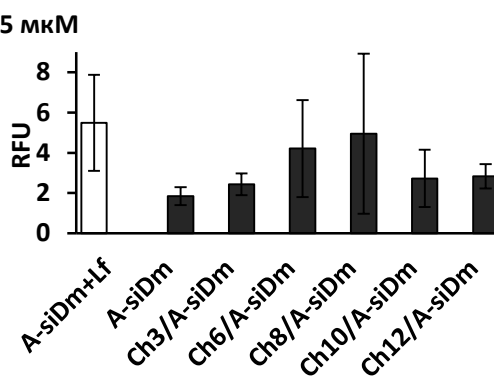
Показано, что доля трансфицированных клеток после их инкубации в течении 4 ч с 5 мкМ холестерин-содержащими siРНК составила 70-80 %, что превышает это значение для неконъюгированной siРНК (62 %), а также превышает количество клеток, трансфицированных неконъюгированной siРНК при помощи Липофектамина (44 %) (рис. 10 А). Анализ средней интенсивности флуоресценции клеток показал, что накопление холестериновых конъюгатов зависит от длины линкера, соединяющего холестерин с siРНК (рис. 10 Б). При этом, конъюгат с линкером 8 метиленовых звеньев показал наиболее эффективное накопление в клетках крови, значение RFU составило 4.95, что превышает значение RFU для других исследованных производных siРНК (2.44-4.21 RFU). Неконъюгированная siРНК накапливалась с наименьшей эффективностью (1.86 RFU, только в 5 раз выше контроля).

Поскольку количество siРНК, доставленной в клетки при помощи Липофектамина, оцениваемое по средней интенсивности флуоресценции клеток, сопоставимо с количеством Ch8/A-siDm, доставленной в клетках без помощи носителя (5.5 и 4.95 RFU, соответственно), а доля трансфицированных клеток в случае Ch8/A-siDm превышает таковое значение для siРНК доставляемой Липофектаминам (77 и 44 %, соответственно), возник вопрос о том, в каких клетках происходит наиболее эффективное накопление siРНК при доставке в составе конъюгата с холестерином или при помощи Липофектамина. Для разделения лейкоцитов крови на индивидуальные популяции клеток (лимфоциты, нейтрофилы, моноциты и макрофаги) к крови использовали соответствующие антитела с флуоресцентными метками. Данные показали, что накопление siРНК для всех типов доставки уменьшается в ряду: моноциты и макрофаги > нейтрофилы > лимфоциты (рис. 10). Наиболее эффективное накопление во всех популяциях наблюдается при использовании холестериновых конъюгатов siРНК, при этом в нейтрофилах, моноцитах и макрофагах эффективнее всего накапливается Ch8/A-siDm, а в лимфоцитах – Ch6/A-siDm (рис. 10 Г, Д, Е, Ж, З). Наименьшая эффективность накопления siРНК во всех популяциях клеток наблюдается при её трансфекции Липофектаминам. Однако, следует отметить, что siРНК, доставляемая при помощи Липофектамина была использована в концентрации 0.2 мкМ из за ограничений, накладываемых токсичностью трансфекционного агента. Доля трансфицированных клеток во всех популяциях после инкубации с неконъюгированной siРНК в свободном виде (5 мкМ) была выше, чем при её доставке Липофектаминам (0.2 мкМ) (рис. 10 В, Д, Ж).

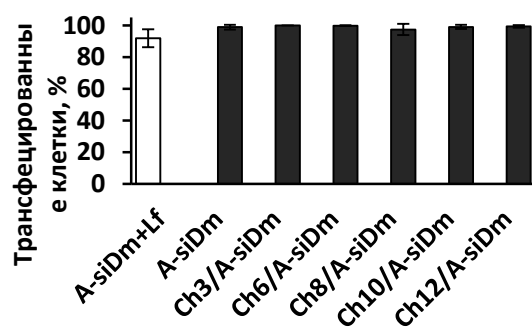
А Клетки крови здорового донора



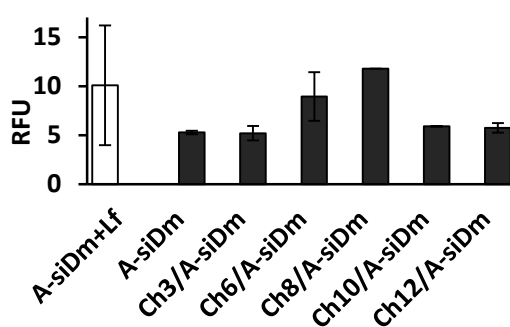
Б



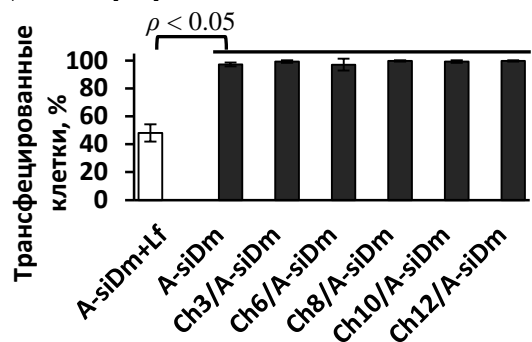
В Моноциты и макрофаги



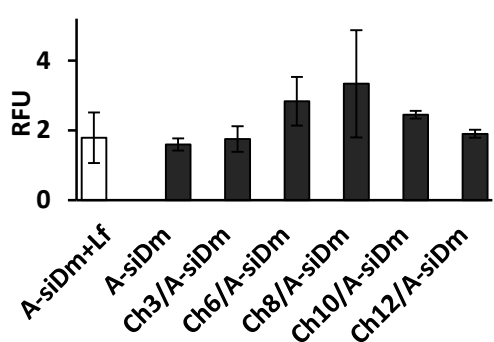
Г



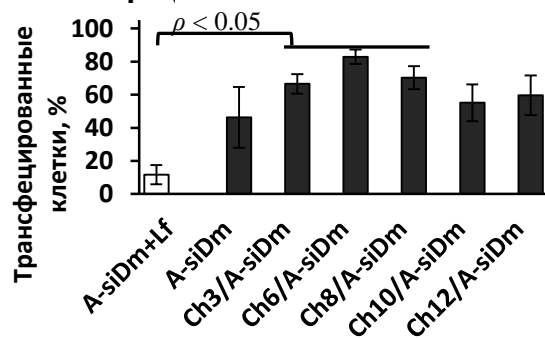
Д Нейтрофилы



Е



Ж Лимфоциты



З

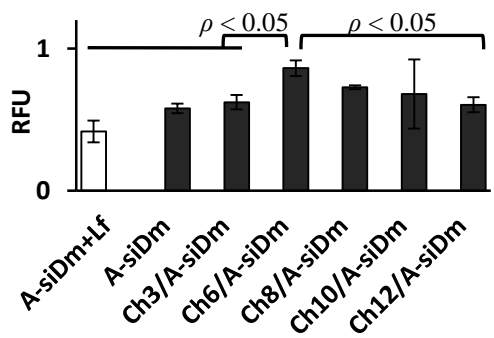
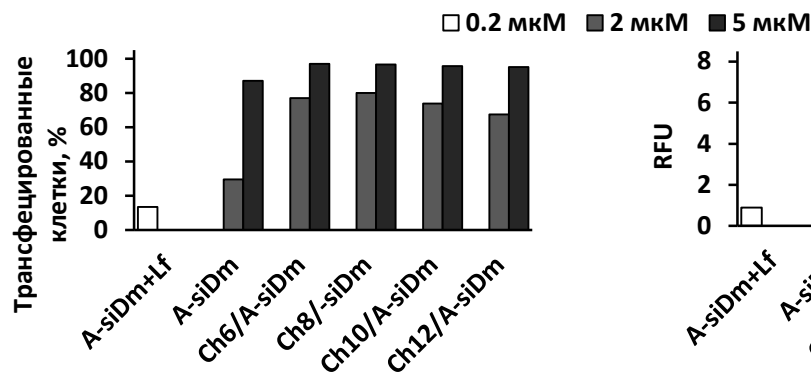


Рис. 10. Накопление Алекса 488-меченых холестериновых производных siPHK, содержащих линкеры различной длины в клетках в составе цельной крови здорового донора. Доля трансфицированных клеток (А, В, Д и Ж) и средняя интенсивность флуоресценции (RFU) (Б, Г, Е и З) после инкубации цельной крови пациента с соответствующими siPHK. Все клетки после лизиса эритроцитов (А и Б), моноциты и макрофаги (В и Г), нейтрофилы (Д и Е) и лимфоциты (Ж и З) приведены на рисунке. Исследования проводили при помощи проточной цитофлуорометрии, в каждом образце анализировали 10,000 клеток (FC 500). Средние значения (\pm SD), рассчитанные по результатам трёх независимых экспериментов приведены на рисунке.

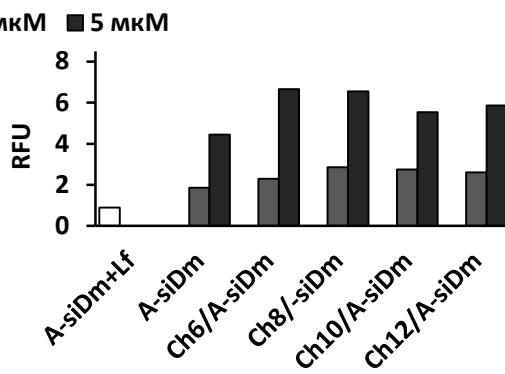
Таким образом, оптимальным способом доставки siРНК в моноциты, макрофаги и нейтрофилы является конъюгирование siРНК с холестерином линкером, содержащим 8 метиленовых звеньев, а для доставки в лимфоциты - линкером с 6 метиленовыми звеньями. Вероятно, в условиях *ex vivo* из-за наличия компонентов сыворотки 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. Поскольку комплексы siРНК с Липофектаминоном, обладают размерами 150-200 нм и положительным зарядом, клетки, обладающие фагоцитарной активностью, такие как нейтрофилы, моноциты и макрофаги способны их захватывать, обеспечивая эффективное накопление (рис. 10 В, Г, Д, Е), поэтому, для доставки в эти типы клеток образование комплексов с катионными липидами может рассматриваться как один из перспективных методов.

Исследование влияния длины линкера в составе холестериновых производных siРНК на эффективность их накопления было проведено в клетках цельной крови пациента с хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ). Этот тип заболеваний выбрали потому, что синдром МЛУ часто встречается при гемобластозах, а эффективные трансфекционные агенты для доставки нуклеиновых кислот в эти клетки отсутствуют. В экспериментах использовали конъюгаты siРНК и холестерина, соединённые алифатическим амиолинкером длиной 6, 8, 10 и 12 метиленовых звеньев. В ходе работы было показано, что доля трансфицированных клеток, сопоставима со значением, определенным для клеток крови здорового донора (рис. 10 А, В, Д, Ж, 11 А, В, Д, Ж). Конъюгаты siРНК и холестерина эффективно накапливались в клетках уже при концентрации 2 мкМ (42-100%), при концентрации 5 мкМ доля трансфицированных клеток возрастала (95-100%). При этом средняя интенсивность флуоресценции для всех популяций клеток пациента была почти в 2 раза выше, чем клеток крови здорового донора (рис. 10 Б, Г, Е, З, 11 Б, Г, Е, З). Среди исследованных конъюгатов наибольшей эффективностью накопления в клетках обладали Ch8/A-siDm и Ch6/A-siDm. Неконъюгированная siРНК без Липофектамина накапливалась в клетках с меньшей интенсивностью, чем холестерин-содержащие siРНК, а при концентрации 2 мкМ практически не попадала в лимфоциты - доля трансфицированных клеток составила 6% (рис. 11 В, Д, Ж). Неконъюгированная siРНК, трансфицированная Липофектаминоном накапливалась только в моноцитах и макрофагах и, относительно клеток крови здорового пациента, общее количество siРНК в этих клетках было меньше в 2.5 раза (10 и 3.9 RFU, соответственно, рис. 10 Г, 11 Г). Увеличенное количество нейтрофилов у пациента является следствием пролиферации опухолевого клона, при этом доля

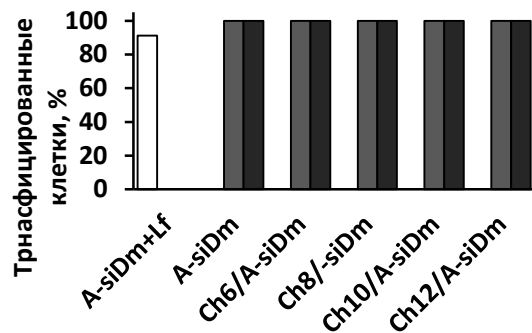
А Клетки крови пациента с ХМЛ



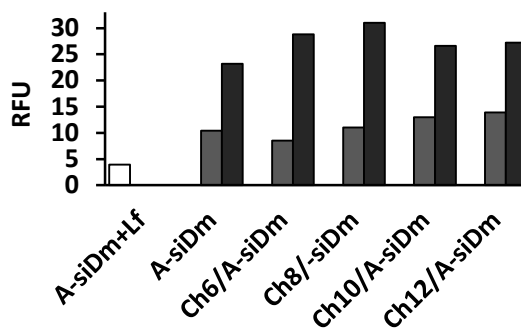
Б



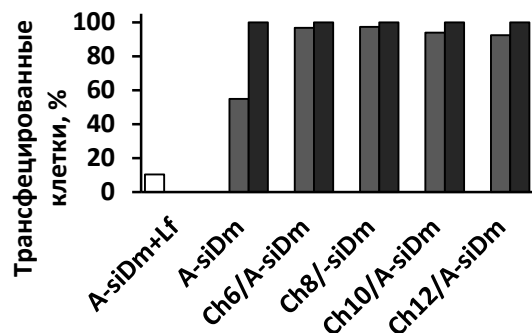
Д Моноциты и макрофаги



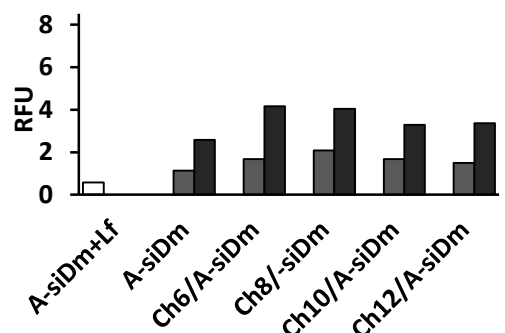
Е



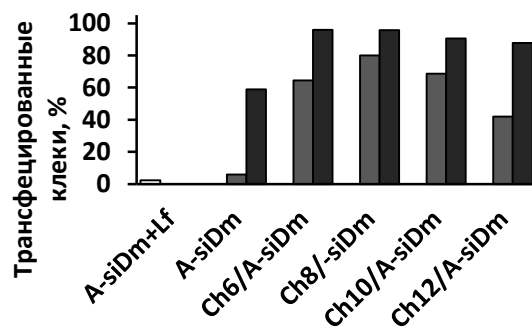
В Нейтрофилы



Г



Ж Лимфоциты



З

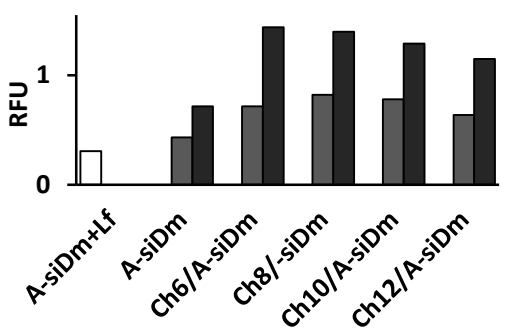


Рис. 11. Накопление Алекса-488-меченых холестеринных производных siPHK, содержащих линкеры различной длины в клетках в составе цельной крови пациента с хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ). Доля трансфецированных клеток (**А**, **В**, **Д** и **Ж**) и средняя интенсивность флуоресценции (RFU) (**Б**, **Г**, **Е** и **З**) после инкубации цельной крови пациента с соответствующими siPHK. Все клетки (**А** и **Б**) моноциты и макрофаги (**В** и **Г**), нейтрофилы (**Д** и **Е**), и лимфоциты (**Ж** и **З**) приведены на рисунке. Исследования проводили при помощи проточной цитофлуорометрии (FC500), в каждом образце анализировали 10,000 клеток.

содержащий три метиленовых звена, с образованием фосфодиэфирной связи с 5'-концевым фосфатом олигорибонуклеотида, поскольку такой тип конъюгатов наиболее просто синтезировать. Конъюгаты siРНК и липофильных молекул были синтезированы в лаборатории Химии РНК (ЛХР) ИХБФМ СО РАН. Алекса-488-меченые производные siРНК содержащие липофильную молекулу (рис. 12) добавляли к РВМС человека (1-5 мкМ) и оценивали эффективность накопления конъюгатов методом проточной цитофлуометрии. 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 доставляемой при помощи Липофектамина

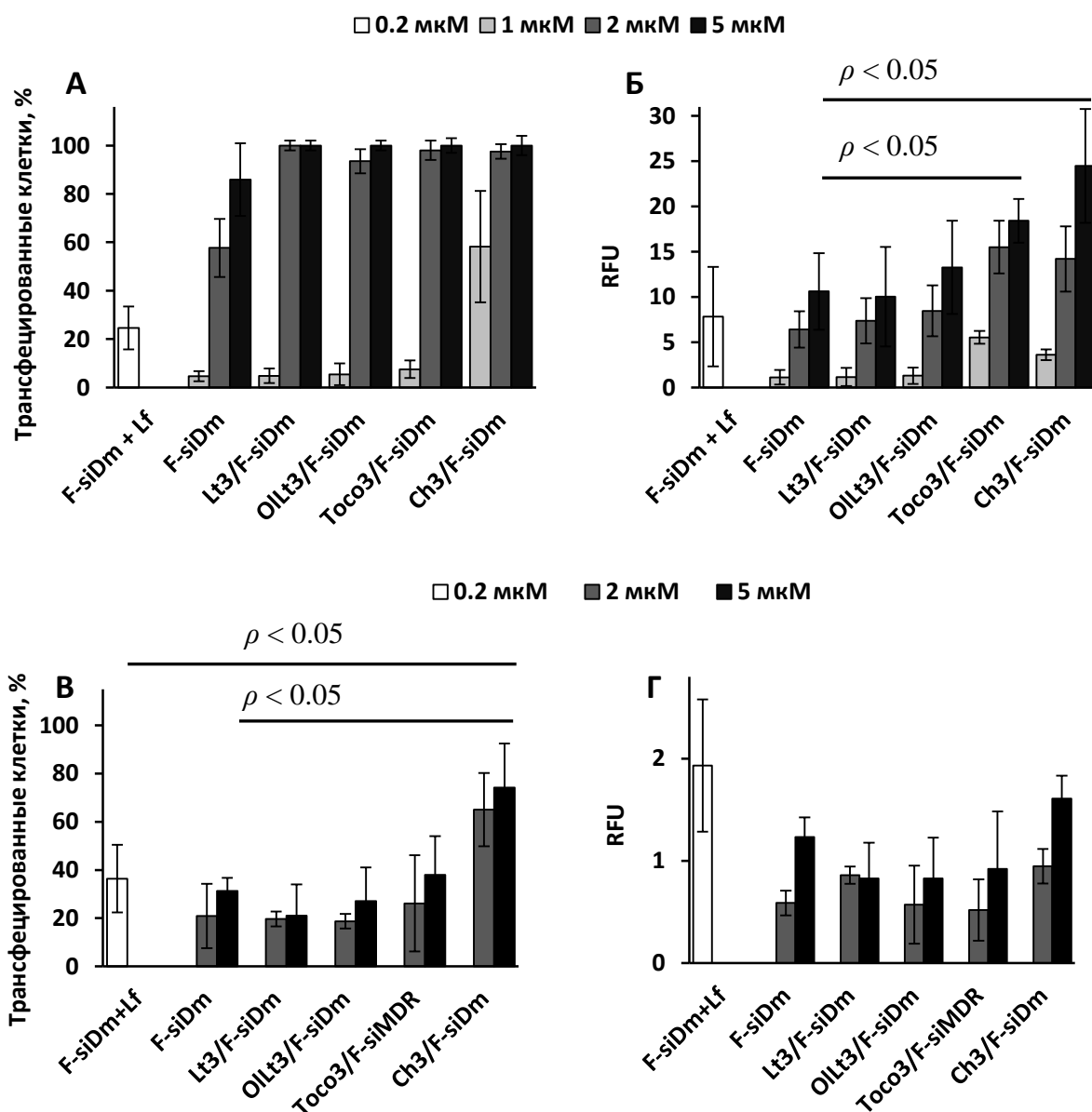


Рис. 13. Накопление флуоресцентно меченых аналогов липофильных производных siРНК в клетках РВМС (А, Б) и клетках цельной крови человека (В, Г). Доля трансфицированных клеток (А, В) и средние значения флуоресценции популяции клеток (Б, Г) представлены на рисунке.

(рис. 13 А). При концентрации 1 мкМ наибольшая эффективность трансфекции была достигнута при использовании конъюгата siРНК и холестерина (58 %) (рис. 13 А), для остальных исследованных конъюгатов доля трансфицированных клеток варьировала от 5 до 7.5 %. При этом эффективность накопления липофильных производных siРНК в клетках РВМС увеличивалась в 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. 13 Б).

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. 13 В). Оценка средней интенсивности флуоресценции трансфицированных клеток показала, что данное значение для неконъюгированной siРНК, доставляемой при помощи Липофектамина, было выше, чем у клеток обработанных конъюгатами (рис. 13 Г). Однако, поскольку доля трансфицированных клеток для siРНК доставляемой при помощи Липофектамина меньше, чем для липофильных конъюгатов, высокая интенсивность флуоресценции siРНК доставляемой Липофектамином обеспечивается в основном поглощением её макрофагами и моноцитами (раздел 3.2.1, рис. 10 Г).

Для доставки siРНК в РВМС в экспериментальных условиях в основном используют катионные липиды и полимеры, которые характеризуются низкой эффективностью *in vivo* и зачастую проявляют токсическое действие [365]. В качестве альтернативного способа доставки, было предложено конъюгировать субстрат Дайсера (DsiРНК) с CpG-содержащим олигодезоксирибонуклеотидом, обеспечивающий выход DsiРНК из эндосом в цитоплазму клетки. Конъюгирование с CpG-содержащими олигодезоксирибонуклеотидами приводит к повышению накопления DsiРНК в клетках, экспрессирующих TLR9 рецептор, который специфически распознаёт и связывает данный CpG мотив, при этом, в других типах клеток наблюдается лишь небольшое неспецифическое накопление такого конъюгата [335]. Таким образом, из-за повышенной экспрессии TLR9 рецептора конъюгат DsiРНК и CpG эффективно накапливается в таких клетках крови, как В-лимфоциты, дендритные клетки и макрофаги [336]. Однако, в отличие от холестерин-содержащей siРНК введение CpG олигонуклеотидов *in vivo* приводит к активации систем врожденного иммунитета и продукции цитокинов и интерферонов, поэтому их применение ограничено.

Из полученных нами данных видно, что взаимодействие с 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.

3.2.3. Исследование накопления холестеринового производного siРНК в опухолевых клетках гемопоэтического происхождения.

Ранее мы показали, что конъюгат siРНК и холестерина, содержащий линкер 6 метиленовых звеньев эффективнее, чем остальные конъюгаты накапливается *ex vivo* в наиболее сложных для трансфекции клеток - в лимфоцитах крови человека. Поэтому была поставлена задача оценить способность этого конъюгата накапливаться в опухолевых клетках гемопоэтического происхождения: HL60, K562, MOLT-3, РВМС здорового донора и РВМС пациента с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ). Выбор именно этих клеточных линий был обусловлен тем, что они представляют основные виды лейкемии: клетки промиелоцитарной лейкемии HL60 - острый миелоидный лейкоз, клетки миелогенной лейкемии K562 - хронический миелоидный лейкоз, клетки Т-лимфобластной лейкемии MOLT-3 - острый лимфолейкоз. В ходе работы нами было показано, Alexa-488-меченый аналог конъюгата, (Ch6/A-siDm) эффективно накапливается во всех гемопоэтических клетках - при концентрации 1 мкМ эффективность трансфекции составляла 100 % (рис. 14 А, Б, В, Г, Д). При этом неконъюгированная siРНК как в комплексе с Липофектаминол (0.2 мкМ) так и в свободном виде (1 мкМ) также эффективно проникала во все культивируемые линии клеток, но не в РВМС (рис. 10 А, Б, В, Г, Д). Однако, при анализе среднего уровня интенсивности флуоресценции было показано, что эффективность накопления холестерин-содержащего конъюгата во всех исследованных типах клеток в 25-80 и 2.5-45 раз выше, чем эффективность накопления неконъюгированной siРНК в свободном виде и в комплексе с Липофектаминол, соответственно (рис. 14 Е, Ж, З, И, К). Таким образом, исследованная нами холестерин-содержащая siРНК эффективно накапливается в основных типах лейкозных клеток *in vitro*.

Было показано, что все клеточные линии накапливали больше Ch6/A-siDm (45-76 RFU), чем первичные культуры (26-34 RFU) (рис. 14 Е, Ж, З, И, К). Данные отличия могут быть связаны как с тем, что все исследованные клеточные линии представлены клетками с

большими размерами, чем первичные культуры, являются быстро делящимися клетками и могут отличаться различной интенсивностью процесса эндоцитоза. Ранее, в разделе 3.2.1. нами было показано, что клетки миелогенного происхождения, такие как нейтрофилы, макрофаги и моноциты, обладающие способностью к активному фагоцитозу, эффективнее накапливают как Ch6/A-siDm, так и A-siDm в свободном виде и в комплексе с Липофектамином (рис. 10, 11). При этом, лимфоциты эффективно накапливали только холестерин-содержащие siРНК (рис. 10 Ж 3, 11 Ж 3). Однако, в отличие от РВМС, лейкозные клетки K562 миелогенного происхождения, а так же клетки MOLT-3 лимфоидного происхождения эффективно накапливают A-siDm в комплексе с Липофектамином (25 и 10 RFU, соответственно). Возможно, что опухолевая трансформация, увеличенные размеры или изменения, возникшие в процессе перехода от первичной культуры к культивируемой клеточной линии привели к увеличенной эффективности накопления siРНК в комплексе с Липофектамином в клетках MOLT-3.

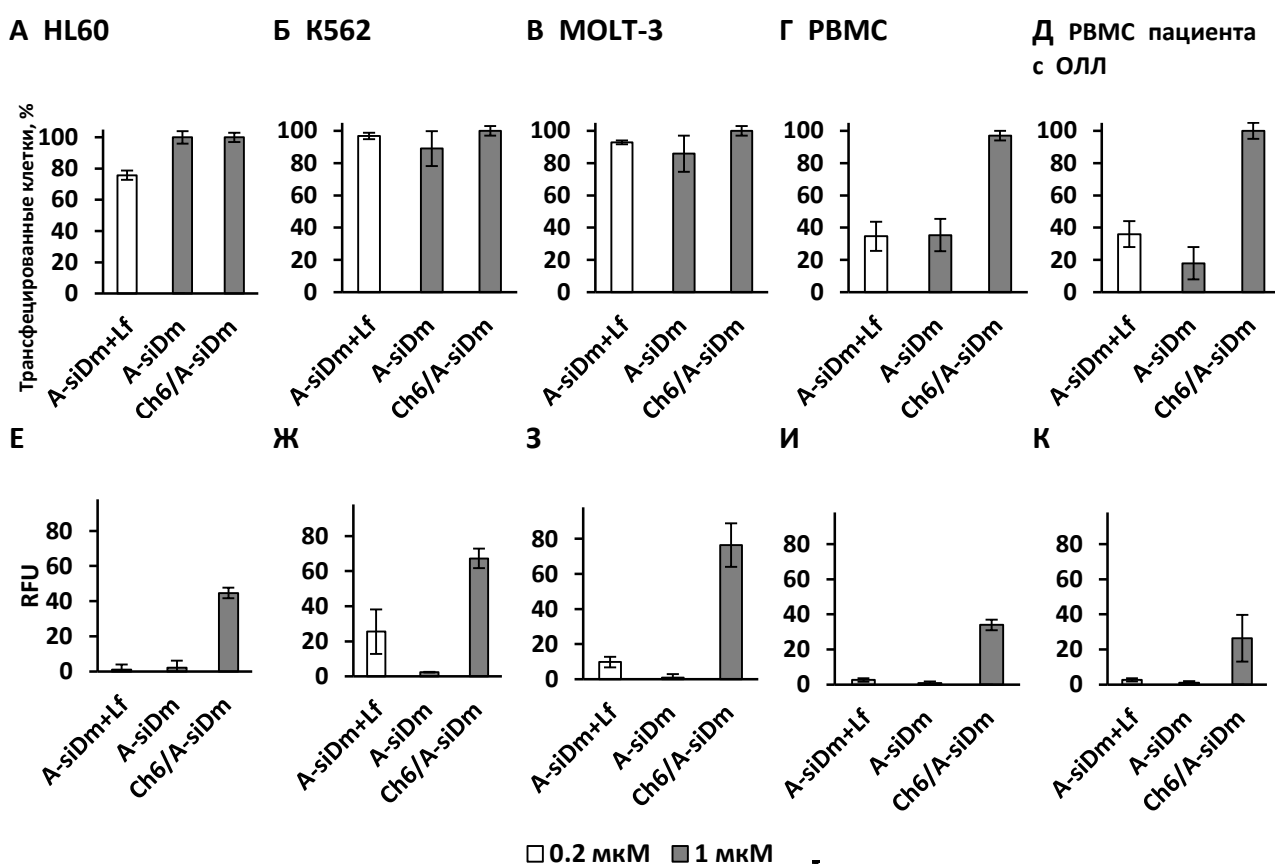


Рис. 14. Накопление Алекса-488-меченой siРНК и её холестеринового конъюгата в клетках HL-60 (А, Е), K562 (Б, Ж), MOLT-3 (В, З), РВМС здорового донора (Г, И), РВМС пациента с острым лимфолейкозом (Д, К). Исследования проводили при помощи проточной цитофлуорометрии (FC 500), в каждом образце анализировали 10,000 клеток. Средние значения (\pm SD), рассчитанные по результатам трёх независимых экспериментов приведены на рисунке.

Интересно, что как Ch6/A-siDm, так и A-siDm в комплексе с Липофектамином накапливаются в 3 раза более эффективно в клетках MOLT-3 (ОЛЛ) по сравнению с клетками первичной культуры, полученной от пациента с ОЛЛ (рис. 14 З, К). Вероятно, существуют особенности эндоцитоза клеток, менее подверженные изменениям. РВМС здорового донора, как и пациента с острым лимфолейкозом обладали сходной эффективностью накопления исследованных siРНК.

Таким образом, нами было показано, что холестеринные производные siРНК накапливаются в культивируемых лейкозных клетках различного происхождения более эффективно, чем siРНК, трансфецированная при помощи Липофектамина.

3.2.4. Исследование влияния 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 [231,366]. Основными факторами, определяющими место присоединения лиганда к siРНК являются сохранение интерферирующей активности siРНК и доступность для взаимодействия лиганда с клеткой-мишенью. Конъюгирование лигандов по сайтам в середине дуплекса, в отличие от концевых сайтов, не так эффективно с точки зрения связывания конъюгата с клеткой-мишенью и может привести к препятствованию взаимодействия siРНК с компонентами RISC [366]. С другой стороны присоединение лигандов по концам siРНК может защищать её от действия экзорибонуклеаз [28,367], поэтому присоединение по этим участкам представляется более предпочтительным. Однако, присоединение лигандов к 5' концу смысловой цепи, так же ингибирует интерферирующую активность siРНК, поскольку 5' концевой фосфат необходим для протекания РНК-интерференции [4,248]. Присоединение лигандов к 3' концу антисмысловой цепи или смысловой цепи описано в ряде работ [269,276,287], при этом, считается, что смысловую цепь предпочтительнее использовать для этой цели, поскольку эта цепь не входит в активированный RISC, осуществляющий расщепление мРНК-мишени и лиганд не мешает взаимодействию siРНК с RISC* и расщеплению им мРНК-мишени. Таким образом, наиболее оптимальными способами введения холестерина в состав siРНК являются его присоединение с 5' или 3' концов смысловой цепи. Оба типа конъюгатов описаны в литературе [267,269,276], 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). Клетки K562, как описано выше, являются

линией хронического миелоидного лейкоза, а клетки KB-3-1 и KB-8-5 представляют интерес, поскольку являются опухолевыми клетками, чувствительными к действию цитостатиков и клетками с *MDR1*-опосредованной лекарственной устойчивостью, соответственно. Введение холестерина на 5' конец смысловой цепи siDm описано выше (раздел 3.2), 3'-холестериновые конъюгаты siРНК были получены с использованием модифицированного холестерином полимера [270], синтезированного по аналогии с [349,350] (рис. 15). Все конъюгаты siРНК и холестерина были синтезированы в ЛХР ИХБФМ СО РАН. После инкубации конъюгатов с клетками (4 ч) было показано, что Алекса 488-меченые 3' производные накапливаются в 3 раза более эффективно, чем 5' конъюгаты во всех исследованных линиях клеток (рис. 16).



Рис. 15. Структура холестериновых производных siРНК, где А – флуорофор Алекса 488.

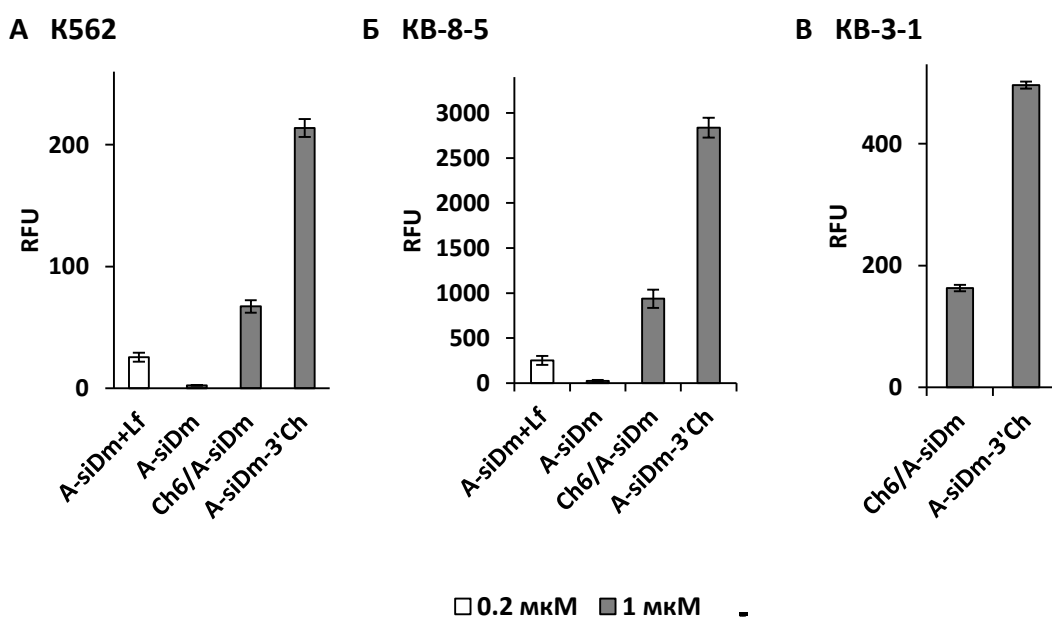


Рис. 16. Накопление Алекса-488-меченых 3' и 5' - холестериновых производных siРНК, содержащих линкеры различной длины в клетках K562 (А), KB-8-5 (Б) или KB-3-1 (В). Исследования проводили при помощи проточной цитофлуорометрии (FC 500 (А, В) Novocyte (Б)), в каждом образце анализировали 10,000 клеток. Средние значения (\pm SD), рассчитанные по результатам трёх независимых экспериментов приведены на рисунке.

При этом наблюдается увеличение эффективности накопления как 3', так и 5' конъюгатов в ряду K562 <KB-8-5 <KB-3-1. Интенсивность флуоресценции составляла 67, 88, 163 RFU для 5' конъюгата и 214, 349 и 495 RFU для 3' конъюгата в клетках K562, KB-8-5 и KB-3-1, соответственно (FC 500, рис. 16).

Данные отличия между клеточными культурами могут быть объяснены как различной процедурой трансфекции, так физиологическими особенностями клеток. Непосредственно перед добавлением конъюгатов к клеткам K562, в отличие от монослойных культур (KB-8-5, KB-3-1) их центрифугируют для смены ростовой среды на среду без сыворотки. Такая процедура может влиять на физиологические процессы внутри клеток, поэтому сравнивать общую интенсивность флуоресценции монослойных и суспензионных клеток не вполне корректно. Тот факт, что KB-8-5 накапливают меньше холестерина производных siPHK чем KB-3-1, может объясняться тем, что KB-8-5 гиперэкспрессируют *MDR1* ген, поскольку продукт этого гена является трансмембранным белком и может влиять на активность их эндоцитоза. С другой стороны, причиной более низкой эффективности накопления холестерина производных siPHK в клетках KB-8-5 может быть их меньшие размеры по сравнению с клетками KB-3-1.

Ранее нами было показано, что удлинение линкера между siPHK и холестерином приводит к увеличению эффективности накопления соответствующего конъюгата siPHK в различных линиях клеток *in vitro* (раздел 3.2.1.1.). Однако, несмотря на короткий линкер в конъюгате siPHK-3'Ch, его накопление во всех исследуемых линиях значительно превышало накопление Ch6-siPHK. Можно предположить, что лиганд на 3' конце более доступен для взаимодействия с клеточной мембраной, что увеличивает эффективность «заякорения» холестерина производного в мембране клетки.

3.3. Исследование влияния структуры конъюгатов siPHK и холестерина на их биологическую активность.

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*, экспрессирующихся в составе единого транскрипта. С целью сокращения времени анализа в последовательность был включен сигнал быстрой деградации [368].

3.3.1. Трансдукция клеточных линий K562, KB-3-1 и KB-8-5.

Для создания линий клеток K562, KB-3-1 и KB-8-5, экспрессирующих фрагменты мРНК генов *MDR1* и *EGFP* с единого транскрипта использовали трансдукцию

лентивирусными частицами. Для этого клетки трансдуцировали лентивирусными частицами, полученными по заказу компанией «Евроген», содержащими фрагменты генов *MDR1* (293-751, M14758) и *EGFP* и сигнал быстрой деградации (фрагмент гена *ODC1*) [368]. К клеткам добавляли среду, содержащую вирусные частицы; для увеличения эффективности трансдукции увеличивали концентрацию вируса вблизи клеток используя спинокуляцию - центрифугирование клеток со средой с вирусами при 600 g 1 час при 32 °C. После этого среду заменяли на свежую и инкубировали 72 часа с последующим анализом клеток на проточном цитофлуориметре (Cytomics FC 500).

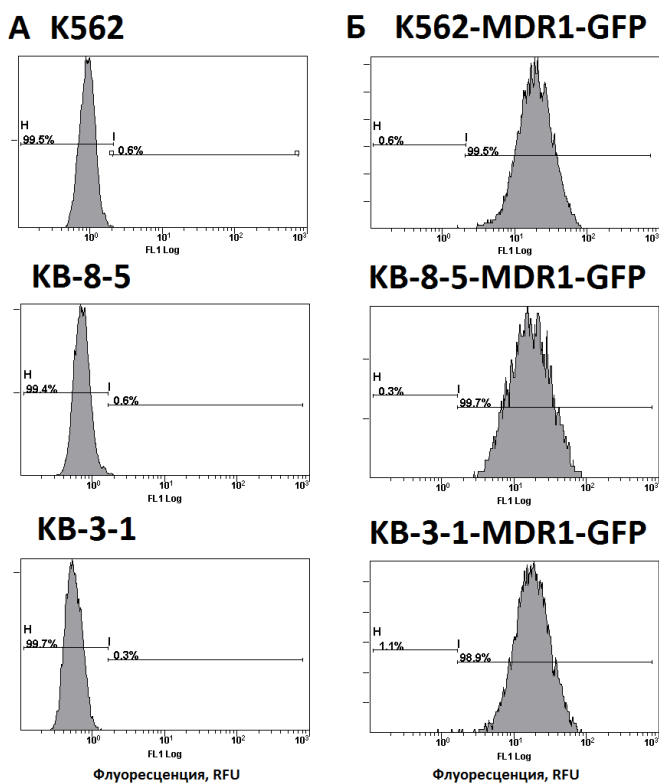


Рис. 17. Относительная флуоресценция исходных клеток K562, KB-3-1 и KB-8-5 (А) и клеток после трансдукции и сортировки (Б).

Эффективность трансдукции, оцениваемая по интенсивности флуоресценции клеток в области 530 ±30 нм при возбуждении их лазером на длине волны 488 нм, составила 69, 95 и 65 % (доля трансдуцированных клеток, уровень флуоресценции которых превышал autofluorescence не трансдуцированных клеток) их средняя флуоресценция составила и 8.3, 5.6 и 3.3 RFU для K562, KB-8-5 и KB-3-1, соответственно, что в 7, 5 и 5 раз больше, чем флуоресценция контрольных клеток. Для селекции клеток, экспрессирующих репортёрный ген, полученные клетки сортировали на BD FACS Aria. При сортировке для увеличения средней интенсивности флуоресценции клеток собирали фракцию клеток с максимальной флуоресценцией. После трансдукции доля клеток, экспрессирующих флуоресцентный белок составила практически 100 % для всех клеток, а средняя

интенсивность флуоресценции в 18, 19 и 31 раз превышала флуоресценцию контрольных клеток K562, KB-8-5 и KB-3-1, соответственно (рис. 17). Таким образом, полученные отсортированные клетки являются удобной модельной системой для оценки эффективности подавления экспрессии гена-мишени.

3.3.2. Исследование влияния структуры конъюгатов siРНК и холестерина на их биологическую активность при трансфекции Липофектамином.

Чтобы определить, влияет ли остаток холестерина в исследованных конъюгатах на протекание РНК-интерференции были сформированы дуплексы холестериновых производных анти-*MDR1* siРНК не содержащих флуорофора. 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.

Для исследования кинетики подавления экспрессии гена-мишени конъюгатами siРНК и определения влияния их структуры на кинетику подавления гена-мишени в клетках K562-MDR1-GFP при трансфекции конъюгатов Липофектамином, флуоресценцию клеток оценивали через 1-5 дней после начала эксперимента. Было показано, что максимальное снижение уровня экспрессии гена-мишени *MDR1-GFP* наблюдается на третий день после трансфекции и достигает 25-40 % (рис. 18). Далее уровень экспрессии начинает постепенно восстанавливаться и на 5 сутки после трансфекции составляет 30-50 %. Таким образом, было показано, что структура конъюгатов не влияет на кинетику их ингибирующего действия при трансфекции Липофектамином. Временная точка 72 часа была выбрана для измерения биологической активности конъюгатов при трансфекции Липофектамином для последующих экспериментов.

В нефлуоресцирующих клетках KB-8-5 эффективность действия конъюгатов оценивали по снижению уровня Р-гликопротеина с помощью Вестерн блот анализа в среде без винбластина для предотвращения негативной селекции. Временная точка 72 часа для измерения биологической активности конъюгатов при их трансфекции Липофектамином в клетках KB-8-5 была выбрана исходя из данных полученных в нашей лаборатории ранее [23].

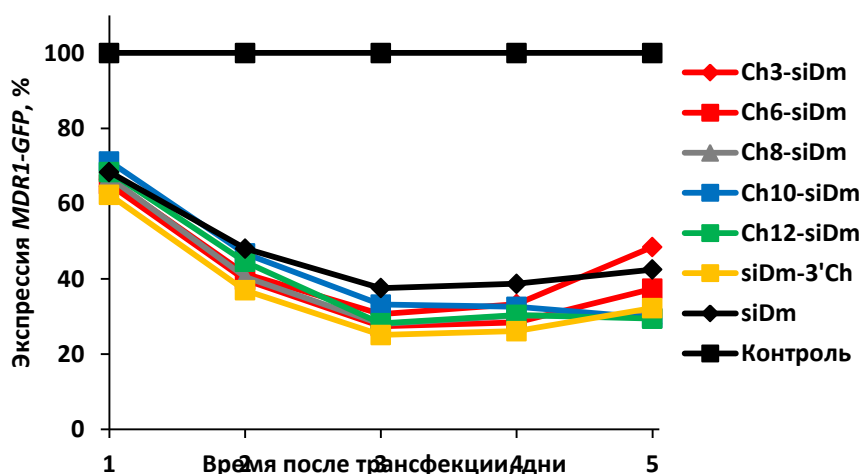


Рис. 18. Кинетика подавления экспрессии гена *MDR1-GFP* в клетках K562-MDR1-GFP конъюгатами анти-*MDR1* siРНК и холестерина (200 нМ), трансфецированных с помощью Липофектамина. Полученные результаты были нормированы на флуоресценцию необработанных клеток.

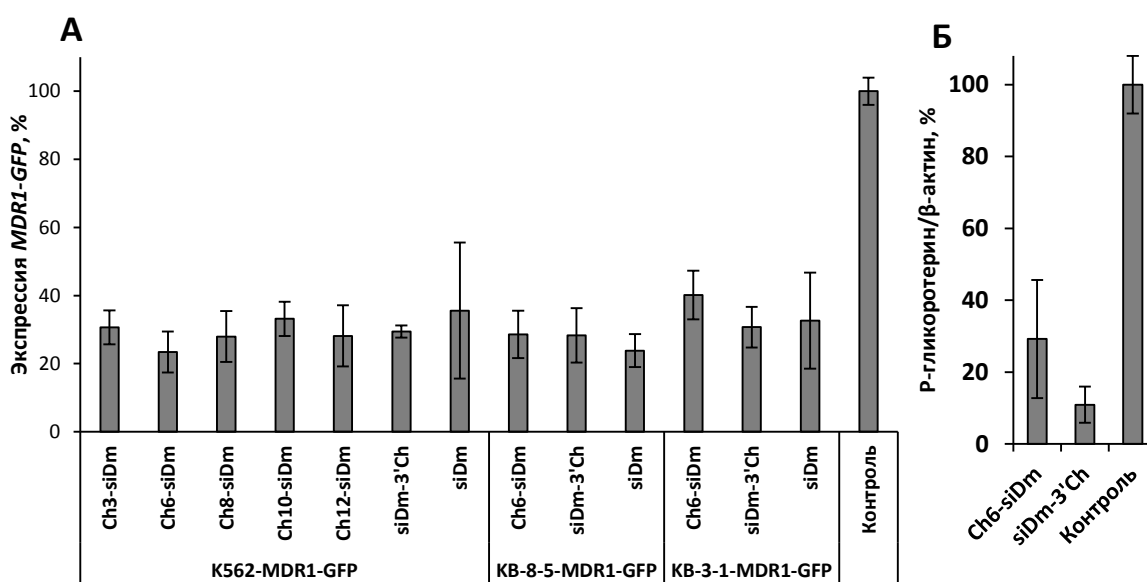


Рис. 19. Биологическая активность холестеринных конъюгатов siРНК, трансфецированных в клетки с помощью Липофектамина. Клетки K562-MDR1-GFP, KB-3-1-MDR1-GFP и KB-8-5-MDR1-GFP трансфецировали 200 нМ siРНК в присутствии Липофектамина. Полученные результаты были нормированы на флуоресценцию необработанных клеток (А). Биологическая активность холестеринных конъюгатов siРНК (100 нМ), трансфецированных в клетки с помощью Липофектамина в клетках KB-8-5 (Б), данные получены Вестерн блот анализом, β-актин использовали в качестве внутреннего стандарта. Средние значения (±SD), рассчитанные по результатам трёх независимых экспериментов приведены на рисунке.

В ходе работы было показано, что во всех исследуемых линиях клеток: K562-MDR1-GFP, KB-3-1-MDR1-GFP, KB-8-5-MDR1-GFP и KB-8-5 биологическая активность 5' и 3' холестеринных конъюгатов siDm не отличалась от siDm (рис. 19 А, Б). Варьирование длины линкера с 3 до 12 метиленовых звеньев у 5' конъюгата так же не приводило к значимому изменению биологической активности конъюгатов.

Следовательно, присоединение холестерина как на 5', так и на 3' конец смысловой цепи не блокирует интерферирующую активность siРНК. Полученные данные согласуются с литературными данными, где было показано, что присоединение холестерина с 5' или 3' концов смысловой цепи (использовался другой тип присоединения и структура линкера) не блокирует протекание РНК-интерференции [267,269,276].

3.3.3. Исследование влияния структуры конъюгатов siРНК и холестерина на их биологическую активность без Липофектамина.

Биологическую активность производных анти-*MDR1* siРНК оценивали по снижению уровня Р-гликопротеина в клетках KB-8-5 с помощью Вестерн блот анализа через 3 – 8 дней инкубации клеток в среде без винбластина для предотвращения негативной селекции. Минимальный период инкубации (3 дня) был выбран исходя из данных по времени полужизни Р-гликопротеина – 48 – 72 ч [369]. Было показано, что кинетика ингибирования синтеза Р-гликопротеина конъюгатами, содержащими линкер длиной 6, 8 и 10 метиленовых звеньев, одинакова (рис. 20). На 3 сутки уровень Р-гликопротеина в клетках, обработанных конъюгатами, не отличается от контроля, на 4 сутки под действием конъюгатов с линкерами длиной 6, 8 и 10 метиленовых звеньев происходит снижение уровня Р-гликопротеина на 30-40 %. Максимальное снижение уровня Р-гликопротеина под действием этих конъюгатов наблюдается на 5 и 6 сутки и его уровень составляет 60-55 % от уровня этого белка в контрольных клетках. На 7 сутки уровень Р-гликопротеина начинает возрастать и достигает 70 % относительно контроля, на 8-е сутки уровень Р-гликопротеина продолжает увеличиваться, практически восстановившись до исходного. Среди конъюгатов с линкерами длиной 6, 8 и 10 метиленовых звеньев наибольшей эффективностью обладал Ch8-siDm, однако отличия в эффективности подавления не были статистически значимыми.

Холестерин-содержащий конъюгат siРНК, в состав которого входит линкер длиной 12 метиленовых звеньев, показал отличную от других кинетику ингибирования синтеза Р-гликопротеина: на 4 и 5 сутки наблюдалась достоверно более низкое подавление, чем в случае Ch6-, Ch8- и Ch10-siDm (на 20 % и 30 %, соответственно) (на 5 сутки $P < 0.05$ при сравнении Ch12-siDm с Ch6-, Ch8- и Ch10-siDm) (рис. 20). Максимальное снижение уровня экспрессии гена-мишени под действием этого конъюгата наблюдается на 6 сутки, в отличие от других конъюгатов, где минимум экспрессии Р-гликопротеина наблюдается раньше - на 5 сутки. Также, этот конъюгат показал более слабый биологический эффект: максимальное снижение уровня Р-гликопротеина составило только 42 % в отличие от 58-60 % для конъюгатов Ch6- Ch8- и Ch10-siDm ($P < 0.05$ при сравнении Ch8- и Ch12-siDm).

Полученные данные по биологической активности не согласуются с данными накопления (раздел 3.2.1.1., рис. 9), 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. 20, 21). Дальнейшее удлинение линкера с 10 до 12 не смотря на то, что способствует увеличению накопления конъюгата, приводит к уменьшению его биологической активности и ухудшению его кинетики ингибирования синтеза Р-гликопротеина (рис. 20). Возможно, что в случае Ch12-siDm большая гидрофобность конъюгата может приводить к уменьшению эффективности высвобождения из эндосом и, как следствию, уменьшению биологической активности конъюгата.

Интересно, что 3' конъюгат, который накапливался в клетках KB-8-5 в 3 раза эффективнее 5' конъюгата с линкером 6 метиленовых звеньев (рис. 16), практически не обладал биологической активностью в этих клетках (рис. 20). Вероятно, структура этого конъюгата способствует его «непродуктивному» накоплению в клетках.

При трансфекции неконъюгированной siDm Липофектамином она обладала значительным биологическим эффектом, при этом кинетика ингибирования синтеза Р-гликопротеина существенно отличалась от кинетики биологического действия конъюгатов без трансфекционного агента; уже через 3 дня после трансфекции наблюдалось снижение экспрессии гена-мишени, при этом, максимальное подавление составило 70 % на 4 сутки после трансфекции. Биологическая активность siDm трансфецированной Липофектамином (200 нМ) на 5-8 сутки была сопоставима с активностью холестеринных конъюгатов siРНК без трансфекционного агента (5 мк) (рис. 20). Кинетика ингибирующего действия siРНК на 1-4 сутки после трансфекции зависит от времени полу-жизни продукта гена-мишени и образования RISC*, для этого должно произойти поглощение siРНК путём эндоцитоза и её выход из эндосомы в цитоплазму. Поскольку процесс эндоцитоза относительно быстрый - всего нескольких минут, для кинетики биологического действия siРНК наиболее значимым является внутриклеточный транспорт siРНК и её выход из эндосом [370]. В состав Липофектамина входит липид DOPE, способствующий выходу siРНК из эндосомы, поэтому ингибирование синтеза Р-гликопротеина siDm, трансфецированной Липофектамином происходит быстрее, чем под действием конъюгатов. Поскольку основными факторами, определяющими продолжительность восстановления экспрессии гена-мишени до исходного уровня являются деградация siРНК рибонуклеазами и «разбавление» концентрации RISC* вследствие деления клеток-мишеней [62], а паттерны химических модификаций у

исследованных siРНК, и, соответственно, чувствительность к рибонуклеазам одинаковы, то кинетика этого процесса у них схожа (6-8 сутки после трансфекции, рис. 20).

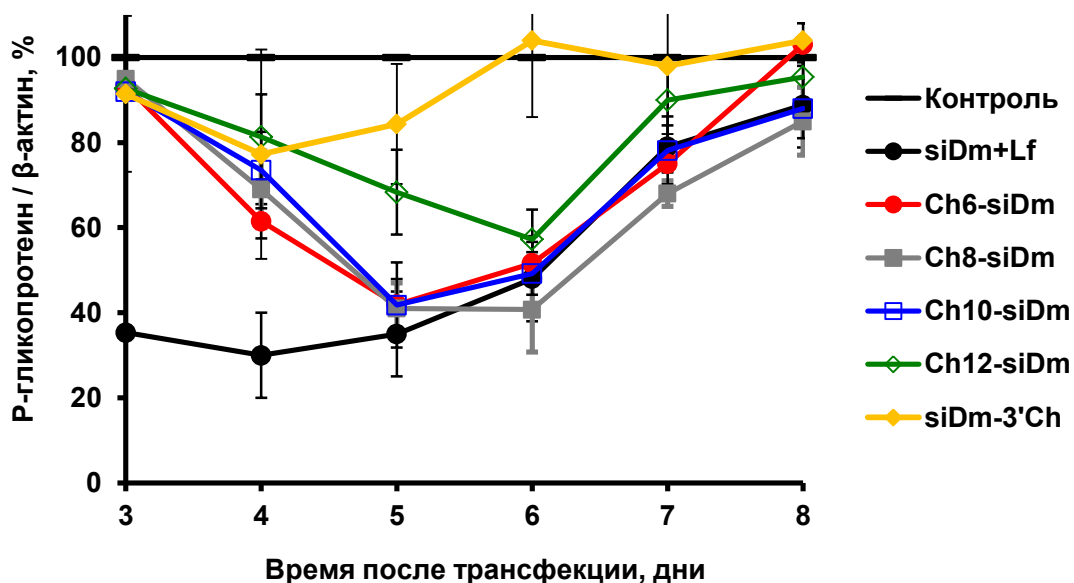


Рис. 20. Кинетика подавления синтеза Р-гликопротеина в клетках KB-8-5, обработанных холестерин-содержащими анти-*MDR1* siРНК (5 мкМ). Данные получены Вестерн блота анализом с последующим количественным анализом уровня белка. Необработанные клетки использовались в качестве контроля. Средние значения (\pm SD), рассчитанные по результатам трёх независимых экспериментов, приведены на рисунке.

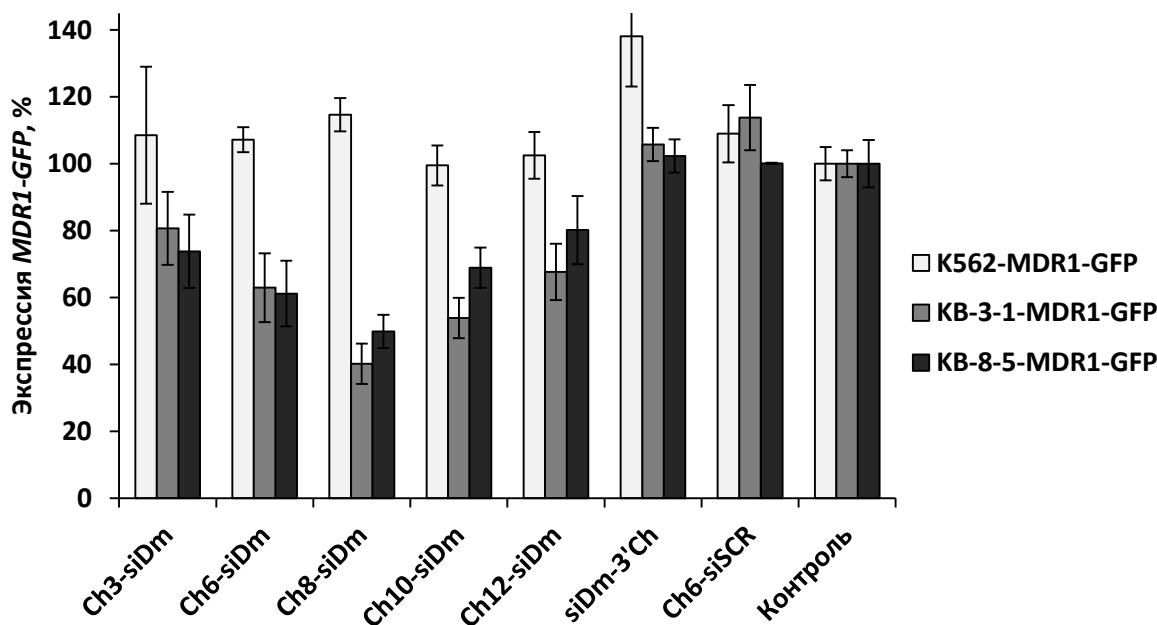


Рис. 21. Биологическая активность холестериновых конъюгатов siРНК при их добавлении к клеткам K562-MDR1-GFP (5 мкМ), KB-3-1-MDR1-GFP (2 мкМ) и KB-8-5-MDR1-GFP (2 мкМ). Измерение уровня экспрессии гена *MDR1-GFP* производили через 72 часа. Полученные результаты были нормированы на флуоресценцию необработанных клеток. Средние значения (\pm SD), рассчитанные по результатам трёх независимых экспериментов приведены на рисунке.

Зависимость биологической активности конъюгатов siPHK от положения холестерина и длины алифатического аминоклинкера в клетках KB-3-1-MDR1-GFP и KB-8-5-MDR1-GFP была аналогична зависимости, наблюдаемой в клетках KB-8-5 (рис. 21), однако, эффективность подавления экспрессии гена-мишени под действием холестеринных производных зависела от типа клеток.

Пониженная биологическая активность конъюгатов в клетках KB-8-5-MDR1-GFP относительно клеток KB-3-1-MDR1-GFP может быть связана с тем фактом, что первые экспрессируют два гена-мишени: эндогенный *MDR1* и химерный трансген *MDR1-GFP*, соответственно, копияность гена-мишени гораздо выше (рис. 21). Однако, возможно, что более низкая биологическая активность конъюгатов в клетках KB-8-5-MDR1-GFP является следствием меньшей эффективности накопления Ch6/A-siDm в клетках KB-8-5 по сравнению с KB-3-1 (рис. 16), либо отличным распределением холестерина в мембране клеток KB-8-5 по сравнению с клетками KB-3-1. Из литературных данных известно, что Р-гликопротеин опосредует АТФ-зависимую транслокацию сфингомиелинов в мембране [371], которые имеют высокое сродство к холестерину [372], поэтому он может косвенно влиять на распределение холестерина в мембране [361], что может частично повлиять как на непосредственную локализацию холестерин-содержащих siPHK, так и физиологические особенности эндоцитоза клеток KB-8-5-MDR1-GFP.

Биологическая активность холестеринных конъюгатов siPHK в клетках K562-MDR1-GFP при исследуемой концентрации (5 мкМ) не проявлялась, несмотря на эффективное накопление (рис. 21). Вероятно, физиологические особенности эндоцитоза способствуют только «непродуктивному» накоплению конъюгатов в этих клетках.

Таким образом, нами было установлено, что клинкеры с 6-10 атомами углерода являются оптимальными для введения остатка холестерина в состав анти-*MDR1* siPHK, для использования их в лекарственно устойчивой линии KB-8-5, поскольку обеспечивает баланс между эффективностью накопления и биологической активностью siPHK. Также, в ходе работы возник вопрос о причинах того, почему 3'-конъюгат (siDm-3'Ch) и 5'-конъюгат содержащий клинкер с 12 атомами углерода (Ch12-siDm) обладают низкой биологической активностью, несмотря на то, что наиболее эффективно накапливаются в клетках.

3.4. Исследование механизма проникновения холестеринового производного siРНК в клетки KB-3-1 и K562.

3.4.1. Исследование влияния ингибиторов эндоцитоза на накопление и биологическую активность холестеринового производного siРНК в клетках KB-3-1 и K562.

Поскольку в ходе изучения биологической активности холестериновых производных siРНК в клетках возникли вопросы о том, чем отличается механизм накопления Ch6-siDm в клетках KB-3-1 и в клетках K562 и какой механизм накопления является «продуктивным», была поставлена задача изучения механизма проникновения холестеринового производного siРНК в клетки KB-3-1 и K562. Поскольку ранее в нашей лаборатории было показано, что присутствие сыворотки значительно влияет на накопление холестерин-содержащей siРНК, то для решения этой задачи было предложено исследовать влияние ингибиторов эндоцитоза на накопление Ch6/A-siDm как в присутствии сыворотки, так и в среде без сыворотки. Были выбраны ингибиторы основных типов эндоцитоза: клатрин зависимого эндоцитоза (КЗЭ) - хлоропромазин и монодансил кадаверин (МДК), эндоцитоза опосредованного липидными рафтами (ЛР) - нистатин и макропиноцитоза (МПЦ) - 5-(N-этил-N-изопропил) амилорид (EIPA) [373]. За 30 минут до добавления Алекса 488-меченой холестерин-содержащей siРНК (Ch6/A-siDm) к клеткам добавляли ингибиторы эндоцитоза до необходимой концентрации [374], после чего добавляли конъюгат siРНК и проводили инкубацию в течении 4 часов.

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. Вклад клатрин-зависимого и эндоцитоза опосредованного липидными рафтами, меняется в зависимости от присутствия сыворотки: в присутствии сыворотки этот вклад составляет 29 и 9 %, а в отсутствии 12 и 19 %, соответственно (рис. 22 А). 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. 22 Б). При этом, макропиноцитоз и эндоцитоз, опосредованный липидными рафтами вносят вклад в накопление конъюгата только в среде с сывороткой - 26 и 11 %, соответственно, тогда как в среде без сыворотки их вклад в накопление Ch6/A-siDm был незначителен (3 и 1 %, соответственно).

Анализ абсолютных значений средней интенсивности флуоресценции показал, что накопление Ch6/A-siDm в присутствии сыворотки было в 5.4 и 6.3 раз меньше, чем без неё для клеток KB-3-1 и K562, соответственно. Полученные данные хорошо согласуются с

результатами, полученными в нашей лаборатории ранее [23] и литературными данными [263], где так же было показано, что присутствие сыворотки уменьшает накопление холестерина производного siРНК в клетках COS-7 [263] и НЕК 293 [23]. Следует отметить, что количественные показатели вклада различных типов эндоцитоза при инкубации Ch6/A-siDm с клетками в присутствии сыворотки и без неё значительно отличались. Таким образом, можно предположить, что механизм проникновения Ch6/A-siDm в оба типа клеток зависит от наличия в среде сыворотки.

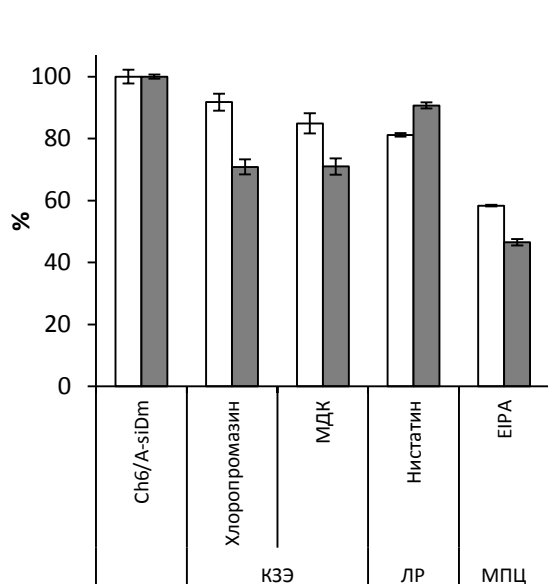
Для анализа влияния ингибиторов эндоцитоза на биологическую активность siРНК через 4 часа после их добавления к клеткам KB-3-1-MDR1-GFP и K562-MDR1-GFP их промывали и меняли на среду свежую; через 3 дня после этого проводили анализ биологической активности Ch6-siDm методом проточной цитофлуориметрии. Для анализа биологической активности использовали холестеринный конъюгат siРНК без флуоресцентной метки. Было показано, что ЕРА и МДК немного увеличивают эффективность действия Ch6-siDm в клетках KB-3-1-MDR1-GFP в среде без сыворотки. Однако, в среде с сывороткой они не влияют на биологическую активность Ch6-siDm (рис. 22 В). Другие использованные нами ингибиторы эндоцитоза не влияли на биологическую активность Ch6-siDm (рис. 22 В, Г).

Значение интенсивности флуоресценции клеток KB-3-1 при инкубации с Ch6/A-siDm в среде с сывороткой составляет 178 RFU, однако значения интенсивности флуоресценции при инкубации клеток KB-3-1 с Ch6/A-siDm в среде с сывороткой и ингибиторами эндоцитоза на 68, 22 и 125 RFU меньше для ингибиторов клатрин-зависимого эндоцитоза, эндоцитоза опосредованного липидными рафтами и макропиноцитоза, соответственно. Значения снижения интенсивности флуоресценции клеток K562 в отсутствие сыворотки составляют 524, 287 и 124 RFU. Таким образом, активность почти каждого типа эндоцитоза в клетках K562 в среде без сыворотки выше, чем в клетках KB-3-1 в среде с сывороткой. Однако, несмотря на это, биологическая активность Ch6-siDm в клетках K562 отсутствует (рис. 22 Г). Поэтому можно предположить, что происходит определённая рециркуляция Ch6/A-siDm из клеток K562 обратно среду или её секвестирование в других компартментах.

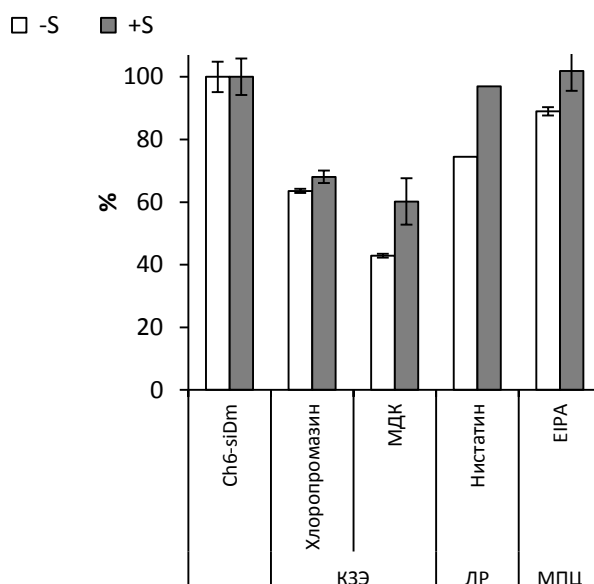
Поскольку биологическая активность Ch6-siDm не зависела от присутствия ингибиторов эндоцитоза, можно предположить, что Ch6-siDm проникает в клетки по нескольким механизмам и, таким образом, при блокировании одного из них биологическая активность не изменяется [375], либо проникновение Ch6-siDm происходит по механизму, не подавляемому данными ингибиторами.

Интересно, что хотя EIPA и Нистатин уменьшали накопление холестерин-содержащей siРНК, их добавление к клеткам KB-3-1-MDR1-GFP приводило к увеличению биологической активности Ch6-siDm. Поскольку EIPA обладает сходной с Гуанабензом (Витензин) структурой, то, возможно, он увеличивает биологическую активность siРНК по такому же механизму [376]. EIPA, как и Гуанабенз содержит несколько аминогрупп в своём составе, которые могут протонироваться, предполагается, что за счет них

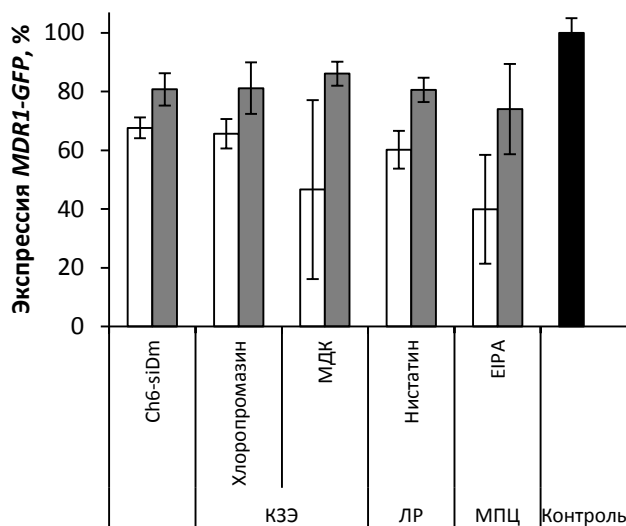
А KB-3-1



Б K562



В KB-3-1-MDR1-GFP



Г K562-MDR1-GFP

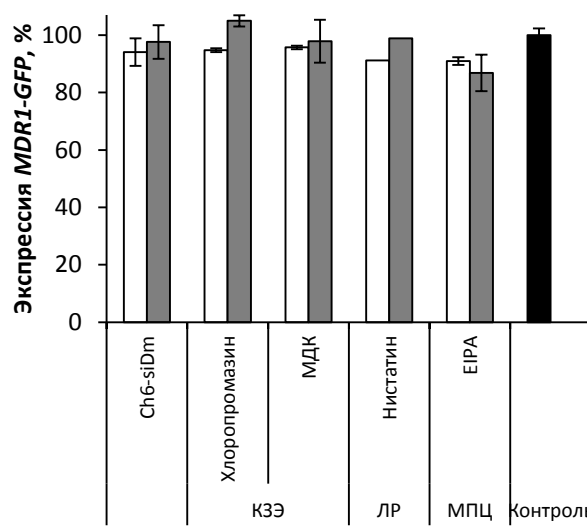


Рис. 22. Эффективность накопления Алекса-488 меченой холестерин-содержащей siРНК в клетках KB-3-1 (А) и K562 (Б) в среде с сывороткой (+S) и без неё (-S) через 4 часа после добавления конъюгата и ингибиторов эндоцитоза. Интерферирующая активность Ch-siDm в присутствии ингибиторов эндоцитоза в клетках KB-3-1 (В) и K562 (Г), экспрессирующих химерный ген *MDR1-GFP* через 3 дня после добавления конъюгата (Б). Исследования проводили с помощью проточной цитофлуорометрии при анализе 10,000 событий. Средние значения (\pm SD), рассчитанные по результатам трёх независимых экспериментов приведены на рисунке.

происходит нековалентное связывание с siРНК и экранирование её отрицательного заряда. Можно предположить, что такой комплекс EIPA с Ch6-siDm в присутствии сыворотки нестабилен, поскольку увеличение биологической активности Ch6-siDm в присутствии сыворотки не происходит.

МДК ингибирует клатрин-зависимый эндоцитоз путём стабилизации клатриновых пузырьков [374]. Однако, при использовании программы прогноза биологической активности PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) было показано, что МДК может обладать ингибирующей активностью относительно экзорибонуклеазы II (код фермента 3.1.13.1), которая расщепляет РНК с 3' концов. Поскольку паттерн химических модификаций siDm не защищает её от действия экзорибонуклеаз, можно предположить, что МДК, возможно, увеличивает эффективность действия Ch6-siDm путём ингибирования экзорибонуклеазы II и, соответственно, увеличивая стабильность siРНК. Однако, данное предположение не объясняет отсутствие этого эффекта при инкубации клеток с сывороткой.

Проникновение холестеринных производных siРНК в присутствии сыворотки было изучено на клетках HeLa в работе [262]. Ингибирование различных типов эндоцитоза осуществляли подавлением экспрессии значимых для них генов (*DNM1L*, *CLTC*, *CAVI*, *CDC42* и *RAC1*). Было показано, что основной вклад вносит рецептор-опосредованный эндоцитоз (~40%). Для ряда ASO и их биоконъюгатов было также показано, что их «продуктивное» накопление осуществляется рецептор-опосредованным клатрин-зависимым эндоцитозом [187,377]. Таким образом, можно предположить, что рецептор-опосредованный эндоцитоз может приводить к «продуктивному» накоплению холестеринного производного siРНК, однако, в таком случае, его активность в клетках K562 не объясняет отсутствия в них биологического эффекта Ch6-siDm.

Интересно, что в работе [262] подавление гена *CAVI* сопровождалось повышением накопления холестеринного производного siРНК, поскольку продукт этого гена участвует также и в рециркуляции холестерина [378]. Для того, чтобы оценить влияние рециркуляции в клетках KB-3-1 и K562 было проведено исследование кинетики накопления холестеринного производного в этих клетках.

3.4.2. Исследование кинетики накопления холестеринного производного siРНК в клетках KB-3-1 и K562.

Поскольку ранее нами показано, что присутствие сыворотки влияет на механизм накопления холестерин-содержащей siРНК (раздел 3.4.1., рис. 22), то для исследования кинетики накопления Ch6/A-siDm в клетках KB-3-1 и K562 были выбраны следующие

условия: инкубация Ch6/A-siDm с клетками в среде без сыворотки (1); инкубация Ch6/A-siDm с клетками в среде без сыворотки, затем её добавление через 4 часа после начала эксперимента (2), либо промывка клеток и добавление свежей среды с сывороткой через 4 часа после начала эксперимента (3). В ходе работы было показано, что холестеринное производное siРНК действительно может подвергнуться рециркуляции, при этом кинетика накопления зависит от присутствия сыворотки и типа клеток (рис. 23). В среде без сыворотки Ch6/A-siDm в клетках KB-3-1 продолжает накапливаться до 48 часов; в клетках K562 основное накопление Ch6/A-siDm происходит за 4 часа и достигает максимума через 24 часа, далее Ch6/A-siDm клетками K562 не поглощается. При добавлении сыворотки или свежей среды с сывороткой через 24 часа происходит уменьшение интенсивности флуоресценции клеток в 2-6 раз (1.8-3.2 и 2.6-5.6 для клеток KB-3-1 и K562, соответственно), далее через 48 часов флуоресценция снижалась в 1.1 и 1.5 раз для клеток KB-3-1 и K562, соответственно (рис. 23).

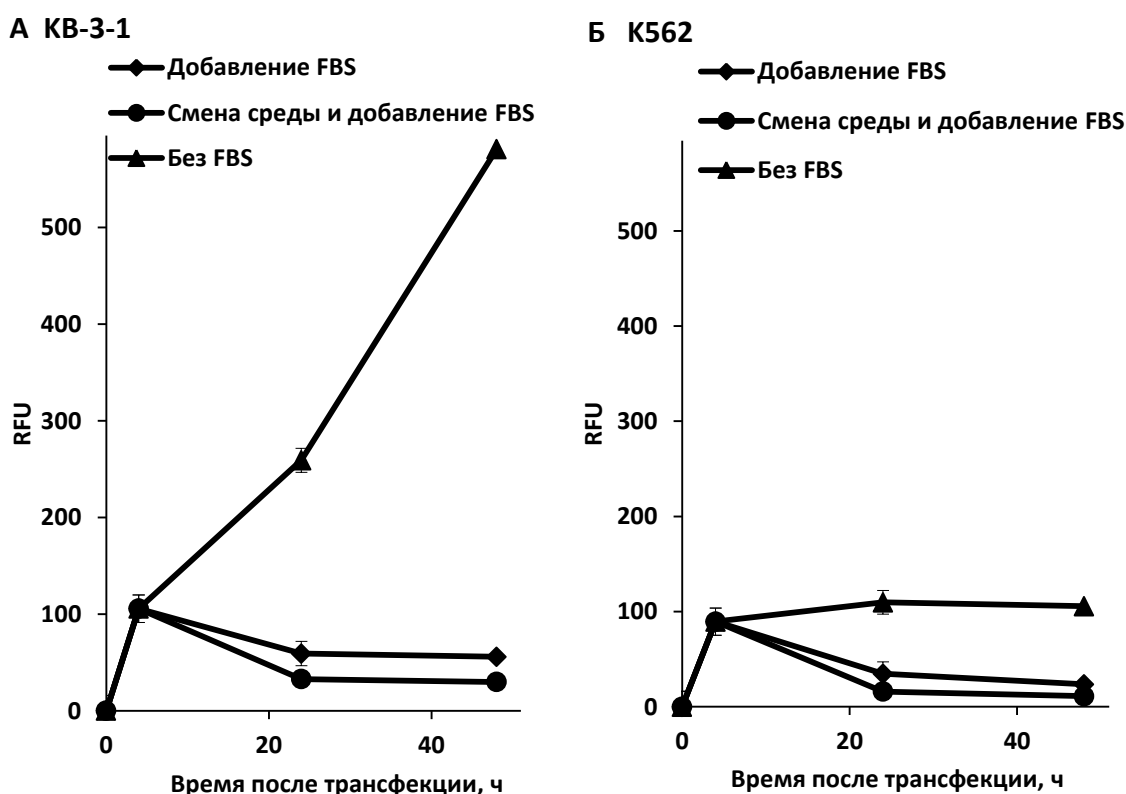


Рис. 23. Кинетика накопления Ch6/A-siDm в клетках KB-3-1 (А) и K562 (Б) при добавлении среды с 10 % сывороткой (FBS), смене среды на содержащую 10 % или при отсутствии сыворотки. Исследования проводили с помощью проточной цитофлуорометрии при анализе 10,000 событий. Средние значения (\pm SD), рассчитанные по результатам трёх независимых экспериментов приведены на рисунке.

При этом, добавление свежей среды с сывороткой приводит к почти в 2 раза большему снижению накопления Ch6/A-siDm, чем добавление сыворотки к среде с клетками. Следует отметить, что через 48 часов снижение уровня флуоресценции в клетках K562 было в 2 раза сильнее, чем в клетках KB-3-1 и составило 74-88 и 47-72 % относительно временной точки 4 часа, для клеток K562 и KB-3-1, соответственно (рис. 23).

Поскольку клетка поддерживает процесс гомеостаза, помимо эндоцитоза происходит «отдача» содержимого клетки путём экзоцитоза или рециркуляции [60]. Поэтому, логично, что при добавлении сыворотки к среде, содержащей Ch6/A-siDm, уровень флуоресценции через 48 часов снижается менее значительно из-за присутствия Ch6/A-siDm в среде, чем при замене среды на свежую. Однако, вероятно, данный процесс в клетках K562 происходит в 2 раза с большей эффективностью, либо это связано с более быстрой скоростью деления клеток K562 по сравнению с KB-3-1 и, соответственно, более быстрым «разбавлением» концентрации RISC* [62]. Возможно, что эти факторы являются одной из причин отсутствия биологической активности Ch6-siDm в этих клетках. Данные результаты согласуются с результатами кинетики накопления, полученными в работах [262,263] на клетках HeLa. Однако, снижение количества холестеринных конъюгатов, накопленных в клетках происходило с разной эффективностью и составляло 25 % через 24 часа [263] и 75 % через 5 часов [262]. Данные отличия, вероятно, являются следствием различия экспериментальных условий, таких как концентрация сыворотки и время инкубации холестеринных конъюгатов siРНК с клетками.

3.5. Исследования влияния флуорофора на взаимодействие холестеринных 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 и биологическую активность 5' холестеринных производных содержащих линкер длиной 3, 6 и 12 метиленовых звеньев, 3' производных и их флуорофор-меченых аналогов.

3.5.1. Исследование влияния структуры siРНК на её термостабильность.

Присоединение любой химической группы, включая флуорофор, вместе с влиянием на клеточное накопление и взаимодействие с белками РНК-интерференции, также может влиять на термодинамическую стабильность и асимметрию дуплекса и, таким образом, изменять его биологическую активность. Поэтому, чтобы определить, как добавление холестерина и/или флуорофоров в различные положения дуплекса влияет на его термодинамические параметры, мы измерили температуры плавления (T_m) полученных дуплексов. Данные показывают (табл. 4), что присоединение холестерина с помощью линкера, состоящего из шести метиленовых групп к 5'-концу siРНК, а также его присоединение к 3'-концу, оказывает незначительное влияние на T_m дуплекса ($\Delta T_m +0.3^\circ\text{C}$ и $+0.8^\circ\text{C}$ для Ch6-siРНК и siРНК-3'Ch, соответственно). Однако, увеличение длины алифатического линкера между холестерином и 5'-концом смысловой цепи до 12 метиленовых звеньев оказало более существенное влияние на стабильность дуплекса (Ch12-siРНК, $\Delta T_m -4,2^\circ\text{C}$).

Таблица 4. Температуры плавления конъюгатов siРНК.

Конъюгат ¹	T_m ($^\circ\text{C}$)	ΔT_m ($^\circ\text{C}$)
siDm	76.7	0
Ch6-siDm	77	0.3
Ch12-siDm	72.5	-4.2
siDm-3'Ch	77.5	0.8
A-siDm	77.5	0.8
Ch6/A-siDm	75	-1.7
Ch12/A-siDm	71.5	-5.2
A-siDm-3'Ch	76.5	-0.2
Cy-siDm	76.5	-0.2
Ch6/Cy-siDm	81.5	4.8
Cy-siDm-3'Ch	78.5	1.8

1) А – Алекса 488, Cy - Cy5.5.

Присоединение гидрофильного флуорофора Алекса 488 вызывало лишь незначительное снижение термостабильности всех холестерин-содержащих конъюгатов; ΔT_m по сравнению с аналогами конъюгатов без Алекса 488 составляла -2°C , -1°C и -1°C для Ch6/A-siDm, Ch12/A-siDm и A-siDm-3'Ch, соответственно. Присоединение гидрофобного флуорофора Cy5.5 вызывало существенное изменение T_m в случае конъюгата Ch6/Cy-siDm, причем ΔT_m составляло 4.5°C , в то время как присоединение Cy5.5 к 3'-холестериновому конъюгату существенно не изменяла термодинамическую стабильность дуплекса ($\Delta T_m 1^\circ\text{C}$). Значительное увеличение T_m в случае 5'-конъюгата,

содержащего Су5.5 (T_m 81.5°C), скорее всего, является результатом гидрофобного или стэкинг взаимодействия между холестерином и Су5.5, стабилизирующего дуплекс.

Поскольку термодинамическая асимметрия дуплекса вносит основной вклад в выбор цепи (смысловая или антисмысловая), которая войдет в состав RISC*, и будет направлять последовательность-специфическое расщепление мРНК-мишени [224], дестабилизация дуплекса с 5'-конца смысловой цепи может уменьшать вероятность включения антисмысловой цепи в RISC* и, следовательно, уменьшать биологическую активность такого конъюгата. Таким образом, можно предположить, что холестерин, присоединенный к siРНК через аминокододецильный линкер (12 метиленовых звеньев) дестабилизирует дуплекс с 5' конца смысловой цепи дуплекса, изменит термоасимметрию дуплекса и уменьшает его биологическую активность. Можно также предположить, что конъюгат Ch6/Су-siDm обладает большей биологической активностью, чем Ch6-siDm, поскольку обладает повышенной термостабильностью с 5' конца смысловой цепи дуплекса.

3.5.2. Исследование влияния флуорофора на накопление холестериновых производных siРНК в клетках KB-8-5.

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. Поэтому мы изучили накопление 5' холестериновых производных содержащих линкер длиной 3, 6 и 12 метиленовых звеньев, 3' производных и их Алекса 488-меченых аналогов (рис. 24) методом stem loop ПЦР (рис. 25 А). Сравнение эффективности накопления 5'-холестериновых конъюгатов показывает, что Ch6-siDm эффективно накапливается в клетках KB-8-5, причем уровень накопления достигает 73×10^6 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 (66×10^6 мол./кл.), в то время как присоединение гидрофобного флуорофора Су5.5 немного увеличивало уровень его накопления (94×10^6 мол./кл.) (рис. 25А). Сравнение накопления 5' - холестериновых конъюгатов, отличающихся длиной линкера (3, 6 и 12 атомов углерода), показало, что эффективность накопления возрастала с увеличением длины линкера: 38, 73, и 140×10^6 мол./кл. для Ch3-, Ch6- и Ch12-siDm, соответственно (рис. 25А). Накопление 5' холестериновых конъюгатов, содержащих Алекса 488 показало такую же тенденцию: 19,

66 и 90×10^6 мол./кл. для Ch3/A-, Ch6/A- и Ch12/A-siDm, соответственно. Эти данные согласуются с результатами накопления флуоресцеин-содержащих холестериновых производных siРНК на клетках НЕК 293, полученные в нашей лаборатории ранее методом проточной цитометрии [23].

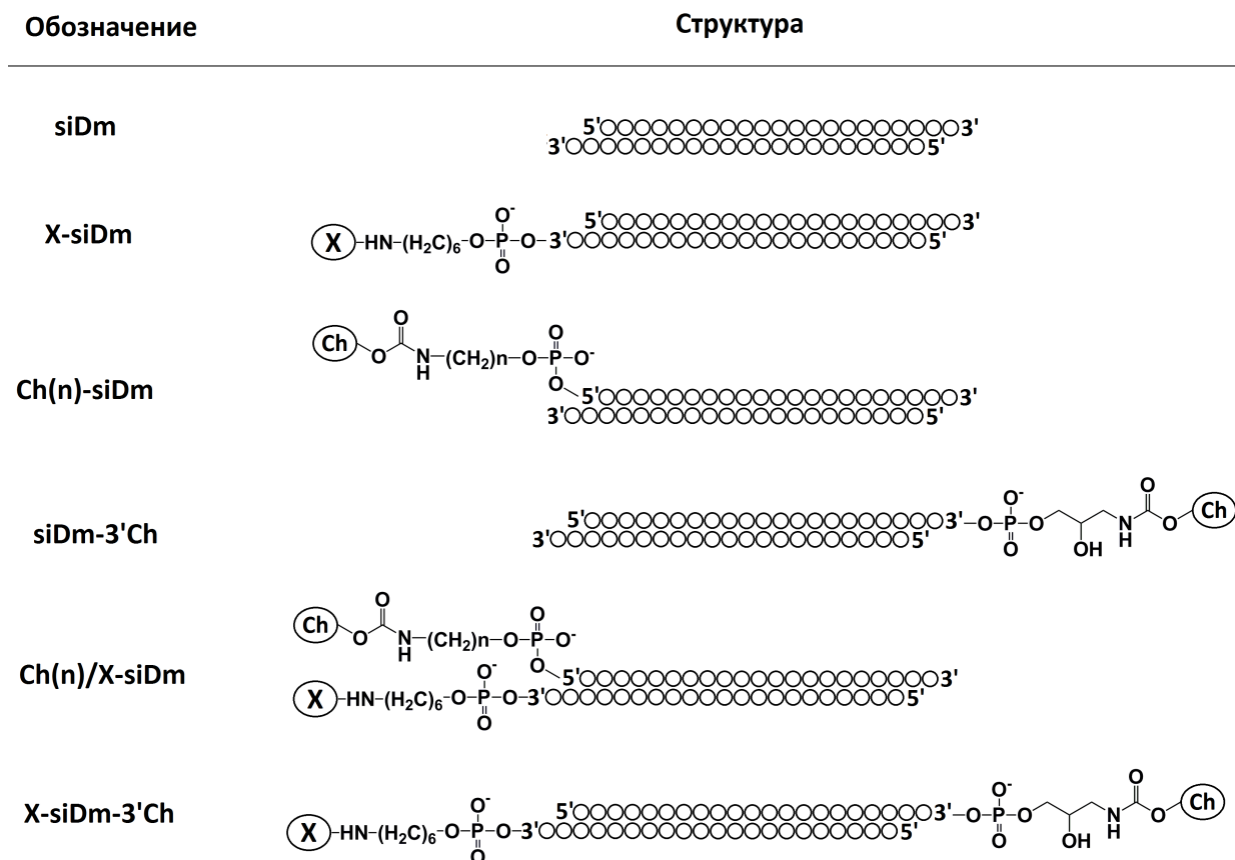
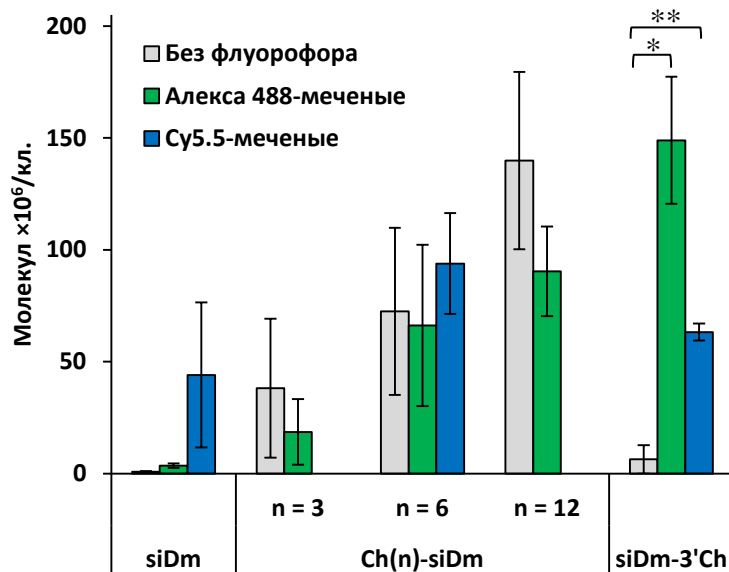


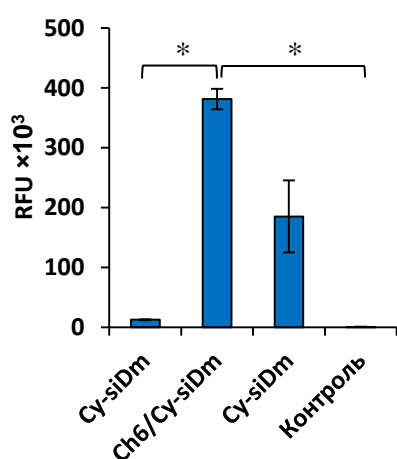
Рис. 24. Структура холестериновых производных siРНК, где (n) - число метиленовых звеньев (3, 6 или 12); Ch - холестерин; X – флуорофор (Алекса 488 или Су5.5).

В отличие от 5'-холестеринового конъюгата, накопление 3'-холестеринового конъюгата (siD-3'Ch) не содержащего флуорофора в клетках было низким (6.3×10^6 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 63×10^6 мол./кл. для A-siDm-3'Ch и Су-siDm-3'Ch, соответственно) (рис. 25). Неконъюгированная siРНК накапливалась в клетках с низкой эффективностью (0.8×10^6 мол./кл.), однако присоединение флуорофоров так же оказывало существенное влияние на ее свойства: гидрофильная Алекса 488 увеличивала накопление siDm в 4.5 раз, тогда как гидрофобный Су5.5 увеличил её накопление в 55 раз (рис. 25). Данные накопления были подтверждены методом проточной цитофлуометрии и было показано, что накопление флуорофор-меченых конъюгатов существенно не отличались от данных, полученных с помощью stem loop ПЦР (рис. 25 Б, В).

А Stem loop ПЦР



Б Cy5.5



В Алекса 488

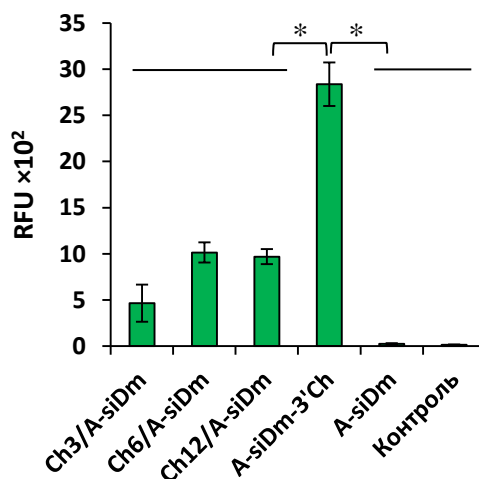


Рис. 25. Влияние присоединения флуорофоров Cy5.5 и Алекса 488 к 5' и 3'-конъюгатам siРНК и холестерина на их накопление в клетках KB-8-5 (1 мкМ). Данные получены stem-loop ПЦР (А) и проточной цитофлуориметрией (Б, В) через 4 часа после добавления конъюгатов к клеткам. Средние значения (\pm SD) и статистическая значимость различий (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$), рассчитанные по результатам трёх независимых экспериментов приведены на рисунке.

Предполагается, что взаимодействие холестеринowego конъюгата siРНК с клетками происходит в два этапа: «заякоревание» конъюгата в мембране и поглощение путем эндоцитоза [263]. Эффективность первого этапа зависит от структуры и гидрофобности конъюгата, при этом положение лиганда в структуре конъюгата и длина линкера влияют на доступность лиганда для взаимодействия с клеточной мембраной. Поэтому важными параметрами присоединенного к конъюгату флуорофора являются его гидрофобность и положение в структуре конъюгата относительно холестерина. Если флуорофор и холестерин присоединены к разным концам разных цепей, то есть расположены с одной и

той же стороны siРНК дуплекса (как в случае 5'-холестеринового конъюгата siРНК с присоединённым 3'-флуорофором, Ch(n)/X-siDm, рис. 24), то гидрофильный флуорофор может мешать «заякориванию» холестерина на мембране, тогда как гидрофобный флуорофор может усиливать его. В противоположной ситуации, когда флуорофор и холестерин расположены с разных сторон дуплекса (как в случае 3'-холестеринового конъюгата siРНК с присоединённым 3'-флуорофором, X-siDm-3'Ch, рис. 24), влияние флуорофора на «заякоривание» холестерина на мембране может быть незначительным. В то же время, гидрофобный флуорофор может взаимодействовать с мембраной клетки и обеспечивая проникновение siРНК.

Второй этап, проникновение холестерин-содержащей siРНК внутрь клетки не достаточно изучен и многие детали его протекания не выяснены (раздел 3.4.1.). Известно, что поглощенное содержимое эндосомы подвергается сортировке по пути рециркуляции или по пути перехода в лизосому и деградации [264,379,380] (рис. 7). Этот процесс зависит от типа эндоцитоза и содержимого эндосомы, следовательно, флуорофор, прикрепленный к siРНК, может взаимодействовать с эндосомальной мембраной или её белками, что может перенаправить процесс сортировки. С другой стороны, то, каким лигандом конъюгат преимущественно взаимодействует с мембраной эндосомы или её белками (через холестерин или флуорофор) влияет на выбор процесса сортировки. Таким образом, наличие флуорофора может влиять на оба этапа проникновения холестерин-конъюгата внутрь клеток.

3.5.3. Исследование влияния флуорофора на биологическую активность холестерин-производных siРНК в клетках KB-8-5.

Присоединение флуорофора может влиять на биологическую активность холестерин-производных 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 Липофектаминол. Для каждого конъюгата siРНК была найдена концентрация, при которой происходит подавление гена-мишени на 50 % (IC₅₀). Поскольку флуорофор Алекса 488 и репортерный белок GFP обладают одинаковыми длинами волн возбуждения и эмиссии, оценку влияния флуорофоров на биологическую активность холестерин-содержащих siРНК проводили на клетках KB-8-5 по подавлению синтеза Р-гликопротеина с помощью Вестерн блот анализа;

оценку влияния Cy5.5 на биологическую активность холестерин-содержащих siРНК проводили на клетках KB-8-5-MDR1-GFP с помощью проточной цитофлуометрии.

Было показано, что присоединение Алекса 488 к 3'- и 5'- конъюгатам несколько снижало их биологическую активность - IC₅₀ Алекса 488-меченных конъюгатов увеличивалась в 1.2- и 1.5 раз для A-siDm-3'Ch и Ch6/A-siDm, соответственно (табл. 5) (рис. 26). Присоединение Cy5.5 к холестериновым конъюгатам siРНК значительно влияло на их биологическую активность: IC₅₀ были в 2.1 и 2.7 раз больше для Cy5.5-меченных 3' и 5' - холестериновых конъюгатов, соответственно (табл. 5) (рис. 27).

Оценка биологической активности холестериновых конъюгатов siРНК при их добавлении клеткам без Липофектамина, показала, что Ch6-siDm без флуорофора наиболее эффективно подавляет экспрессию гена-мишени в обеих клеточных линиях (рис. 26 и 27). Снижение уровня экспрессии белка, кодируемого геном-мишенью под действием Ch6-siDm (5 мкМ) составило 64% в клетках KB-8-5, и 62% в клетках KB-8-5-MDR1-GFP. Другие 5' -холестериновые производные siРНК снижали уровень Р-гликопротеина менее эффективно: на 51 и 32% в случае Ch3-siDm и Ch12-siDm, соответственно. Аналогичные данные были получены с использованием клеток KB-8-5-MDR1-GFP, найденные значения IC₅₀ составляли 5.7, 3.3 и 27.7 мкМ для Ch3-siDm, Ch6-siDm и Ch12-siDm, соответственно. Биологическая активность 3'-холестеринового конъюгата siРНК не превышала 3–16 % ни в одной из модельных систем, что соответствует данным, полученным нами ранее (раздел 3.3.3., рис. 20 и 21). Присоединение A488 или Cy5.5 к Ch6-siDm практически полностью подавляло биологическую активность холестериновых конъюгатов, добавляемых к клеткам без Липофектамина (рис. 25 и 26). Присоединение Cy5.5 к неконъюгированной siDm так же не приводило к появлению биологической активности при добавлении к клеткам без трансфекционного агента (рис. 26 и 27). 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.

Наиболее значительные различия между накоплением в клетках и биологической активностью siРНК наблюдались при использовании 3' холестериновых конъюгатов siРНК при доставке без трансфекционного агента. Накопление 3' холестеринового конъюгата siРНК с флуорофором, который находится на 3' конце антисмысловой цепи (A-siDm-3'Ch и Cy-siDm-3'Ch) было намного более эффективным по сравнению с его аналогом без флуорофора (siDm-3'Ch). Однако, это увеличение не сопровождалось повышением биологической активности конъюгата, что свидетельствует о том, что его накопление X-siDm-3'Ch было «непродуктивным». Напротив, эффективность накопления

флуорофор-меченных 5'-конъюгатов (Ch6/A-siDm и Ch6/Cy-siDm) была сходной с эффективностью накопления немеченой Ch6-siDm (рис. 25А). При этом биологическая активность Ch6/A-siDm и Ch6/Cy-siDm при трансфекции с помощью Липофектамина была только немногим меньше по сравнению с 5'-конъюгатами без флуорофора.

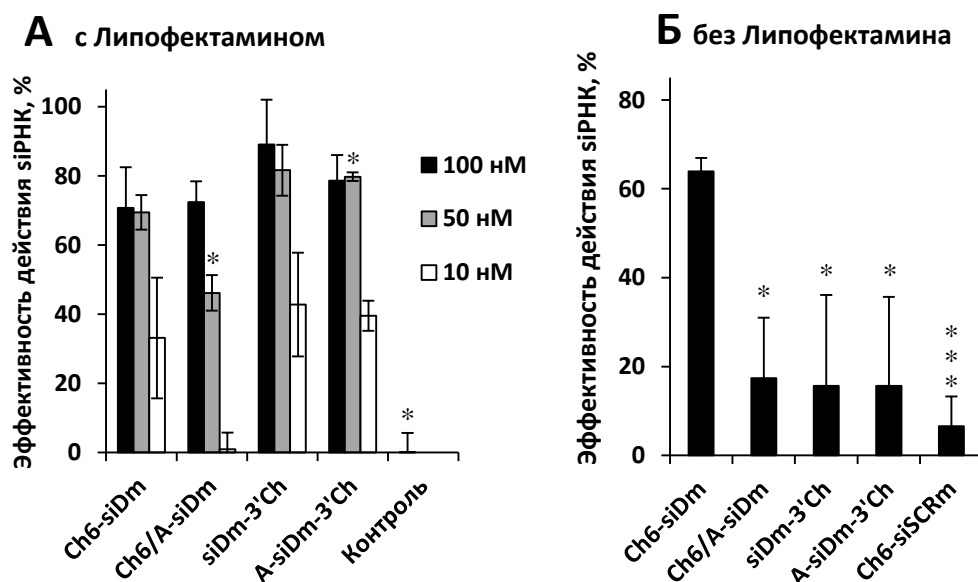


Рис. 26. Влияние присоединения Алекса 488 на биологическую активность 3' и 5'-холестериновых конъюгатов siРНК клетках KB-8-5. Подавление экспрессии Р-гликопротеина после трансфекции конъюгатов с помощью Липофектамина (10-100 нМ) (А) и без трансфекционного агента (5 мкМ) (Б). Данные получены Вестерн блот анализом через 3 (А) и 5 (Б) дней после добавления конъюгатов к клеткам, β-актин использовали в качестве внутреннего стандарта. Средние значения (±SD) и статистическая значимость различий при сравнении с эффективностью подавления конъюгата Ch6-siDm (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$), рассчитанные по результатам трёх независимых экспериментов приведены на рисунке.

Таблица 5. IC₅₀ конъюгатов siРНК.

Конъюгат ¹	KB-8-5-MDR-GFP		KB-8-5
	IC ₅₀ (с Липофектамино), нМ	IC ₅₀ (в свободном виде), мкМ	IC ₅₀ (с Липофектамино), 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/Cy-siDm	72±9	>> 5	-
Cy-siDm-3'Ch	35±12	>> 5	-
Ch6/A-siDm	-	-	58±19
A-siDm-3'Ch	-	-	26±3

1) А – Алекса 488, Cy - Cy5.5.

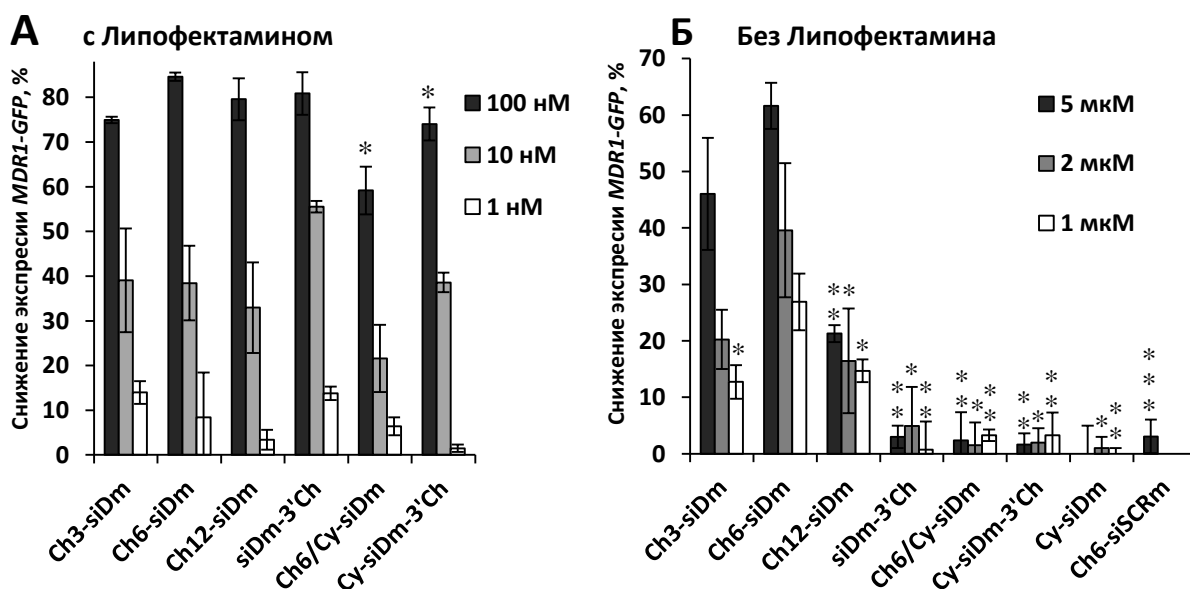


Рис. 27. Влияние присоединения Cy5.5 на биологическую активность 3' и 5'-холестериновых конъюгатов siРНК клетках KB-8-5-MDR1-GFP. Подавление Р-гликопротеина после трансфекции конъюгатов с помощью Липофектамина (1-100 нМ) (А) и без трансфекционного агента (1-5 мкМ) (Б). Данные получены при помощи проточной цитофлуометрии через 72 часа после добавления конъюгатов к клеткам. Средние значения (\pm SD) и статистическая значимость различий при сравнении с эффективностью подавления конъюгата Ch6-siDm (* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001), рассчитанные по результатам трёх независимых экспериментов приведены на рисунке.

Однако, при добавлении Ch6/A-siDm и Ch6/Cy-siDm к клеткам без Липофектамина их биологическая активность не проявлялась. Такое отсутствие корреляции между накоплением и биологической активностью конъюгатов siРНК указывает на то, что присоединение флуорофора может изменять пути проникновения холестерин-содержащих конъюгатов в клетки и приводить к изменениям их внутриклеточной локализации при их добавлении к клетками без трансфекционного агента.

Ранее было показано, что снижение биологической активности Ch12-siDm по сравнению с Ch6-siDm при трансфекции Липофектамино может быть связано с дестабилизацией дуплекса (табл. 4). Эти результаты согласуются с данными, которые показали, что после трансфекции конъюгатов с использованием Липофектамина, Ch12-siDm была менее активной, чем Ch6-siDm (IC_{50} 26 и 33 нМ для Ch6-siDm и Ch12-siDm, соответственно). Следует отметить, что, несмотря на более эффективное накопление Ch12-siDm по сравнению с Ch6-siDm при доставке без трансфекционного агента (рис. 24А), Ch12-siDm менее эффективно ингибирует экспрессию гена-мишени (рис. 27, табл. 5), что может быть частично объяснено ухудшением его термодинамической асимметрии. Однако, вероятно, основная причина низкой биологической активности Ch12-siDm при

доставке без трансфекционного агента является низкая эффективность выхода из эндосом из-за более высокой гидрофобности Ch12-siDm по сравнению с Ch6-siDm.

В данной работе были исследованы конъюгаты с двумя различными взаимными расположениями холестерина и флуорофора: 1) флуорофор обращен к той же стороне дуплекса siРНК, что и холестерин (5'-конъюгаты, Ch(n)/X-siDm); 2) флуорофор обращен к противоположной стороне дуплекса siРНК (3'-конъюгаты X-siDm-3'Ch) (рис. 24). В обоих случаях наличие флуорофоров влияло на накопление и биологическую активность конъюгатов при их добавлении к клеткам без трансфекционного агента, при этом степень этого эффекта зависела от гидрофобности флуорофора и его положения относительно холестерина. В первом случае уровень накопления флуорофор-меченого конъюгата изменялся незначительно, а во втором случае накопление конъюгата значительно повышалось, но, при этом, было «непродуктивным».

Количественная оценка накопления холестерин-содержащей siРНК, показала, что необходимо $\sim 1.3 \times 10^8$ молекул Ch6-siDm на клетку, чтобы произошло подавление гена-мишени на 50 % (рис. 25). Однако, было показано, что для достижения этого эффекта достаточно около 400 RISC* на клетку, таким образом <0,001% от общего количества холестерин-содержащей siРНК в клетке участвует в РНК интерференции [381]. Таким образом, большинство молекул конъюгата накапливаются в клетке «непродуктивно», что, с одной стороны, указывает на то, что конъюгаты siРНК обладают низкой биодоступностью *in vitro*, а с другой стороны, можно предположить, что количественная оценка накопления конъюгата не гарантирует его пропорциональную биологическую активность.

Вопрос о том, можно ли использовать флуоресцентную метку для изучения накопления конъюгатов siРНК *in vitro* и *in vivo*, необходимо рассматривать отдельно для каждого биоконъюгата. Вероятно, возможно использование флуорофоров для конъюгатов принципиально не отличающихся структурой, однако, полученные данные необходимо подтверждать альтернативными методами без использования флуоресцентной метки, такими как stem loop ПЦР [382], гибридизация с PNA (peptide nucleic acid) зондами [204] или введением альтернативных меток [383].

3.6. Исследование влияния стабильности линкера в составе холестеринных конъюгатов siРНК на их биологическую активность.

Ранее нами было показано, что конъюгат Ch12-siDm обладает высокой эффективностью накопления (рис. 9), но низкой биологической активностью (рис. 20), поскольку, предположительно, он из-за высокой гидрофобности не эффективно выходит

из эндосомного компартмента в цитоплазму. Поэтому было предложено исследовать влияние стабильности линкера в составе холестеринных конъюгатов siРНК на их биологическую активность. Для этого были синтезированы холестеринные производные siРНК, содержащие фосфамидную, гидразоновую и дисульфидную связи (рис. 28). Выбор именно этих связей был обусловлен тем, что они расщепляются в различных компартментах клетки: фосфамидная и гидразоновая связи расщепляются в кислой среде эндосомы, а дисульфидная связь восстанавливается в цитоплазме клетки [246,384]. Все конъюгаты были синтезированы в ЛХР ИХБФМ СО РАН по аналогии с [246,349].

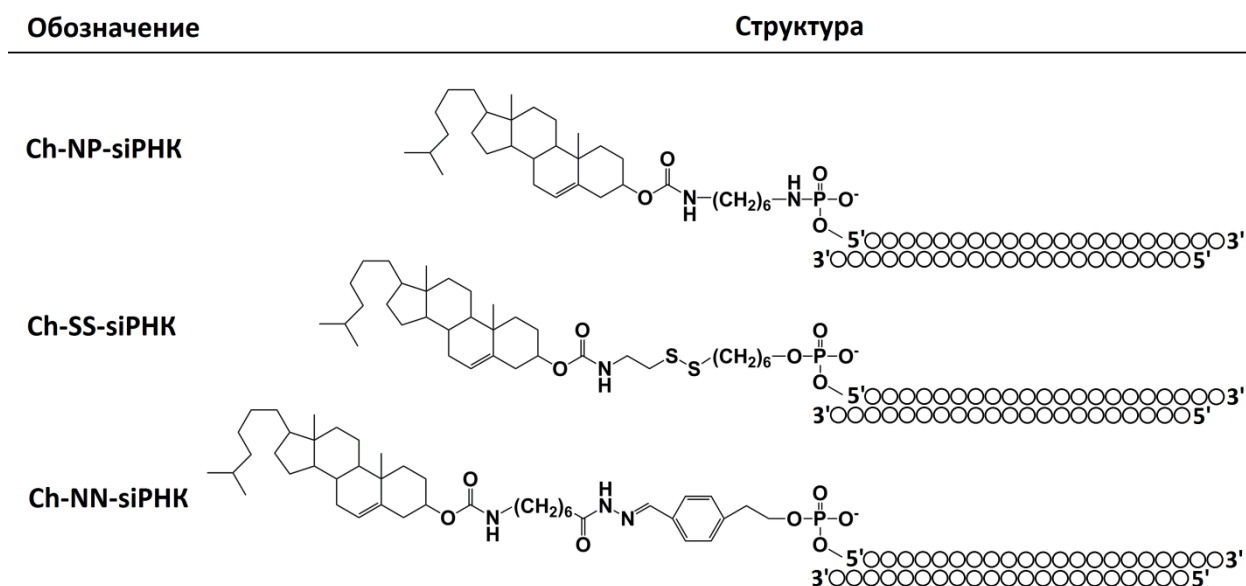


Рис. 28. Структура холестеринных производных siРНК с расщепляемыми линкерами.

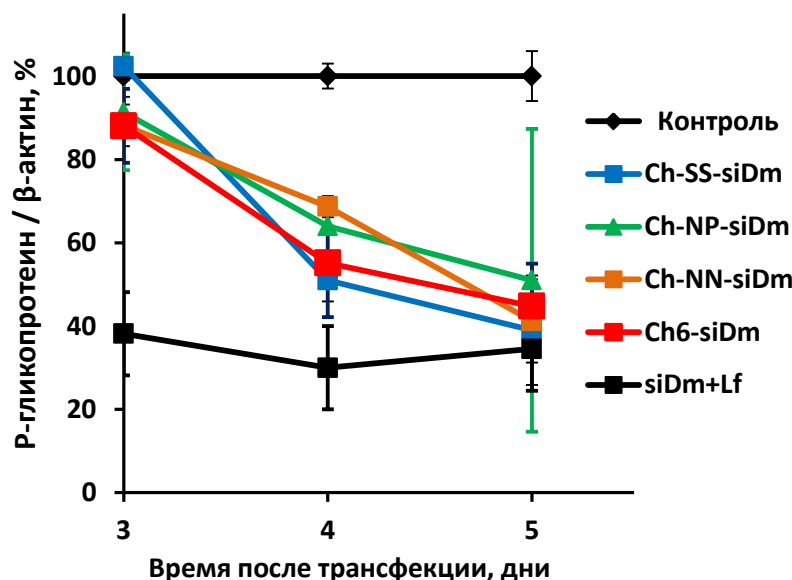


Рис. 29. Кинетика снижения уровня Р-гликопротеина в клетках KB-8-5, обработанных холестерин-содержащими анти-*MDR1* siРНК (5 мкМ). Данные получены Вестерн блота анализом с последующим количественным анализом уровня белка. Необработанные клетки использовались в качестве контроля. Средние значения (\pm SEM), рассчитанные по результатам трёх независимых экспериментов, приведены на рисунке.

Для исследования биологической активности были выбраны временные точки 3-5 дней после добавления, поскольку эффективность выхода из эндосом влияет на раннюю кинетику. В ходе работы было показано, что биологическая активность холестеринových конъюгатов siРНК, содержащих расщепляемые линкеры достоверно не отличалась от биологической активности холестеринового конъюгата siРНК, содержащего стабильный линкер, при доставке в клетки без носителя (рис. 29). Вероятно, диссоциация холестерина не влияет на эффективность выхода siРНК из поздних эндосом или лизосом, где, предположительно, должны расщепляться фосфитамидная и гидразоновая связи. Отщепление холестерина при восстановлении дисульфидной связи в цитоплазме также не приводит к увеличению биологической активности. Эти данные соотносятся с результатом, полученным нами ранее (раздел 3.3.2, рис. 19 А), где было показано, что наличие холестерина в составе siРНК значительно не влияет на процесс РНК-интерференции. С другой стороны, в работе [276] было показано, что при введении в спинной мозг холестеринových конъюгатов, большей биологической активностью обладал конъюгат, который содержал дисульфидную связь в линкере, чем конъюгат со стабильной связью. Таким образом, можно предположить, что расщепляемая связь может увеличить эффективность биологической активности siРНК на уровне организма. Однако, в другой работе было показано [385], что введение расщепляемой связи может привести значительному уменьшению биологической активности липофильного конъюгата в печени животного при его внутривенном введении.

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.

3.7. 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, фильтрация почками, элиминация фагоцитарной системой и необходимость преодолевать эндотелиальный барьер. Конъюгирование химически модифицированной siРНК с холестерином может частично преодолеть данные ограничения. Способность холестерина увеличивать биодоступность и биораспределение siРНК была продемонстрирована в нескольких исследованиях [7,273,274]. Однако, системного исследования биораспределения в

организме здоровых мышей и животных опухоленосителей холестериновых производных химически модифицированных siРНК после внутривенного введения проведено не было. Поэтому мы исследовали биораспределение и биологическую активность Ch6-siDm в здоровых мышах и в животных с привитой опухолью после внутривенной инъекции.

3.7.1. Определение динамики изменения концентрации siРНК и её холестеринового производного в крови мышей после внутривенного введения.

Определение динамики изменения концентрации в крови здоровых животных siРНК и её холестеринового производного проводили на мышах линии C57BL/6. Было показано, что уже в первой экспериментальной точке – через 5 мин после введения препаратов концентрация в крови животных значительно отличается – концентрация холестерин-содержащего конъюгата на 3 порядка превышает концентрацию неконъюгированной siРНК. В течение первого часа после введения концентрация Ch6-siDm падает примерно в 10 раз по сравнению с первой экспериментальной точкой (рис. 30), и примерно на 3 порядка уменьшается через 24 часа после введения. Следует отметить, что siРНК без холестерина значительно быстрее выводится из крови и циркулирует в ней в значительно меньших концентрациях, чем ее холестерин-содержащий аналог, хотя после 1 часа динамика изменения концентрации сильно замедляется и далее концентрация препарата в крови снижается медленно. Такая динамика, вероятнее всего, является следствием того, что через 3 часа после инъекции концентрация siDm подходит к порогу чувствительности метода Stem-loop ПЦР, поскольку нет оснований полагать, что siDm несколько часов находится в плазме крови без изменения концентрации (рис. 30).

Большая разница в скорости выведения в первые минуты после введения препарата скорее всего связана с тем, что молекулярный вес siРНК ниже критического лимита фильтрации соединений почками и она быстро выводится из кровотока. В то же время, было показано [274], что конъюгат асимметричной siРНК содержащие чередующиеся 2'-O-Me и 2'-F модификации, PS по концам дуплекса и холестерин с 3' конца смысловой цепи образуют в крови комплексы с липопротеинами, при этом молекулярная масса таких комплексов позволяет находящейся в них siРНК избегать выведения путем фильтрации. Можно предположить, что и в случае исследованного нами конъюгата, увеличение времени его циркуляции в кровотоке происходит по сходному механизму.

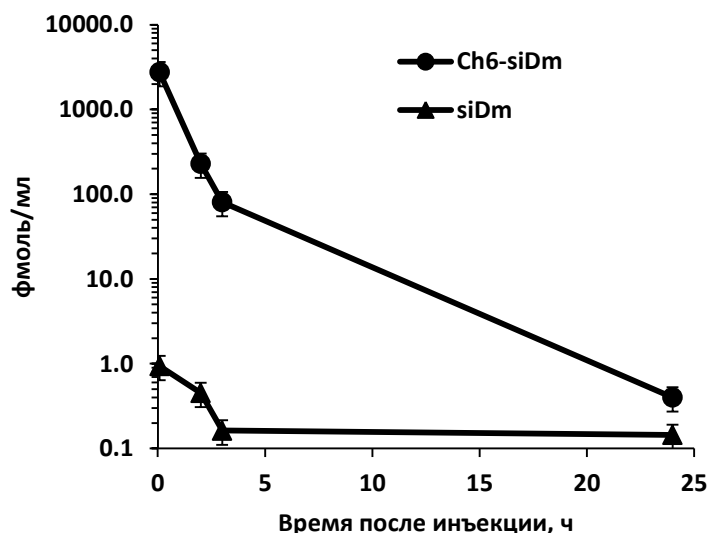


Рис. 30. Динамика изменения концентрации siРНК и её конъюгата в плазме мыши после внутривенной инъекции (0.5 мкг/г).

3.7.2. Исследование накопления холестеринowych производных siРНК в гемопоэтических клетках *in vivo*.

Исследование накопления Алекса-488 меченых Ch6-siDm и siDm в клетках крови проводили на мышах линии C57BL/6 после внутривенной инъекции 1.7 или 9 мкг/г siРНК или её холестеринowego конъюгата. Через 30 минут, 1 и 4 часа после инъекции у мышей отбирали кровь из ретроорбитального синуса, индивидуальные популяции клеток окрашивали соответствующими антителами с флуоресцентными метками и лизировали эритроциты, эффективность накопления оценивали методом проточной цитофлуометрии.

Показано, что присоединение холестерина к siРНК существенно увеличивает их способность связываться с клетками крови (рис. 31 А, Б), при этом эффективность трансфекции достигает 80-90 %. Уже через пол часа после введения Ch6/A-siDm клетки показывают значительный уровень флуоресценции, однако кинетика накопления для разных типов клеток отличается: максимальное накопление в нейтрофилах было зафиксировано через 30 минут после введения (94%, 1.4 RFU) и затем через 4 часа эффективность накопления и количество трансфецированных клеток постепенно снижаются (75%, 0.9 RFU, рис. 31 В, Г). Уровень накопления Ch6/A-siDm в моноцитах, напротив, увеличивался со временем: с 75 до 86 % и с 1.6 до 3.2 RFU в период от 30 мин до 4 часов, соответственно (рис. 31 Д, Е). Интенсивность флуоресценции Ch6/A-siDm в лимфоцитах была только в 2 раза выше, чем в контрольных клетках (0.5 RFU, рис. 31 Ж, З). siРНК без холестерина накапливалась только в моноцитах (25%, 0.5 RFU, рис. 31 Д, Е).

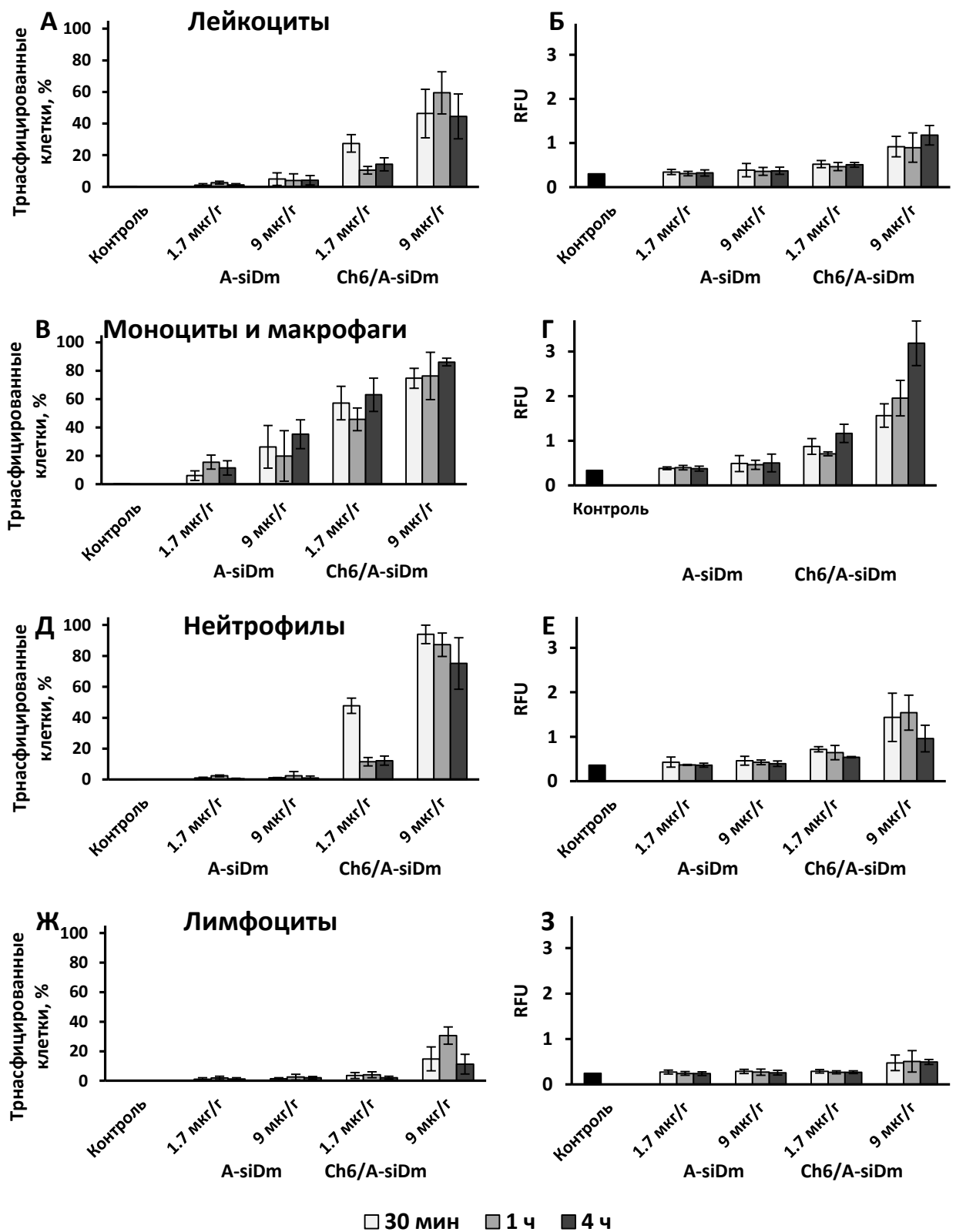


Рис. 31. Накопление флуоресцентно меченой siРНК и её конъюгата в клетках крови мыши после внутривенного введения. Доля Алекса-488-позитивных клеток (%) (А, В, Д, Ж) и интенсивность флуоресценции популяции в RFU (Б, Г, Е, З): в суммарной фракции лейкоцитов (А, Б), моноцитов и макрофагов (В, Г), нейтрофилах (Д, Е), лимфоцитах (Ж, З) через 0.5, 1 и 4 часа после внутривенной инъекции 1.7 или 9 мкг/г Ch6-siDm и siDm.

Учитывая общее количество крови мыши, доза 9 мкг/г Ch6/A-siDm примерно соответствует концентрации 8.5 мкМ. При этом эффективность накопления в Ch6/A-siDm в цельной крови человека с гепарином *ex vivo* при концентрации 5 мкМ в 4 раза больше (см. раздел 3.2.1), чем эффективность накопления Ch6/A-siDm в клетках крови мыши при дозе 9 мкг/г (4.2 и 1.1 RFU, соответственно). Данные различия могут быть обусловлены тем, что эффективность проникновения Ch6/A-siDm в клетки крови человека отличается от таковой у мышей; меньшими размерами мышинных клеток крови по сравнению с человеческими; либо тем фактом, что *in vivo* Ch6/A-siDm выводится из кровотока мыши путём фильтрации почками, либо элиминируется фагоцитарной системой животного (нейтрофилы, макрофаги и моноциты) или депонируется в различных органах и тканях (печень, селезёнка и др.). Таким образом, в экспериментах *ex vivo* концентрация конъюгата в процессе инкубации остается постоянной, что приводит к более высокой эффективности их накопления в клетках.

Моноциты и макрофаги обладают фагоцитарной активностью, за счет которой в них происходит постепенное накопление холестерин-содержащей siРНК, возможно, в составе комплексов с липопротеинами (рис. 31 Д, Е). Снижение эффективности накопления Ch6/A-siDm в нейтрофилах происходит, вероятно, из-за их быстрой миграции из кровотока в органы и ткани животного [386] и из-за постепенного снижения концентрации Ch6/A-siDm в крови (рис. 31).

Изучение накопления холестерин-содержащей siРНК в костном мозге и спленоцитах мыши проводили через 6 часов после внутривенной инъекции. Эффективность накопления siРНК в выделенных спленоцитах и клетках костного мозга оценивали методом проточной цитофлуометрии. Было показано, что присоединение холестерина не улучшает эффективность проникновения siРНК в клетки костного мозга (рис. 32 А, Б), однако, способствует увеличению накопления Ch6/A-siDm в спленоцитах мыши в 3.7 раз по сравнению с A-siDm: 70 и 2%, 1.65 и 0.45 RFU, Ch6/A-siDm и A-siDm, соответственно (рис. 32 В, Г). Следует отметить, что увеличение накопления Ch6/A-siDm в выделенных клетках может происходить не только из-за способности Ch6/A-siDm накапливаться в спленоцитах, но и быть следствием присутствия клеток крови (нейтрофилов, моноцитов и макрофагов) в селезёнке.

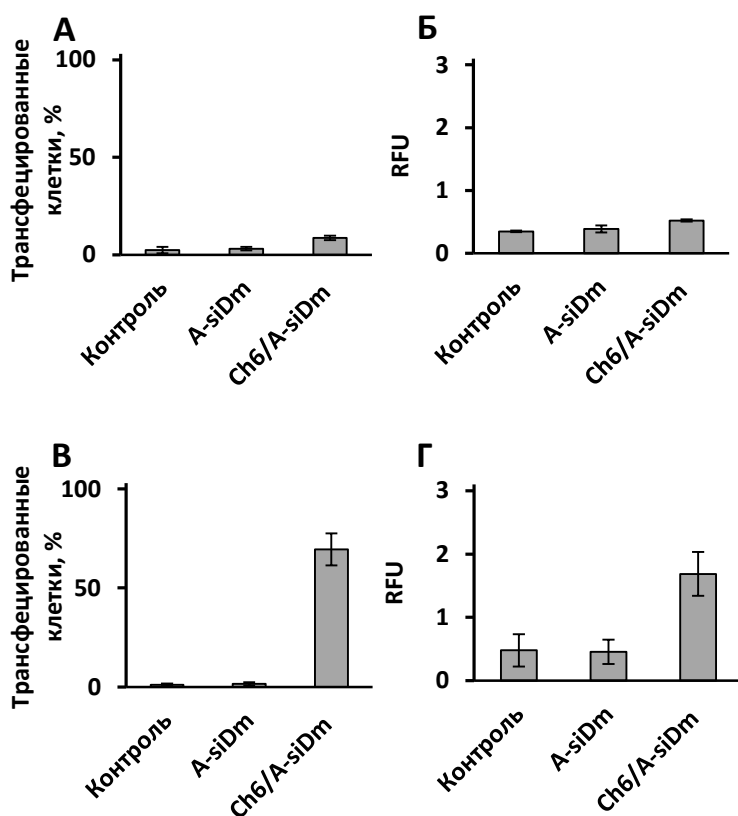


Рис. 32. Накопление флуоресцентно меченой siРНК и её конъюгата в клетках костного мозга (А, Б) и спленocyтaх (В, Г) мыши через 6 часов после внутривенной инъекции (9 мкг/г). Доля Алекса-488-позитивных клеток (%) (А, В) и интенсивность флуоресценции популяции клеток в RFU (Б, Г).

Накопление Ch6/A-siDm в спленocyтaх и клетках костного мозга после i.v. инъекции 9 мкг/г происходит примерно в 100 раз менее эффективно (1.65 и 0.3 RFU, соответственно), чем накопление Ch6/A-siDm клетках KB-3-1 или K562 в отсутствии сыворотки (105 и 89 RFU, соответственно). Поскольку подавление экспрессии *MDR1-GFP* для Ch6-siDm является дозозависимым процессом *in vitro* (рис. 27), можно предположить, что инъекция 9 мкг/г холестеринавого производного siРНК приведёт лишь к незначительному изменению уровня экспрессии гена-мишени в клетках костного мозга и спленocyтaх животного. Однако, поскольку холестеринoвый конъюгат siРНК характеризуется низкой токсичностью, для достижения терапевтически значимой концентрации теоретически возможно увеличение его дозы, как минимум, на порядок, если будет необходимо воздействовать на мишени в этих клетках.

3.7.3. Исследование влияния флуорофора на биораспределение холестеринoвой siРНК *in vivo*.

Нами было показано (раздел 3.5), 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*. Для того, чтобы оценить насколько использование флуоресцентно меченых аналогов siРНК позволяет достоверно изучить биораспределение холестерин-содержащей siРНК, а так же чтобы определить количество интактной Ch6-siDm во внутренних органах мышей мы сравнили накопление Ch6-siDm, Ch6/Cy7-siDm и Ch6/Cy-siDm в печени, почках и селезёнке мыши. Для этого через 24 часа после внутривенного введения Ch6-siDm, Ch6/Cy7-siDm или Ch6/Cy-siDm оценивали уровень их накопления методом stem-loop ПЦР, либо 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. Накопление всех исследованных конъюгатов снижалось в ряду органов: печень, почки, селезёнка (рис. 33).

Аналогичные данные по влиянию флуоресцентной метки (Cy3) на биораспределение конъюгата докозановой кислоты и ассиметричной siРНК с одноцепочечным фосфотиатным концевым участком, были получены в работе [273]. В ней было показано, что наличие Cy3 изменяет накопление конъюгата в органах и его биологическую активность в них незначительно.

В другой работе было показано, что флуорофор может оказывать влияние на накопление конъюгата siРНК и N-ацетилгалактозамина в печени мыши [274]. При этом накопление конъюгата существенно зависело от структуры siРНК в конъюгате и, соответственно, относительного положения флуорофора в нём. Было показано, что siРНК с тупыми концами, содержащая Cy3 на 5'-конце и N-ацетилгалактозамин на 3'-конце смысловой цепи, после *i.v.* инъекции накапливается в печени мышей с меньшей эффективностью, чем Cy3-меченная неконъюгированная siРНК той же структуры. При этом, аналоги этих конъюгатов, содержащие ассиметричную siРНК с фосфотиатным одноцепочечным участком показали противоположный эффект.

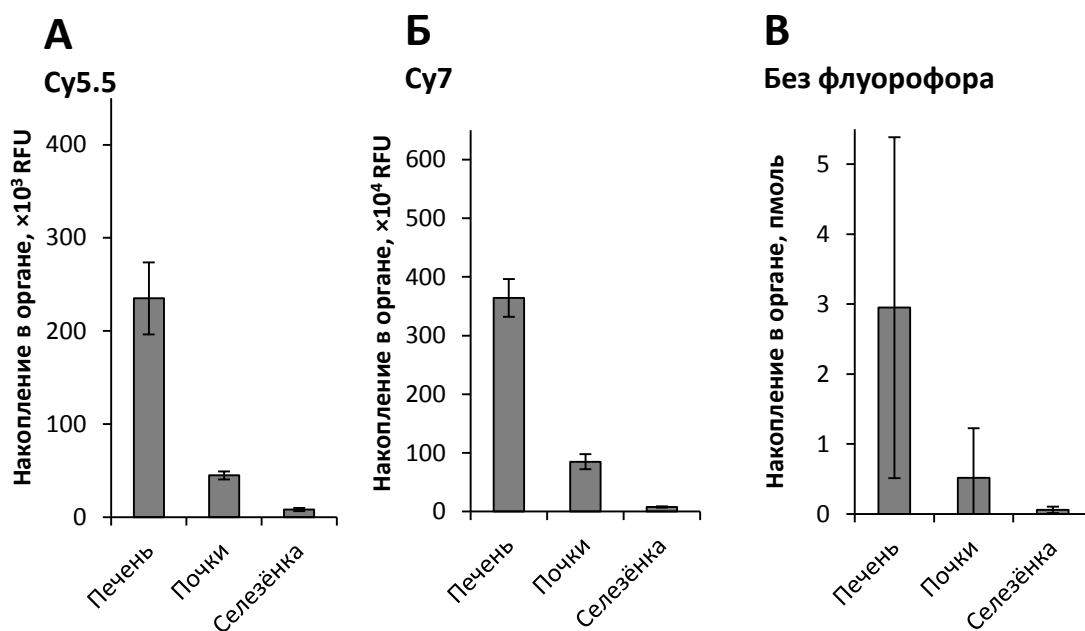


Рис. 33. Накопление холестеринового производного siРНК содержащего флуорофор Cy5.5 (Ch6/Cy-siDm) (А) или Cy7 (Ch6/Cy7-siDm) (Б), и не содержащего (Ch6-siDm) (В) флуоресцентную метку в печени, почках и селезёнке мыши через 24 часа после внутривенной инъекции (1.7 мкг/г). Стандартная ошибка среднего (SEM) по результатам двух независимых экспериментов отложена на графиках.

Такие значительные изменения в эффективности накопления могут быть обусловлены тем, что в случае siРНК с тупыми концами гидрофобный флуорофор Cy3 является более открытым для взаимодействия с компонентами сыворотки и клетками организма, чем в случае ассиметричной siРНК, где одноцепочечный участок может стерически затруднять это взаимодействие. С другой стороны, было показано, что введение фосфотиатных модификаций в одноцепочечные олигонуклеотиды способствует их связыванию с рецепторами на поверхности клеток, увеличивая эффективность накопления соответствующих олигонуклеотидов в клетках [187,387]. Таким образом, наличие в siРНК одноцепочечного фосфотиатного участка может способствовать увеличению накопления её конъюгата с N-ацетилгалактозамином за счет комбинированного эффекта. Однако, вопрос о причинах более эффективного накопления неконъюгированной siРНК с Cy3 в печени по сравнению с её конъюгатом N-ацетилгалактозамина остаётся открытым.

Нами было показано (раздел 3.5), что накопление 5'-холестеринового конъюгата siРНК содержащего флуоресцентную метку Cy5.5 либо Алекса-488 наиболее точно отражает эффективность накопления конъюгата siРНК без флуорофора в клетках KB-8-5. В свою очередь, полученные данные (рис. 33) показывают, что накопление 5'-холестеринового конъюгата siРНК содержащего флуоресцентную метку Cy5.5 или Cy7 в

во внутренних органах аналогично накоплению конъюгата siРНК без флуорофора. Поскольку анализ флуоресценции является более простым и удобным методом для оценки накопления в органах и позволяет не инвазивно визуализировать биораспределение конъюгата siРНК в животном в режиме реального времени, в наших дальнейших экспериментах мы выбрали именно этот метод для изучения Cy5.5 или Cy7-меченого 5'-холестеринового конъюгата siРНК.

3.7.4. 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 внутривенной (i.v.), внутрибрюшинной (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». В ходе работы было показано, что после i.v. инъекции холестериновый конъюгат siРНК быстро распространяется через кровотоки по всему организму: уже через 5 минут после инъекции флуоресцентный сигнал детектировался от всего тела животного (рис. 34). При дальнейшем наблюдении распределение изменялось незначительно, можно было наблюдать только небольшое уменьшение общей интенсивности флуоресценции тела через 24 часа после инъекции (рис. 34 А). Через 5 минут после i.p. инъекции флуоресценция Ch6/Cy7-siDm наблюдалась в основном в брюшной полости животного, позже медленно распространялась по всему телу: через 2-4 часа после инъекции накопление Ch6/Cy7-siDm наблюдалось в нижней части тела животного. Через 24 часа после i.p. инъекции характер распределения был аналогичен таковому у мышей, которым вводили Ch6/Cy7-siDm внутривенно (рис. 34 А). 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 (рис. 34 А).

Через 24 часа после введения препаратов животных подвергали эвтаназии методом дислокации шейных позвонков, извлекали органы и определяли их флуоресценцию. Для того, чтобы оценить суммарное количество накопленного холестеринового конъюгата siРНК во внутренних органах были рассчитаны значения интенсивности флуоресценции Ch6/Cy7-siDm от всех органов суммированием флуоресценции от мозга, сердца, легких, печени, селезенки и почек, измеренной в RFU. Было показано, что через 24 часа после i.v. и i.p. введения, общее количество Ch6/Cy7-siDm, накопленной во внутренних органах,

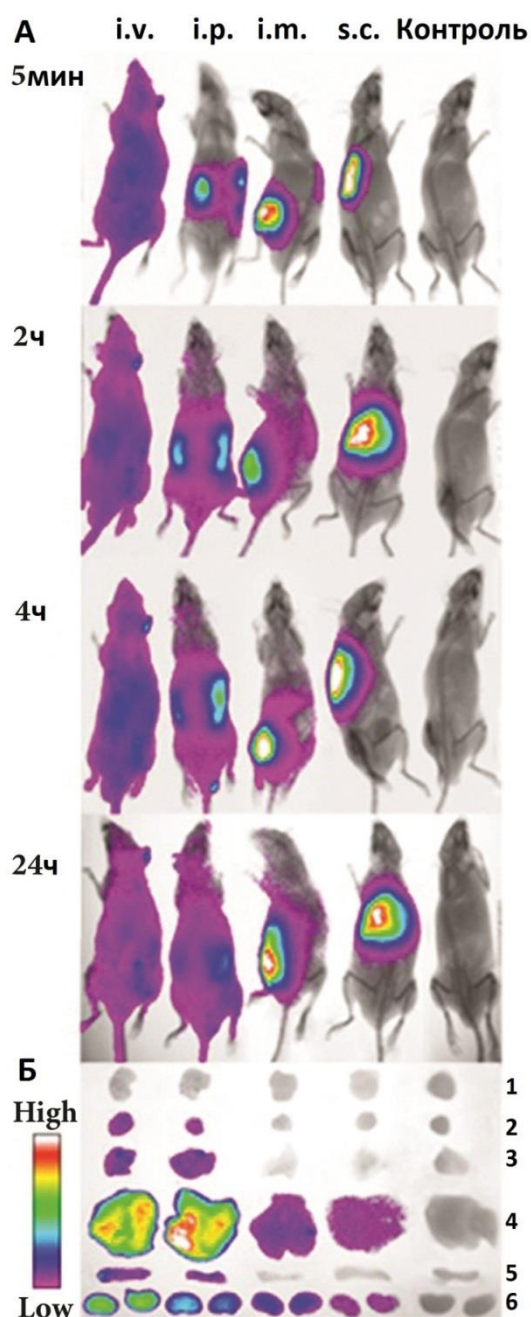


Рис. 34. Влияние типа введения на биораспределение Cy7-меченного холестерина конъюгата siРНК в мышцах линии SCID. А) Флуоресцентная визуализация мышей после i.v., i.p., i.m. и s.c. инъекции Ch6/Cy7-siDm через 5 мин, 2, 4 и 24 часа после введения (дорсальная ориентация животных). Б) Изображения органов мышей через 24 часа после введения Ch6/Cy7-siDm: 1 – мозг, 2 – сердце, 3 – легкие, 4 - печень, 5 - селезёнка, 6 – почки.

Таблица 6. Накопление Ch6/Cy7-siDm во внутренних органах мышей линии SCID через 24 часа после введения.

	Интенсивность флуоресценции органа, RFU×10 ⁴				Доля флуоресценции органа относительно флуоресценции всех органов мыши, %			
	i.v.	i.p.	i.m.	s.c.	i.v.	i.p.	i.m.	s.c.
Мозг	0	0	0	0	0	0	0	0
Сердце	2.7±0.9	0.7±0.4	0	0	0.6±0.2	0.1±0.1	0	0
Легкие	7.2±2.8	8.6±2	0	0	1.5±0.6	1.8±0.4	0	0
Печень	364±45	412±69	26±5	8.1±2.1	78±10	88±15	58±12	80±21
Почки	85±18	44±18	18±4	2±0.8	18±4	9.3±2.5	42±9	20±18
Селезёнка	7.7±1.5	3±1.5	0	0	1.6±0.7	0.6±0.3	0	0
Всего	466±70	468±85	44±9	10.1±2.9	100	100	100	100

было сходным: 466 и 468×10^4 RFU после *i.v.* и *i.p.* инъекций, соответственно (рис. 34 Б, табл. 6). Характер биораспределения Ch6/Cy7-siDm после *i.v.* и *i.p.* введения был также сходным: основная часть Ch6/Cy7-siDm накапливалась в печени: 78% (*i.v.*) и 88% (*i.p.*), некоторое количество накапливалось в почках: 18% (*i.v.*) и 9,3% (*i.p.*), и только небольшая часть была обнаружена в сердце (0,1–0,6%), легких (1,5–1,8%) и селезенке (0,6–1,6%) (табл. 6).

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 (табл. 6).

Полученные нами данные отличаются от результатов, полученных в работе [238], поскольку авторы статьи использовали другую структуру siРНК и другой паттерн химических модификаций. В работе было проведено сравнение *i.v.* и *s.c.* способов введения для конъюгата siРНК содержащей чередующиеся 2'О-Ме и 2'F модификации, PS по концам дуплекса и холестерин с 3' конца смысловой цепи. Было показано, что после *s.c.* введения конъюгат в примерно в 1.5 раза более эффективно накапливается в печени, почках и селезенке мыши по сравнению с *i.v.* инъекцией. Авторы статьи также сравнивали накопление этого конъюгата с его аналогом содержащим альтернативный паттерн химических модификаций - 2'О-Ме и 2'F модификации, были расположены только по пиримидинам и концам дуплекса, а PS модификации только на выступающих с 3'-концевых нуклеотидах. Было показано, что конъюгат с чередующимися 2'О-Ме и 2'F и дополнительными PS модификациями с 5' концов siРНК накапливался в печени, почках и селезенке на два порядка эффективнее по сравнению с конъюгатом, содержащим альтернативный паттерн химических модификаций как после *s.c.*, так и *i.v.* введений [238]. Авторы связывают это с более высокой стабильностью siРНК с чередующимися 2'О-Ме и 2'F и дополнительными PS модификациями с 5' концов в условиях организма.

Результаты оценки влияния способа введения siРНК на её биораспределение были описаны для конъюгата siРНК и N-ацетилгалактозамина. Было показано, что накопление в печени мыши происходит в 4 раза более эффективно через 24 часа после *s.c.* инъекции, чем после *i.v.* инъекции [15]. Дополнительное введение PS модификаций по концам дуплекса способствовало тому, что через 24 часа оба типа введения показали одинаковую эффективность накопления [239]. При этом, значительные различия между способами введения наблюдались в фармакокинетических параметрах, оценивающих накопление конъюгатов в печени через несколько дней после инъекции – суммарное накопления после *s.c.* инъекции было в 2 раза выше, чем после *i.v.*. Таким образом, можно сделать

вывод, что тип введения, как и паттерн химических модификаций являются важными факторами, определяющими биораспределение конъюгатов siРНК.

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.

3.7.5. 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 в мышцах линии SCID, для инициации которой им подкожно вводили 10^6 клеток KB-8-5. Животным со сформировавшимися опухолями (200 мм^3) внутривенно вводили Ch6/Cy-siDm, Cy-siDm или комплексы Липофектамина с Cy-siDm, через 24 часа анализировали флуоресценцию внутренних органов. Было показано, что суммарное количество Ch6/Cy-siDm накопленной во внутренних органах было в 2.4 раза выше, чем количество неконъюгированной siРНК и в 50 раз выше, чем siРНК, доставленной при помощи Липофектамина 2000 (рис. 35; табл. 7). Следует отметить, что наличие опухоли в организме не влияло на характер биораспределения Ch6/Cy-siDm во внутренних органах, который был схож с распределением Ch6/Cy7-siDm в здоровых мышцах (рис. 34, табл. 6), за исключением того факта, что Ch6/Cy-siDm, помимо остальных органов, накапливалась в опухоли. При этом, несмотря на небольшой размер опухоли относительно массы мышцы (~0.4 %), в ней происходило эффективное накопление Ch6/Cy-siDm, которое составляло 6 % относительно суммарной флуоресценции Ch6/Cy-siDm внутренних органов (табл. 7). Накопление неконъюгированной siРНК в опухоли было в 3.5 ниже в абсолютных значениях RFU, чем Ch6/Cy-siDm и составляло только 4% от суммарного количества накопленной Cy-siDm в органах. Биораспределение Cy-siDm также отличалось от Ch6/Cy-siDm: бóльшая часть Cy-siDm накапливалась в почках (94%), 4% в опухоли, 1.6% в печени и менее 1% в селезенке (табл. 7). При введении siРНК в комплексе с Липофектаминоm её накопление также наблюдалось в основном в почках (93%), небольшое количество siРНК было обнаружено в печени (6.7%), однако, флуоресценции в опухоли обнаружено не было. Таким образом, конъюгирование холестерина с siРНК позволило увеличить накопление siРНК в опухоли как в абсолютных значениях флуоресценции (RFU), так и по сравнению с общим количеством siРНК, накопленным во внутренних органах.

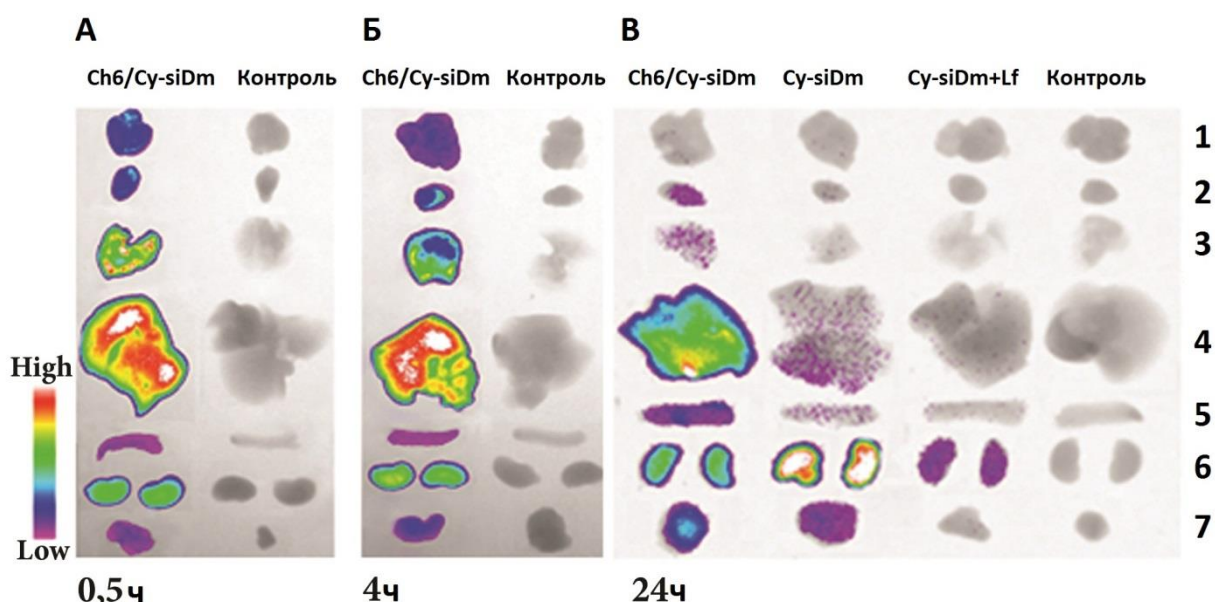


Рис. 35. Накопление Cy5.5-меченного холестерина конъюгата siРНК во внутренних органах мышей линии SCID с привитой опухолью KB-8-5 через 0.5 (А) 4 (Б) и 24 (В) часа после i.v. инъекции; 1 -мозг, 2 – сердце, 3 – легкие, 4 - печень, 5 - селезёнка, 6 – почки, 7 – опухоль.

Таблица 7. Накопление Ch6/Cy-siDm во внутренних органах мышей линии SCID с привитой опухолью KB-8-5 через 24 часа после i.v. введения.

	Интенсивность флуоресценции органа, $\times 10^3$ RFU					Доля флуоресценции органа относительно флуоресценции всех органов мыши, %				
	Ch6/Cy-siDm			Cy- siDm	Cy- siDm+Lf	Ch6/Cy-siDm			Cy- siDm	Cy- siDm+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±0.01	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±0.05	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

Накопление терапевтических агентов в органах в основном определяется продолжительностью их присутствия в кровотоке и их способностью проникать через стенку сосуда внутрь органа [388]. Поскольку присоединение холестерина к siРНК способствует увеличению её продолжительности пребывания в кровеносной системе

животного, это приводит к увеличению накопления siРНК в опухоли. Известно, что развитие солидной опухоли сопровождается усиленным ангиогенезом, при котором образовавшиеся сосуды отличаются по морфологии и характеризуются большим размером межклеточного расстояния и более высокой проницаемостью. Данная особенность, вместе с ухудшенным лимфодренажем обуславливает эффект повышенной проницаемости и удержания (EPR- эффект, Enhanced Permeability and Retention) частиц размером около 100 нм и липидов [389,390]. Известно, что эффективное действие многих противоопухолевых препаратов обеспечивается именно за счет EPR-эффекта, который так же способствует накоплению в опухоли холестерин-содержащей siРНК.

Для того, чтобы оценить динамику накопления Ch6/Cy-siDm мы изучили её биораспределение в органах через более короткие промежутки времени после введения: через 30 минут и 4 часа (рис. 35, табл. 7). Временные точки были выбраны в соответствии с ранее полученными нами данными о накоплении холестерин-содержащей siРНК в клетках KB-8-5 (рис. 16). Было показано, что максимальное накопление Ch6/Cy-siDm наблюдалось в печени уже через 30 минут после введения, а дальнейший уровень флуоресценции практически не изменялся до 24 часов. Накопление Ch6/Cy-siDm в почках, селезенке и опухоли постепенно увеличивалось со временем, причем наиболее значительное накопление зафиксировано в опухоли через 24 часа (табл. 7). Уровень флуоресценции других органов - мозга, сердца и легких, напротив, был максимальным через 30 минут и постепенно снижался до нуля, что указывает на то, что холестерин-содержащая siРНК, вероятно, находилась в крови, которая заполняла эти органы в начальные моменты времени.

Таким образом, присоединение холестерина к siРНК обеспечило её эффективное накопление в печени и в опухоли и уменьшало её выведение почками после внутривенной инъекции. Такие изменения биораспределения siРНК сопровождались увеличением времени её циркуляции в кровотоке (рис. 30), что так же косвенно подтверждается наличием флуоресцентного сигнала, а затем постепенным его исчезновением в органах с хорошим кровоснабжением - мозге, сердце и легких.

Основными факторами, влияющими на биораспределение холестеринового конъюгата siРНК являются эффективность образования комплекса конъюгата с липопротеинами и уровнем экспрессии соответствующего рецептора к липопротеину в органе [7]. Было показано, что после i.v. инъекции хомякам *Mesocricetus auratus* холестеринового производного siРНК, его взаимодействие происходит со всеми типами липопротеинов и меньше с альбумином [7].

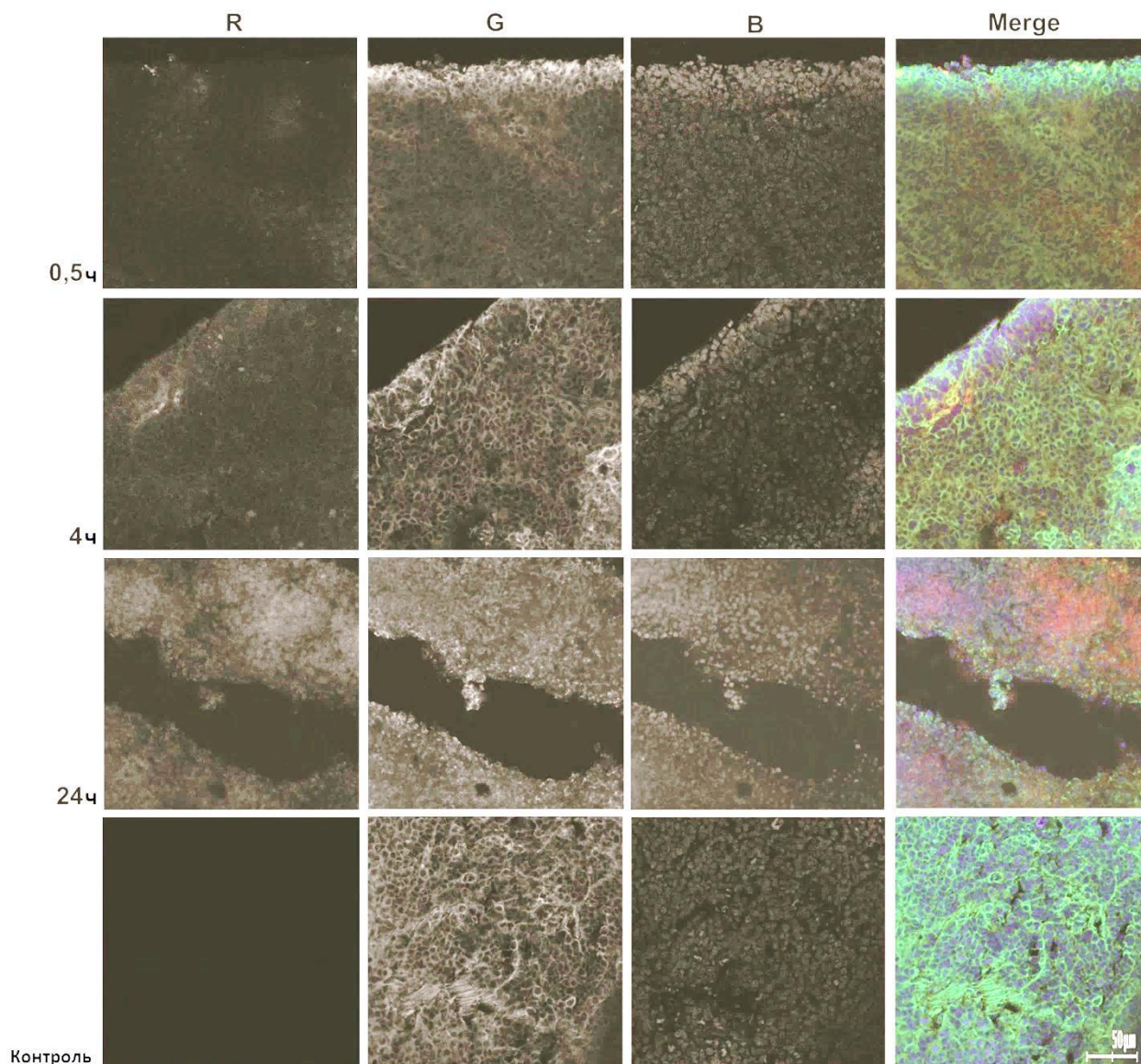


Рис. 36. Локализация холестерин-содержащей siРНК в ксенографтной опухоли KB-8-5 мышей линии SCID через 0.5, 4 и 24 часа после i.v. инъекций. Анализ флуоресценции Ch6/Cy-siDm (R) проводили помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии (20× увеличение) после фиксирования и окрашивания образцов TRITC-Фаллоидином (G) и DAPI (B). Merge – наложение флуоресценции в каналах R, G и B.

Однако, в другой работе было показано, что в крови мыши после i.v. инъекции взаимодействие холестеринового конъюгата siРНК происходит преимущественно с ЛПНП-частицами, меньше с ЛПВП и ЛПОНП-частицами (липопротеины очень низкой плотности) [274].

Поскольку наибольшая экспрессия как ЛПНП, так и ЛПВП рецепторов наблюдается в гепатоцитах, именно в печени происходит накопление основной части Ch6/Cy7-siDm (рис. 34). Накопление липофильных производных siРНК в других органах в меньшей степени зависит от экспрессии ЛПНП-рецепторов [7,274], так, например, легкие являются хорошо кровоснабжаемым органом, поэтому на начальных временных

промежутках после введения Ch6/Cy7-siDm можно наблюдать флуоресценцию. Селезёнка осуществляет функцию депонирования крови, поэтому в ней так же наблюдается большее накопление флуоресценции в ранние промежутки времени после введения Ch6/Cy7-siDm.

Чтобы оценить, как Ch6/Cy-siDm распределялась в тканях органов, где было обнаружено ее максимальное накопление, исследовали срезы этих органов с помощью конфокальной микроскопии (рис. 36, 37). Временные точки для срезов печени и опухоли - 30 минут, 4 и 24 часа были выбраны на основе данных биораспределения (табл. 7).

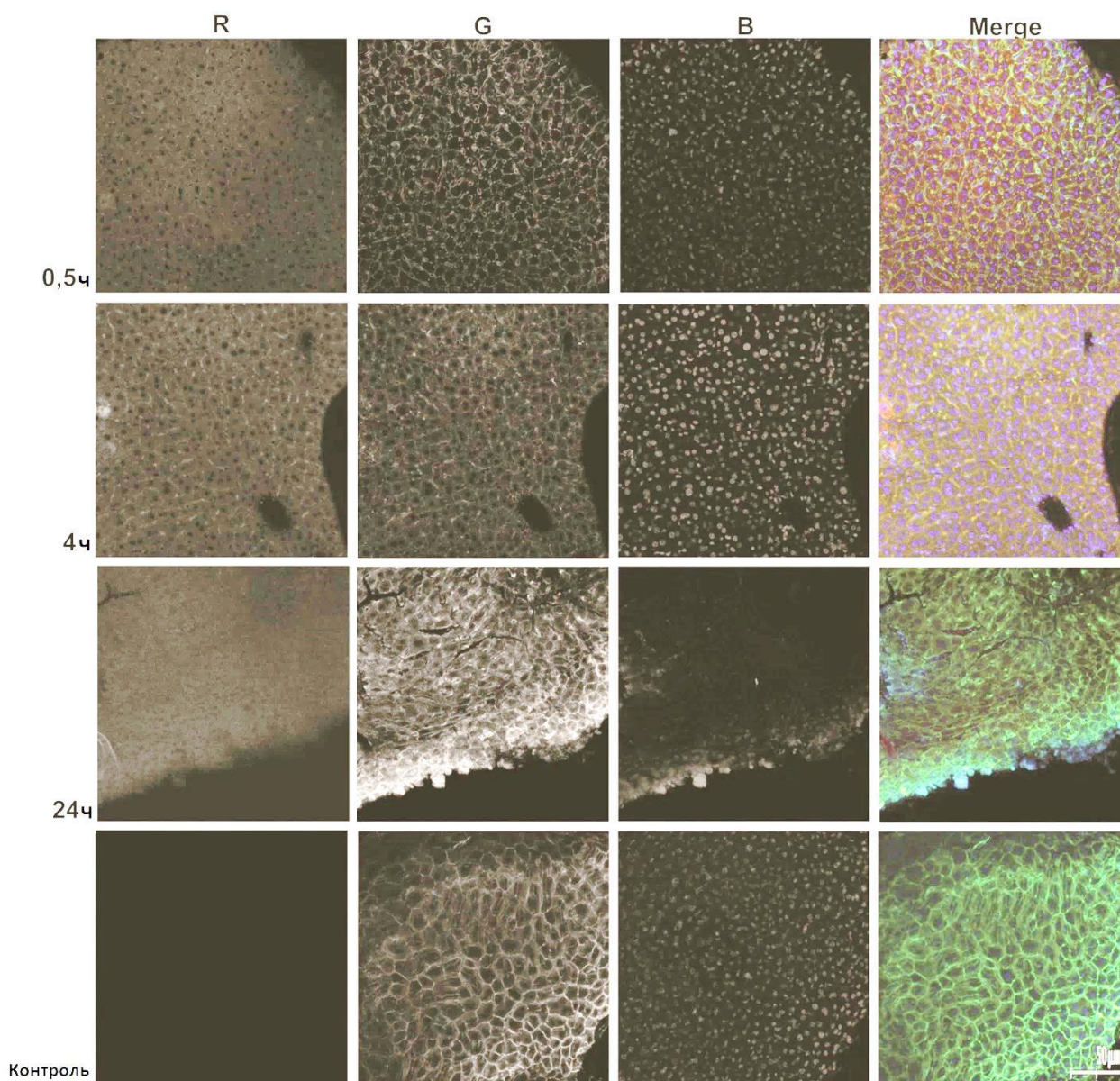


Рис. 37. Локализация холестерин-содержащей siРНК в печени мышей линии SCID через 0.5, 4 и 24 часа после i.v. инъекций. Анализ флуоресценции Ch6/Cy-siDm (R) проводили помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии (20× увеличение) после фиксирования и окрашивания образцов TRITC-Фаллоидином (G) и DAPI (B). Merge – наложение флуоресценции в каналах R, G и B.

Было показано, что Ch6/Cy-siDm распределялась по всему объему опухоли, при этом количество Ch6/Cy-siDm в опухолевой ткани увеличивалось с течением времени после инъекции до 24 часов, что соответствует данным биораспределения (табл. 7). Через 30 минут и 4 часа после введения Ch6/Cy-siDm была неравномерно распределена в ткани и располагалась преимущественно в цитоплазме, а не в ядре (рис. 36). При этом области опухоли, клетки которых содержали более высокие концентрации Ch6/Cy-siDm не отличались визуально по морфологии от других областей и соседних клеток. Через 24 часа после инъекции распределение siРНК в опухолевой ткани стало более равномерным (рис. 36).

Интенсивность флуоресценции Ch6/Cy-siDm на срезах печени была более высокой, чем на срезах опухоли, и, в отличие от опухоли, практически не менялась со временем, что согласуется с данными биораспределения (табл. 7; рис. 37). Ch6/Cy-siDm была равномерно распределена в ткани печени, однако, через 30 мин и 4 часа после введения значительное количество Ch6/Cy-siDm локализовалось в межклеточном пространстве. Через 24 часа Ch6/Cy-siDm была расположена, в основном, в цитоплазме клетки, но не в ядре.

3.7.6. Исследование подавления экспрессии Р-гликопротеина в опухоли холестеринным производным анти-*MDR1* siРНК.

Биологическую активность холестеринного производного siРНК, направленной на ген *MDR1* исследовали на лекарственно устойчивой ксенографтной опухоли KB-8-5 (рис. 38). Для этого мышам линии SCID подкожно вводили клетки KB-8-5, после чего животным со сформировавшимися опухолями делали инъекции 10 мкг/г Ch6-siDm и через 3-8 дней Вестерн блотом оценивали уровень Р-гликопротеина в клетках опухоли. Временные точки кинетики были выбраны исходя из данных полученных нами ранее *in vitro* (рис. 20). Было показано, что 40% снижение уровня Р-гликопротеина наблюдалось на четвертый день после введения siРНК; далее через 5 и 6 дней после введения уровень продолжал снижаться, достигнув минимума (40% от контроля) на шестой день. Затем наблюдалось постепенное повышение уровня Р-гликопротеина и его исходный уровень восстановился к восьмому дню (рис. 38). Такая эффективность и продолжительность снижения уровня Р-гликопротеина являются терапевтически значимыми, поскольку клинически наблюдаемая повышенная экспрессия гена *MDR1*, которая приводит к лекарственной устойчивости опухоли, только в 2 раза выше, чем уровни в опухолях, чувствительных к лекарственным препаратам [391].

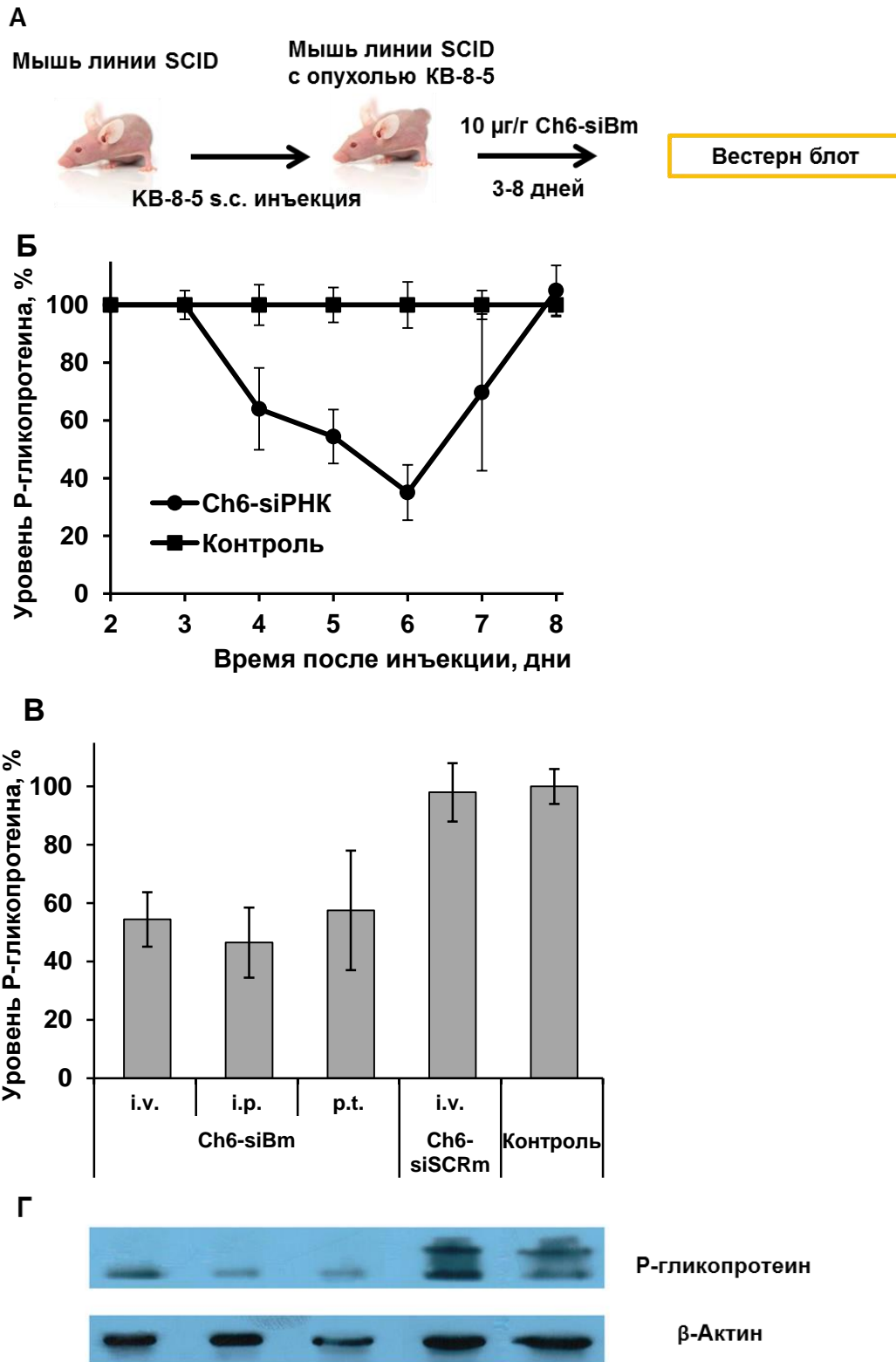


Рис. 38. Подавление экспрессии Р-гликопротеина в опухоли холестеринавым конъюгатом siPHK. (А) Схема эксперимента. (Б) Кинетика подавления уровня Р-гликопротеина в ксенографтной опухоли KB-8-5 после i.v. инъекции Ch6-siDm. (В)) (Г) Уровень Р-гликопротеина в ксенографтной опухоли KB-8-5 через 5 дней после i.v., i.p., или p.t. инъекций Ch6-siDm; пример анализа Вестерн блотом (Г). β-Актин использовался в качестве внутреннего контроля. Стандартное отклонение (\pm SD), рассчитанные по результатам трёх независимых экспериментов приведены на графиках.

Влияние способа введения Ch6-siBm на её биологическую активность изучали с использованием той же опухолевой мышинной модели. Для этого делали i.v., i.p. или перитуморальную (p.t.) инъекции 10 мкг/г Ch6-siBm или Ch-siSCRM; через 5 дней после введения siРНК оценивали уровень Р-гликопротеина в опухоли с помощью Вестерн-блота (рис. 38 В, Г). Данные показывают, что независимо от способа введения (i.v., i.p или p.t.) Ch6-siBm 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-siBm может быть выбран любой, наиболее удобный и наименее инвазивный метод. Например, в случае определённой локализации опухоли перитуморальное введение холестерин-содержащей siРНК может снизить нагрузку на организм и обеспечить более целенаправленное действие, тогда как i.v. или i.p. инъекции могут быть использованы в тех случаях, когда можно ожидать наличие метастазов в других органах.

Подавление экспрессии Р-гликопротеина анти-*MDR1* siРНК было описано в ряде работ как *in vitro* [392-396], так и *in vivo* [397-400]. При этом, ксенографтные опухоли были получены в основном инъекцией клеток производных линии MCF7, полученные путем отбора по устойчивости к доксорубину [397,398,400]. Например, в работе [397] мышам с привитой лекарственно устойчивой опухолью MCF7/AD (*in vitro* IC₅₀ для доксорубина 30 нМ) еженедельно i.v. вводили siРНК в комплексе с катионными липидами и через 5 дней после пятого введения наблюдали снижение уровня экспрессии на 60 %. Авторы наблюдали редукцию опухолей в данной группе мышей под действием монотерапии доксорубином (2 мг/г в неделю). В другой работе [398] было показано, что мышам с привитой лекарственно устойчивой опухолью MCF7/ADR (*in vitro* IC₅₀ для доксорубина ~30 нМ) каждые 4 дня i.v. вводили siРНК при помощи липидных наночастиц и через 22 дня снижение экспрессии Р-гликопротеина составило 90 %. Однако, монотерапия доксорубином каждые 4 дня в течении 22 дней (4.4 мг/г в неделю) привела лишь к частичному снижению роста опухоли.

Наиболее продвинутые липидные наночастицы на сегодняшний день, используемые в препарате Onpattro представляют собой смесь катионного липида, фосфолипидов, холестерина и конъюгата полиэтиленгликоля и липида [342]. При этом, введение этого препарата необходимо сочетать с кортикостероидами, ацетаминофеном и антигистаминами, более того, его побочные эффекты включают покраснение, тошноту, боль в спине, животе и голове и затрудненное дыхание. Поскольку в данных работах доставка siРНК была осуществлена при помощи катионных липидов [397,398,400] или наночастиц [399] токсичность и перспективность таких методов оставляет вопросы.

Поэтому конъюгат siРНК и холестерина является наиболее перспективным агентом для создания на его основе препаратов siРНК для подавления экспрессии Р-гликопротеина в клинической практике.

Заключение.

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. Поэтому исследования влияния структуры холестеринового конъюгата siРНК на его накопление и биологическую активность в опухолевых клетках различного происхождения, а также определение накопления и биологической активности выбранного конъюгата *in vivo* являются актуальными. Впервые проведенное в данной работе систематическое исследование структурно-функциональных закономерностей свойств биоконъюгатов siРНК на нескольких моделях позволило сформулировать принципы конструирования ингибиторов экспрессии терапевтически значимых генов на основе химически модифицированных siРНК, способных эффективно накапливаться в опухоли и оказывать биологический эффект *in vivo*. Показано, что 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.

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 нами было уделено особое внимание оценке возможности использования биоконъюгатов для доставки siРНК в гемопоэтические клетки. В качестве моделей для сравнения эффективности биологического действия конъюгатов анти-*MDR1* siРНК в опухолевых клетках различного происхождения нами были получены модельные клеточные линии K562, KB-8-5 и KB-3-1, экспрессирующие мРНК гена-мишени слитую с мРНК флуоресцентного репортерного белка GFP.

Было показано, что, несмотря на высокую эффективность накопления Ch6-siРНК в опухолевых клетках гемопоэтического происхождения, конъюгат не обладал в них биологической активностью, в то время как в клетках карциномы KB-3-1 и KB-8-5, в том числе в лекарственно устойчивых клетках (KB-8-5) он был активен. Для установления причин такого отличия был изучен механизм накопления флуорофор-меченого Ch6-siРНК в клетках KB-3-1 и K562. Было установлено, что его накопление происходит по нескольким механизмам, однако, использованные в работе ингибиторы разных типов эндоцитоза не снижали биологическую активность конъюгата без флуоресцентной метки. Данный факт указывает на то, что большая часть конъюгата накапливается в клетках «непродуктивно» и не участвует в РНК-интерференции. Исследование «продуктивного» способа проникновения siРНК в клетки-мишени может способствовать разработке биоконъюгатов siРНК более эффективно накапливающихся в клетках. Следует отметить, что наиболее простым и распространённым в лабораторной практике методом изучения локализации и накопления siРНК является ведение флуоресцентных меток в их состав. Однако, в данной работе нами впервые было показано, что конъюгирование флуорофоров с холестерин-содержащими siРНК может влиять на их накопление и биологическую активность при доставке без трансфекционного агента. Поэтому, для исследования накопления и локализации конъюгатов siРНК полученные данные необходимо подтверждать альтернативными методами без использования флуоресцентной метки.

Исследования на животных моделях являются важной частью оценки терапевтического потенциала препарата, поэтому для исследования биораспределения и биологической активности холестеринового производного анти-*MDR1* siРНК выбранной структуры мы использовали клетки лекарственно-устойчивой опухоли человека KB-8-5 привитые мышам линии SCID. При переходе от культуры клеток к воздействию на организм первоочередной задачей является обеспечение эффективного накопления препарата в органах-мишенях. Поэтому, исключительно важным является обнаруженный нами факт, что присоединение холестерина к siРНК обеспечивает её эффективное накопление в печени и в опухоли и уменьшает её выведение почками после i.v. инъекции. Другим важным параметром является эффективность биологического действия, то есть способность подавлять экспрессию гена-мишени. Нами было установлено, что эффективное подавление гена-мишени и снижение уровня Р-гликопротеина в привитой ксенографтной опухоли наблюдается после внутривенной, интраперитонеальной или перитуморальной инъекции Ch6-siРНК. В случае определённой локализации опухоли перитуморальное введение обеспечит наибольшую специфичность доставки Ch6-siРНК. Внутривенный или интраперитонеальный типы введения могут быть использованы в

случае высокой вероятности наличия метастазов и распространения опухолевых клеток по организму. Таким образом, в процессе выполнения данной работы был идентифицирован и изучен селективный ингибитор экспрессии Р-гликопротеина, показавший свою эффективность действия *in vitro* и *in vivo*, который может рассматриваться как потенциальный терапевтический препарат для преодоления множественной лекарственной устойчивости опухолей.

4. 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 литохолоевой кислоты, олеиламида литохолоевой кислоты или α -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 доставке 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'-холестеринного 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.

- 5'Ch-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.

- 5'Ch-siРНК эффективно накапливается и подавляет экспрессию гена *MDR1* в ксенографтной опухоли KB-8-5 после внутривенного, интраперитонеального или перитуморального введения.

Список литературы

1. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. // *Nature*. - 1998. -V. 391, - P. 806-11.
2. Kanasty, R.L., Whitehead, K.A., Vegas, A.J. and Anderson, D.G. Action and reaction: the biological response to siRNA and its delivery vehicles. // *Mol Ther*. - 2012. -V. 20, - P. 513-24.
3. Zatsepin, T.S., Kotelevtsev, Y.V. and Koteliansky, V. Lipid nanoparticles for targeted siRNA delivery - going from bench to bedside. // *Int J Nanomedicine*. - 2016. -V. 11, - P. 3077-86.
4. Lorenz, C., Hadwiger, P., John, M., Vornlocher, H.P. and Unverzagt, C. Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells. // *Bioorg Med Chem Lett*. - 2004. -V. 14, - P. 4975-7.
5. Nishina, K., Unno, T., Uno, Y., Kubodera, T., Kanouchi, T., Mizusawa, H. and Yokota, T. Efficient in vivo delivery of siRNA to the liver by conjugation of alpha-tocopherol. // *Mol Ther*. - 2008. -V. 16, - P. 734-40.
6. Soutschek, J. et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. // *Nature*. - 2004. -V. 432, - P. 173-8.
7. Wolfrum, C. et al. Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. // *Nat Biotechnol*. - 2007. -V. 25, - P. 1149-57.
8. Raouane, M., Desmaele, D., Urbinati, G., Massaad-Massade, L. and Couvreur, P. Lipid conjugated oligonucleotides: a useful strategy for delivery. // *Bioconjug Chem*. - 2012. -V. 23, - P. 1091-104.
9. Dassie, J.P. et al. Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. // *Nat Biotechnol*. - 2009. -V. 27, - P. 839-49.
10. Song, E. et al. Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. // *Nat Biotechnol*. - 2005. -V. 23, - P. 709-17.
11. Xia, C.F., Boado, R.J. and Pardridge, W.M. Antibody-mediated targeting of siRNA via the human insulin receptor using avidin-biotin technology. // *Mol Pharm*. - 2009. -V. 6, - P. 747-51.
12. Cuellar, T.L. et al. Systematic evaluation of antibody-mediated siRNA delivery using an industrial platform of THIOMAB-siRNA conjugates. // *Nucleic Acids Res*. - 2014. -V. 43, - P. 1189-203.
13. Hu, J., Xiao, F., Hao, X., Bai, S. and Hao, J. Inhibition of monocyte adhesion to brain-derived endothelial cells by dual functional RNA chimeras. // *Mol Ther Nucleic Acids*. - 2014. -V. 3, - P. e209.
14. Thomas, M., Kularatne, S.A., Qi, L., Kleindl, P., Leamon, C.P., Hansen, M.J. and Low, P.S. Ligand-targeted delivery of small interfering RNAs to malignant cells and tissues. // *Ann N Y Acad Sci*. - 2009. -V. 1175, - P. 32-9.
15. Nair, J.K. et al. Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. // *J Am Chem Soc*. - 2014. -V. 136, - P. 16958-61.
16. Cesarone, G., Edupuganti, O.P., Chen, C.P. and Wickstrom, E. Insulin receptor substrate 1 knockdown in human MCF7 ER+ breast cancer cells by nuclease-resistant IRS1 siRNA conjugated to a disulfide-bridged D-peptide analogue of insulin-like growth factor 1. // *Bioconjug Chem*. - 2007. -V. 18, - P. 1831-40.
17. Koehn, S. et al. Cell-specific RNA interference by peptide-inhibited-peptidase-activated siRNAs. // *J RNAi Gene Silencing*. - 2010. -V. 6, - P. 422-30.
18. Arthanari, Y., Pluen, A., Rajendran, R., Aojula, H. and Demonacos, C. Delivery of therapeutic shRNA and siRNA by Tat fusion peptide targeting BCR-ABL fusion gene in Chronic Myeloid Leukemia cells. // *J Control Release*. - 2010. -V. 145, - P. 272-80.

19. Brunzell, J.D., Davidson, M., Furberg, C.D., Goldberg, R.B., Howard, B.V., Stein, J.H. and Witztum, J.L. Lipoprotein management in patients with cardiometabolic risk: consensus statement from the American Diabetes Association and the American College of Cardiology Foundation. // *Diabetes Care*. - 2008. -V. 31, - P. 811-22.
20. Brown, M.S. and Goldstein, J.L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. // *Cell*. - 1997. -V. 89, - P. 331-40.
21. Kruglova, I.S., Meshchaninova, M.I., Ven'iaminova, A.G., Zenkova, M.A., Vlasov, V.V. and Chernolovskaia, E.L. Cholesterol-modified anti-*MDR1* small interfering RNA: uptake and biological activity. // *Mol Biol (Mosk)*. - 2010. -V. 44, - P. 284-93.
22. Ho, G.T., Moodie, F.M. and Satsangi, J. Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant in gastrointestinal disease? // *Gut*. - 2003. -V. 52, - P. 759-66.
23. Петрова, Н.С. Химические и структурные модификации анти-*MDR1* малых интерферирующих РНК как факторы, определяющие их нуклеазоустойчивость, биологическую активность и эффективность проникновения в клетки : дис. канд. хим. наук - 2011.
24. Chernikov, I.V., Vlassov, V.V. and Chernolovskaya, E.L. Current Development of siRNA Bioconjugates: From Research to the Clinic. // *Front Pharmacol*. - 2019. -V. 10, - P. 444.
25. Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. // *Nature*. - 2001. -V. 409, - P. 363-6.
26. De Paula, D., Bentley, M.V. and Mahato, R.I. Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting. // *RNA*. - 2007. -V. 13, - P. 431-56.
27. Khvorova, A., Reynolds, A. and Jayasena, S.D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. // *Cell*. - 2003. -V. 115, - P. 209-16.
28. Aronin, N. Target selectivity in mRNA silencing. // *Gene Ther*. - 2006. -V. 13, - P. 509-16.
29. Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N. and Zamore, P.D. A protein sensor for siRNA asymmetry. // *Science*. - 2004. -V. 306, - P. 1377-80.
30. Ma, J.B., Ye, K. and Patel, D.J. Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. // *Nature*. - 2004. -V. 429, - P. 318-22.
31. Nakanishi, K. Anatomy of RISC: how do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins? // *Wiley Interdiscip Rev RNA*. - 2016. -V. 7, - P. 637-60.
32. Wittrup, A. and Lieberman, J. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. // *Nat Rev Genet*. - 2015. -V. 16, - P. 543-52.
33. Hutvagner, G. and Simard, M.J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. // *Nat Rev Mol Cell Biol*. - 2008. -V. 9, - P. 22-32.
34. Wang, H.W., Noland, C., Siridechadilok, B., Taylor, D.W., Ma, E., Felderer, K., Doudna, J.A. and Nogales, E. Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. // *Nat Struct Mol Biol*. - 2009. -V. 16, - P. 1148-53.
35. Parker, J.S., Roe, S.M. and Barford, D. Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. // *Nature*. - 2005. -V. 434, - P. 663-6.
36. Meister, G. and Tuschl, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. // *Nature*. - 2004. -V. 431, - P. 343-9.
37. Frank, F., Sonenberg, N. and Nagar, B. Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. // *Nature*. - 2010. -V. 465, - P. 818-22.
38. Boland, A., Huntzinger, E., Schmidt, S., Izaurralde, E. and Weichenrieder, O. Crystal structure of the MID-PIWI lobe of a eukaryotic Argonaute protein. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2011. -V. 108, - P. 10466-71.

39. Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E. and Sattler, M. Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. // *Nat Struct Mol Biol.* - 2004. -V. 11, - P. 576-7.
40. Ma, J.B., Yuan, Y.R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T. and Patel, D.J. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. // *Nature.* - 2005. -V. 434, - P. 666-70.
41. Wang, Y., Juranek, S., Li, H., Sheng, G., Tuschl, T. and Patel, D.J. Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. // *Nature.* - 2008. -V. 456, - P. 921-6.
42. Addepalli, H. et al. Modulation of thermal stability can enhance the potency of siRNA. // *Nucleic Acids Res.* - 2010. -V. 38, - P. 7320-7331.
43. Rana, T.M. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. // *Nat Rev Mol Cell Biol.* - 2007. -V. 8, - P. 23-36.
44. Ohrt, T., Mutze, J., Staroske, W., Weinmann, L., Hock, J., Crell, K., Meister, G. and Schulle, P. Fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence cross-correlation spectroscopy reveal the cytoplasmic origination of loaded nuclear RISC in vivo in human cells. // *Nucleic Acids Res.* - 2008. -V. 36, - P. 6439-49.
45. Liu, J. et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. // *Science.* - 2004. -V. 305, - P. 1437-41.
46. Park, J.H. and Shin, C. Slicer-independent mechanism drives small-RNA strand separation during human RISC assembly. // *Nucleic Acids Res.* - 2015. -V. 43, - P. 9418-33.
47. Muhonen, P., Tennila, T., Azhayeva, E., Parthasarathy, R.N., Janckila, A.J., Vaananen, H.K., Azhayev, A. and Laitala-Leinonen, T. RNA interference tolerates 2'-fluoro modifications at the Argonaute2 cleavage site. // *Chem Biodivers.* - 2007. -V. 4, - P. 858-73.
48. Gavrillov, K. and Saltzman, W.M. Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. // *Yale J Biol Med.* - 2012. -V. 85, - P. 187-200.
49. Chandradoss, S.D., Schirle, N.T., Szczepaniak, M., MacRae, I.J. and Joo, C. A Dynamic Search Process Underlies MicroRNA Targeting. // *Cell.* - 2015. -V. 162, - P. 96-107.
50. Schirle, N.T., Sheu-Gruttadauria, J. and MacRae, I.J. Structural basis for microRNA targeting. // *Science.* - 2014. -V. 346, - P. 608-13.
51. Leuschner, P.J., Ameres, S.L., Kueng, S. and Martinez, J. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. // *EMBO Rep.* - 2006. -V. 7, - P. 314-20.
52. Jinek, M. and Doudna, J.A. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. // *Nature.* - 2009. -V. 457, - P. 405-12.
53. Haley, B. and Zamore, P.D. Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. // *Nat Struct Mol Biol.* - 2004. -V. 11, - P. 599-606.
54. Ameres, S.L., Martinez, J. and Schroeder, R. Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. // *Cell.* - 2007. -V. 130, - P. 101-12.
55. Lemaitre, M., Bayard, B. and Lebleu, B. Specific antiviral activity of a poly(L-lysine)-conjugated oligodeoxyribonucleotide sequence complementary to vesicular stomatitis virus N protein mRNA initiation site. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1987. -V. 84, - P. 648-52.
56. Subramanian, R.R. et al. Enhancing antisense efficacy with multimers and multi-targeting oligonucleotides (MTOs) using cleavable linkers. // *Nucleic Acids Res.* - 2015. -V. 43, - P. 9123-32.
57. Dorsett, Y. and Tuschl, T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. // *Nat Rev Drug Discov.* - 2004. -V. 3, - P. 318-29.
58. Lee, S.H., Kang, Y.Y., Jang, H.E. and Mok, H. Current preclinical small interfering RNA (siRNA)-based conjugate systems for RNA therapeutics. // *Adv Drug Deliv Rev.* - 2016. -V. 104, - P. 78-92.

59. Varkouhi, A.K., Scholte, M., Storm, G. and Haisma, H.J. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. // *J Control Release*. - 2011. -V. 151, - P. 220-8.
60. Shukla, R.S., Jain, A., Zhao, Z. and Cheng, K. Intracellular trafficking and exocytosis of a multi-component siRNA nanocomplex. // *Nanomedicine*. - 2016. -V. 12, - P. 1323-34.
61. Whitehead, K.A., Langer, R. and Anderson, D.G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. // *Nat Rev Drug Discov*. - 2009. -V. 8, - P. 129-38.
62. Bartlett, D.W. and Davis, M.E. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. // *Nucleic Acids Res*. - 2006. -V. 34, - P. 322-33.
63. Pirher, N., Pohar, J., Mancek-Keber, M., Bencina, M. and Jerala, R. Activation of cell membrane-localized Toll-like receptor 3 by siRNA. // *Immunol Lett*. - 2017. -V., - P.
64. Oosenbrug, T., van de Graaff, M.J., Rensing, M.E. and van Kasteren, S.I. Chemical Tools for Studying TLR Signaling Dynamics. // *Cell Chem Biol*. - 2017. -V., - P.
65. Mansoori, B., Mohammadi, A., Shir Jang, S. and Baradaran, B. Mechanisms of immune system activation in mammals by small interfering RNA (siRNA). // *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. - 2016. -V. 44, - P. 1589-96.
66. Pindel, A. and Sadler, A. The role of protein kinase R in the interferon response. // *J Interferon Cytokine Res*. - 2011. -V. 31, - P. 59-70.
67. Gil, J. and Esteban, M. The interferon-induced protein kinase (PKR), triggers apoptosis through FADD-mediated activation of caspase 8 in a manner independent of Fas and TNF-alpha receptors. // *Oncogene*. - 2000. -V. 19, - P. 3665-74.
68. Malathi, K. et al. A transcriptional signaling pathway in the IFN system mediated by 2'-5'-oligoadenylate activation of RNase L. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2005. -V. 102, - P. 14533-8.
69. Huntzinger, E. and Izaurralde, E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. // *Nat Rev Genet*. - 2011. -V. 12, - P. 99-110.
70. Seok, H., Ham, J., Jang, E.S. and Chi, S.W. MicroRNA Target Recognition: Insights from Transcriptome-Wide Non-Canonical Interactions. // *Mol Cells*. - 2016. -V. 39, - P. 375-81.
71. Setten, R.L., Rossi, J.J. and Han, S.P. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. // *Nat Rev Drug Discov*. - 2019. -V., - P.
72. Deamer, D. Membranes and the Origin of Life: A Century of Conjecture. // *J Mol Evol*. - 2016. -V. 83, - P. 159-168.
73. Pressman, A., Blanco, C. and Chen, I.A. The RNA World as a Model System to Study the Origin of Life. // *Curr Biol*. - 2015. -V. 25, - P. R953-63.
74. Tiscornia, G., Singer, O., Ikawa, M. and Verma, I.M. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2003. -V. 100, - P. 1844-8.
75. Kasahara, H. and Aoki, H. Gene silencing using adenoviral RNAi vector in vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes. // *Methods Mol Med*. - 2005. -V. 112, - P. 155-72.
76. Rubinson, D.A. et al. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. // *Nat Genet*. - 2003. -V. 33, - P. 401-6.
77. Subramanya, S. et al. Enhanced induction of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes by dendritic cell-targeted delivery of SOCS-1 siRNA. // *Mol Ther*. - 2010. -V. 18, - P. 2028-37.
78. Erles, K., Rohde, V., Thaele, M., Roth, S., Edler, L. and Schlehofer, J.R. DNA of adeno-associated virus (AAV) in testicular tissue and in abnormal semen samples. // *Hum Reprod*. - 2001. -V. 16, - P. 2333-7.
79. Tomar, R.S., Matta, H. and Chaudhary, P.M. Use of adeno-associated viral vector for delivery of small interfering RNA. // *Oncogene*. - 2003. -V. 22, - P. 5712-5.

80. Igarashi, T., Miyake, N., Fujimoto, C., Yaguchi, C., Iijima, O., Shimada, T., Takahashi, H. and Miyake, K. Adeno-associated virus type 8 vector-mediated expression of siRNA targeting vascular endothelial growth factor efficiently inhibits neovascularization in a murine choroidal neovascularization model. // *Mol Vis.* - 2014. -V. 20, - P. 488-96.
81. Chen, P.G. and Sun, Z. AAV Delivery of Endothelin-1 shRNA Attenuates Cold-Induced Hypertension. // *Hum Gene Ther.* - 2017. -V. 28, - P. 190-199.
82. Makkonen, K.E., Airene, K. and Yla-Herttulala, S. Baculovirus-mediated gene delivery and RNAi applications. // *Viruses.* - 2015. -V. 7, - P. 2099-125.
83. Amarzguioui, M., Holen, T., Babaie, E. and Prydz, H. Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. // *Nucleic Acids Res.* - 2003. -V. 31, - P. 589-95.
84. de Solis, C.A., Holehonnur, R., Banerjee, A., Luong, J.A., Lella, S.K., Ho, A., Pahlavan, B. and Ploski, J.E. Viral delivery of shRNA to amygdala neurons leads to neurotoxicity and deficits in Pavlovian fear conditioning. // *Neurobiol Learn Mem.* - 2015. -V. 124, - P. 34-47.
85. Liu, C.M., Liu, D.P., Dong, W.J. and Liang, C.C. Retrovirus vector-mediated stable gene silencing in human cell. // *Biochem Biophys Res Commun.* - 2004. -V. 313, - P. 716-20.
86. Yamamoto, Y., Nagasato, M., Yoshida, T. and Aoki, K. Recent advances in genetic modification of adenovirus vectors for cancer treatment. // *Cancer Sci.* - 2017. -V. 108, - P. 831-837.
87. Sung, L.Y., Chen, C.L., Lin, S.Y., Li, K.C., Yeh, C.L., Chen, G.Y., Lin, C.Y. and Hu, Y.C. Efficient gene delivery into cell lines and stem cells using baculovirus. // *Nat Protoc.* - 2014. -V. 9, - P. 1882-99.
88. Tebas, P. et al. Safety and Immunogenicity of an Anti-Zika Virus DNA Vaccine - Preliminary Report. // *N Engl J Med.* - 2017. -V., - P.
89. Prud'homme, G.J., Glinka, Y., Khan, A.S. and Draghia-Akli, R. Electroporation-enhanced nonviral gene transfer for the prevention or treatment of immunological, endocrine and neoplastic diseases. // *Curr Gene Ther.* - 2006. -V. 6, - P. 243-73.
90. Bureau, M.F., Gehl, J., Deleuze, V., Mir, L.M. and Scherman, D. Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer. // *Biochim Biophys Acta.* - 2000. -V. 1474, - P. 353-9.
91. Heller, R. et al. Phase I/II trial for the treatment of cutaneous and subcutaneous tumors using electrochemotherapy. // *Cancer.* - 1996. -V. 77, - P. 964-71.
92. Kotopoulos, S. et al. Sonoporation-enhanced chemotherapy significantly reduces primary tumour burden in an orthotopic pancreatic cancer xenograft. // *Mol Imaging Biol.* - 2014. -V. 16, - P. 53-62.
93. Delalande, A., Kotopoulos, S., Postema, M., Midoux, P. and Pichon, C. Sonoporation: mechanistic insights and ongoing challenges for gene transfer. // *Gene.* - 2013. -V. 525, - P. 191-9.
94. Pereyra, A.S., Mykhaylyk, O., Lockhart, E.F., Taylor, J.R., Delbono, O., Goya, R.G., Plank, C. and Herenu, C.B. Magnetofection Enhances Adenoviral Vector-based Gene Delivery in Skeletal Muscle Cells. // *J Nanomed Nanotechnol.* - 2016. -V. 7, - P.
95. Castellani, S., Orlando, C., Carbone, A., Di Gioia, S. and Conese, M. Magnetofection Enhances Lentiviral-Mediated Transduction of Airway Epithelial Cells through Extracellular and Cellular Barriers. // *Genes (Basel).* - 2016. -V. 7, - P.
96. Antkowiak, M., Torres-Mapa, M.L., Stevenson, D.J., Dholakia, K. and Gunn-Moore, F.J. Femtosecond optical transfection of individual mammalian cells. // *Nat Protoc.* - 2013. -V. 8, - P. 1216-33.
97. Dalakouras, A. et al. Induction of Silencing in Plants by High-Pressure Spraying of In vitro-Synthesized Small RNAs. // *Front Plant Sci.* - 2016. -V. 7, - P. 1327.
98. Villemejeane, J. and Mir, L.M. Physical methods of nucleic acid transfer: general concepts and applications. // *Br J Pharmacol.* - 2009. -V. 157, - P. 207-19.

99. Cai, X., Zhu, H., Zhang, Y. and Gu, Z. Highly Efficient and Safe Delivery of VEGF siRNA by Bioreducible Fluorinated Peptide Dendrimers for Cancer Therapy. // *ACS Appl Mater Interfaces*. - 2017. -V. 9, - P. 9402-9415.
100. Coelho, T. et al. Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. // *N Engl J Med*. - 2013. -V. 369, - P. 819-29.
101. Yu, M. et al. Lipid nanoparticle-based co-delivery of epirubicin and BCL-2 siRNA for enhanced intracellular drug release and reversing multidrug resistance. // *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. - 2017. -V., - P. 1-10.
102. Lee, J.B. et al. A Glu-urea-Lys Ligand-conjugated Lipid Nanoparticle/siRNA System Inhibits Androgen Receptor Expression In Vivo. // *Mol Ther Nucleic Acids*. - 2016. -V. 5, - P. e348.
103. Davis, M.E. The first targeted delivery of siRNA in humans via a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: from concept to clinic. // *Mol Pharm*. - 2009. -V. 6, - P. 659-68.
104. Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S. and Yan, J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. // *J Control Release*. - 2006. -V. 114, - P. 100-9.
105. Maslov, M.A., Kabilova, T.O., Petukhov, I.A., Morozova, N.G., Serebrennikova, G.A., Vlassov, V.V. and Zenkova, M.A. Novel cholesterol spermine conjugates provide efficient cellular delivery of plasmid DNA and small interfering RNA. // *J Control Release*. - 2012. -V. 160, - P. 182-93.
106. Puchkov, P.A., Shmendel, E.V., Luneva, A.S., Morozova, N.G., Zenkova, M.A. and Maslov, M.A. Design, synthesis and transfection efficiency of a novel redox-sensitive polycationic amphiphile. // *Bioorg Med Chem Lett*. - 2016. -V. 26, - P. 5911-5915.
107. Zhang, C., Liu, J., Jin, N., Zhang, G., Xi, Y. and Liu, H. SiRNA Targeting mTOR Effectively Prevents the Proliferation and Migration of Human Lens Epithelial Cells. // *PLoS One*. - 2016. -V. 11, - P. e0167349.
108. Schlegel, A., Largeau, C., Bigey, P., Bessodes, M., Lebozec, K., Scherman, D. and Esciou, V. Anionic polymers for decreased toxicity and enhanced in vivo delivery of siRNA complexed with cationic liposomes. // *J Control Release*. - 2011. -V. 152, - P. 393-401.
109. Lee, J. et al. Mono-arginine Cholesterol-based Small Lipid Nanoparticles as a Systemic siRNA Delivery Platform for Effective Cancer Therapy. // *Theranostics*. - 2016. -V. 6, - P. 192-203.
110. Jarver, P. et al. Peptide nanoparticle delivery of charge-neutral splice-switching morpholino oligonucleotides. // *Nucleic Acid Ther*. - 2015. -V. 25, - P. 65-77.
111. Han, S., Mahato, R.I., Sung, Y.K. and Kim, S.W. Development of biomaterials for gene therapy. // *Mol Ther*. - 2000. -V. 2, - P. 302-17.
112. Mahato, R.I. et al. Biodistribution and gene expression of lipid/plasmid complexes after systemic administration. // *Hum Gene Ther*. - 1998. -V. 9, - P. 2083-99.
113. Leng, Q., Woodle, M.C., Lu, P.Y. and Mixson, A.J. Advances in Systemic siRNA Delivery. // *Drugs Future*. - 2009. -V. 34, - P. 721.
114. Mahato, R.I., Rolland, A. and Tomlinson, E. Cationic lipid-based gene delivery systems: pharmaceutical perspectives. // *Pharm Res*. - 1997. -V. 14, - P. 853-9.
115. Kapoor, M. and Burgess, D.J. Physicochemical characterization of anionic lipid-based ternary siRNA complexes. // *Biochim Biophys Acta*. - 2012. -V. 1818, - P. 1603-12.
116. Giraud, L., Viricel, W., Leblond, J. and Giasson, S. Single stranded siRNA complexation through non-electrostatic interactions. // *Biomaterials*. - 2017. -V. 113, - P. 230-242.
117. Landesman-Milo, D. and Peer, D. Transforming Nanomedicines From Lab Scale Production to Novel Clinical Modality. // *Bioconjug Chem*. - 2016. -V. 27, - P. 855-62.
118. Niemietz, C., Chandhok, G. and Schmidt, H. Therapeutic Oligonucleotides Targeting Liver Disease: TTR Amyloidosis. // *Molecules*. - 2015. -V. 20, - P. 17944-75.

119. Adams, D., Suhr, O.B., Dyck, P.J., Litchy, W.J., Leahy, R.G., Chen, J., Gollob, J. and Coelho, T. Trial design and rationale for APOLLO, a Phase 3, placebo-controlled study of patisiran in patients with hereditary ATTR amyloidosis with polyneuropathy. // *BMC Neurol.* - 2017. -V. 17, - P. 181.
120. Tam, Y.K., Madden, T.D. and Hope, M.J. Pieter Cullis' quest for a lipid-based, fusogenic delivery system for nucleic acid therapeutics: success with siRNA so what about mRNA? // *J Drug Target.* - 2016. -V. 24, - P. 774-779.
121. Khvorova, A. and Watts, J.K. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. // *Nat Biotechnol.* - 2017. -V. 35, - P. 238-248.
122. Chen, C., Yang, Z. and Tang, X. Chemical modifications of nucleic acid drugs and their delivery systems for gene-based therapy. // *Med Res Rev.* - 2018. -V., - P.
123. Manoharan, M. RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. // *Curr Opin Chem Biol.* - 2004. -V. 8, - P. 570-9.
124. Behlke, M.A. Chemical modification of siRNAs for in vivo use. // *Oligonucleotides.* - 2008. -V. 18, - P. 305-19.
125. Findlay, D., Herries, D.G., Mathias, A.P., Rabin, B.R. and Ross, C.A. The active site and mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease. 7. The catalytic mechanism. // *Biochem J.* - 1962. -V. 85, - P. 152-3.
126. Breslow, R. and Chapman, W.H., Jr. On the mechanism of action of ribonuclease A: relevance of enzymatic studies with a p-nitrophenylphosphate ester and a thiophosphate ester. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1996. -V. 93, - P. 10018-21.
127. Bobst, A.M., Rottman, F. and Cerutti, P.A. Effect of the methylation of the 2'-hydroxyl groups in polyadenylic acid on its structure in weakly acidic and neutral solutions and on its capability to form ordered complexes with polyuridylic acid. // *J Mol Biol.* - 1969. -V. 46, - P. 221-34.
128. Volkov, A.A., Kruglova, N.S., Meschaninova, M.I., Venyaminova, A.G., Zenkova, M.A., Vlassov, V.V. and Chernolovskaya, E.L. Selective protection of nuclease-sensitive sites in siRNA prolongs silencing effect. // *Oligonucleotides.* - 2009. -V. 19, - P. 191-202.
129. Liu, X. et al. Tumor-targeted in vivo gene silencing via systemic delivery of cRGD-conjugated siRNA. // *Nucleic Acids Res.* - 2014. -V. 42, - P. 11805-17.
130. Chernikov, I.V., Gladkikh, D.V., Meschaninova, M.I., Ven'yaminova, A.G., Zenkova, M.A., Vlassov, V.V. and Chernolovskaya, E.L. Cholesterol-Containing Nuclease-Resistant siRNA Accumulates in Tumors in a Carrier-free Mode and Silences *MDR1* Gene. // *Mol Ther Nucleic Acids.* - 2017. -V. 6, - P. 209-220.
131. Judge, A.D., Bola, G., Lee, A.C. and MacLachlan, I. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. // *Mol Ther.* - 2006. -V. 13, - P. 494-505.
132. Ray, K.K. et al. Inclisiran in Patients at High Cardiovascular Risk with Elevated LDL Cholesterol. // *N Engl J Med.* - 2017. -V. 376, - P. 1430-1440.
133. Khvorova, A. Oligonucleotide Therapeutics - A New Class of Cholesterol-Lowering Drugs. // *N Engl J Med.* - 2017. -V. 376, - P. 4-7.
134. Czauderna, F., Fechtner, M., Dames, S., Aygun, H., Klippel, A., Pronk, G.J., Giese, K. and Kaufmann, J. Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. // *Nucleic Acids Res.* - 2003. -V. 31, - P. 2705-16.
135. Cummins, L.L., Owens, S.R., Risen, L.M., Lesnik, E.A., Freier, S.M., McGee, D., Guinasso, C.J. and Cook, P.D. Characterization of fully 2'-modified oligoribonucleotide hetero- and homoduplex hybridization and nuclease sensitivity. // *Nucleic Acids Res.* - 1995. -V. 23, - P. 2019-24.
136. Prakash, T.P. et al. Positional effect of chemical modifications on short interference RNA activity in mammalian cells. // *J Med Chem.* - 2005. -V. 48, - P. 4247-53.

137. Zanardi, T.A., Kim, T.W., Shen, L., Serota, D., Papagiannis, C., Park, S.Y., Kim, Y. and Henry, S.P. Chronic Toxicity Assessment of 2'-O-Methoxyethyl Antisense Oligonucleotides in Mice. // *Nucleic Acid Ther.* - 2018. -V., - P.
138. Kenski, D.M. et al. siRNA-optimized Modifications for Enhanced In Vivo Activity. // *Mol Ther Nucleic Acids.* - 2012. -V. 1, - P. e5.
139. Dorn, G. et al. siRNA relieves chronic neuropathic pain. // *Nucleic Acids Res.* - 2004. -V. 32, - P. e49.
140. Song, X., Wang, X., Ma, Y., Liang, Z., Yang, Z. and Cao, H. Site-Specific Modification Using the 2'-Methoxyethyl Group Improves the Specificity and Activity of siRNAs. // *Mol Ther Nucleic Acids.* - 2017. -V. 9, - P. 242-250.
141. Koller, E. et al. Competition for RISC binding predicts in vitro potency of siRNA. // *Nucleic Acids Res.* - 2006. -V. 34, - P. 4467-76.
142. Manoharan, M. et al. Unique gene-silencing and structural properties of 2'-fluoro-modified siRNAs. // *Angew Chem Int Ed Engl.* - 2011. -V. 50, - P. 2284-8.
143. Deleavey, G.F. et al. Synergistic effects between analogs of DNA and RNA improve the potency of siRNA-mediated gene silencing. // *Nucleic Acids Res.* - 2010. -V. 38, - P. 4547-57.
144. Blidner, R.A., Hammer, R.P., Lopez, M.J., Robinson, S.O. and Monroe, W.T. Fully 2'-deoxy-2'-fluoro substituted nucleic acids induce RNA interference in mammalian cell culture. // *Chem Biol Drug Des.* - 2007. -V. 70, - P. 113-22.
145. Fucini, R.V., Haringsma, H.J., Deng, P., Flanagan, W.M. and Willingham, A.T. Adenosine modification may be preferred for reducing siRNA immune stimulation. // *Nucleic Acid Ther.* - 2012. -V. 22, - P. 205-10.
146. Shen, W., Liang, X.H., Sun, H. and Croke, S.T. 2'-Fluoro-modified phosphorothioate oligonucleotide can cause rapid degradation of P54nrb and PSF. // *Nucleic Acids Res.* - 2015. -V. 43, - P. 4569-78.
147. Janas, M.M., Jiang, Y., Schlegel, M.K., Waldron, S., Kuchimanchi, S. and Barros, S.A. Impact of Oligonucleotide Structure, Chemistry, and Delivery Method on In Vitro Cytotoxicity. // *Nucleic Acid Ther.* - 2017. -V. 27, - P. 11-22.
148. Garber, K. Alnylam terminates revusiran program, stock plunges. // *Nat Biotechnol.* - 2016. -V. 34, - P. 1213-1214.
149. Zimmermann, T.S. et al. Clinical Proof of Concept for a Novel Hepatocyte-Targeting GalNAc-siRNA Conjugate. // *Mol Ther.* - 2017. -V. 25, - P. 71-78.
150. Shen, W., De Hoyos, C.L., Sun, H., Vickers, T.A., Liang, X.H. and Croke, S.T. Acute hepatotoxicity of 2' fluoro-modified 5-10-5 gapmer phosphorothioate oligonucleotides in mice correlates with intracellular protein binding and the loss of DBHS proteins. // *Nucleic Acids Res.* - 2018. -V. 46, - P. 2204-2217.
151. Ohrt, T. and Schwille, P. siRNA modifications and sub-cellular localization: a question of intracellular transport? // *Curr Pharm Des.* - 2008. -V. 14, - P. 3674-85.
152. Janas, M.M. et al. Selection of GalNAc-conjugated siRNAs with limited off-target-driven rat hepatotoxicity. // *Nat Commun.* - 2018. -V. 9, - P. 723.
153. Janas, M.M. et al. Safety evaluation of 2'-deoxy-2'-fluoro nucleotides in GalNAc-siRNA conjugates. // *Nucleic Acids Res.* - 2019. -V. 47, - P. 3306-3320.
154. Damha, M.J., Noronha, A.M., Wilds, C.J., Trempe, J.F., Denisov, A., Pon, R.T. and Gehring, K. Properties of arabinonucleic acids (ANA & 2'F-ANA): implications for the design of antisense therapeutics that invoke RNase H cleavage of RNA. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* - 2001. -V. 20, - P. 429-40.
155. Fortin, M. et al. A multi-target antisense approach against PDE4 and PDE7 reduces smoke-induced lung inflammation in mice. // *Respir Res.* - 2009. -V. 10, - P. 39.
156. Gore, K.R., Nawale, G.N., Harikrishna, S., Chittoor, V.G., Pandey, S.K., Hobartner, C., Patankar, S. and Pradeepkumar, P.I. Synthesis, gene silencing, and molecular modeling

- studies of 4'-C-aminomethyl-2'-O-methyl modified small interfering RNAs. // *J Org Chem.* - 2012. -V. 77, - P. 3233-45.
157. Takahashi, M., Nagai, C., Hatakeyama, H., Minakawa, N., Harashima, H. and Matsuda, A. Intracellular stability of 2'-OMe-4'-thioribonucleoside modified siRNA leads to long-term RNAi effect. // *Nucleic Acids Res.* - 2012. -V. 40, - P. 5787-93.
 158. Harp, J.M. et al. Structural basis for the synergy of 4'- and 2'-modifications on siRNA nuclease resistance, thermal stability and RNAi activity. // *Nucleic Acids Res.* - 2018. -V. 46, - P. 8090-8104.
 159. Deleavey, G.F. and Damha, M.J. Designing chemically modified oligonucleotides for targeted gene silencing. // *Chem Biol.* - 2012. -V. 19, - P. 937-54.
 160. Fisher, M., Abramov, M., Van Aerschot, A., Rozenski, J., Dixit, V., Juliano, R.L. and Herdewijn, P. Biological effects of hexitol and altritol-modified siRNAs targeting B-Raf. // *Eur J Pharmacol.* - 2009. -V. 606, - P. 38-44.
 161. Nauwelaerts, K. et al. Structural characterization and biological evaluation of small interfering RNAs containing cyclohexenyl nucleosides. // *J Am Chem Soc.* - 2007. -V. 129, - P. 9340-8.
 162. Fisher, M., Abramov, M., Van Aerschot, A., Xu, D., Juliano, R.L. and Herdewijn, P. Inhibition of *MDR1* expression with altritol-modified siRNAs. // *Nucleic Acids Res.* - 2007. -V. 35, - P. 1064-74.
 163. Sabatino, D. and Damha, M.J. Oxepane nucleic acids: synthesis, characterization, and properties of oligonucleotides bearing a seven-membered carbohydrate ring. // *J Am Chem Soc.* - 2007. -V. 129, - P. 8259-70.
 164. Braasch, D.A., Jensen, S., Liu, Y., Kaur, K., Arar, K., White, M.A. and Corey, D.R. RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. // *Biochemistry.* - 2003. -V. 42, - P. 7967-75.
 165. Terrazas, M., Ocampo, S.M., Perales, J.C., Marquez, V.E. and Eritja, R. Effect of north bicyclo[3.1.0]hexane 2'-deoxy-pseudosugars on RNA interference: a novel class of siRNA modification. // *Chembiochem.* - 2011. -V. 12, - P. 1056-65.
 166. Goyenvalle, A. et al. Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. // *Nat Med.* - 2015. -V. 21, - P. 270-5.
 167. Jensen, T.B., Langkjaer, N. and Wengel, J. Unlocked nucleic acid (UNA) and UNA derivatives: thermal denaturation studies. // *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).* - 2008. -V., - P. 133-4.
 168. Langkjaer, N., Pasternak, A. and Wengel, J. UNA (unlocked nucleic acid): a flexible RNA mimic that allows engineering of nucleic acid duplex stability. // *Bioorg Med Chem.* - 2009. -V. 17, - P. 5420-5.
 169. Herdewijn, P. and Juliano, R. Nucleic acids with a six-membered carbohydrate mimic and RNA interference. // *Blood Cells Mol Dis.* - 2007. -V. 38, - P. 100-1.
 170. Wang, J. et al. Cyclohexene nucleic acids (CeNA) form stable duplexes with RNA and induce RNase H activity. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* - 2001. -V. 20, - P. 785-8.
 171. Julien, K.R., Sumita, M., Chen, P.H., Laird-Offringa, I.A. and Hoogstraten, C.G. Conformationally restricted nucleotides as a probe of structure-function relationships in RNA. // *RNA.* - 2008. -V. 14, - P. 1632-43.
 172. Elmen, J. et al. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. // *Nucleic Acids Res.* - 2005. -V. 33, - P. 439-47.
 173. Laursen, M.B. et al. Utilization of unlocked nucleic acid (UNA) to enhance siRNA performance in vitro and in vivo. // *Mol Biosyst.* - 2010. -V. 6, - P. 862-70.
 174. Schlegel, M.K. et al. Chirality Dependent Potency Enhancement and Structural Impact of Glycol Nucleic Acid Modification on siRNA. // *J Am Chem Soc.* - 2017. -V. 139, - P. 8537-8546.

175. Vaish, N. et al. Improved specificity of gene silencing by siRNAs containing unlocked nucleobase analogs. // *Nucleic Acids Res.* - 2011. -V. 39, - P. 1823-32.
176. Snead, N.M., Escamilla-Powers, J.R., Rossi, J.J. and McCaffrey, A.P. 5' Unlocked Nucleic Acid Modification Improves siRNA Targeting. // *Mol Ther Nucleic Acids.* - 2013. -V. 2, - P. e103.
177. Jackson, A.L. et al. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. // *RNA.* - 2006. -V. 12, - P. 1197-205.
178. Bramsen, J.B. et al. A large-scale chemical modification screen identifies design rules to generate siRNAs with high activity, high stability and low toxicity. // *Nucleic Acids Res.* - 2009. -V. 37, - P. 2867-81.
179. Bramsen, J.B., Laursen, M.B., Damgaard, C.K., Lena, S.W., Babu, B.R., Wengel, J. and Kjems, J. Improved silencing properties using small internally segmented interfering RNAs. // *Nucleic Acids Res.* - 2007. -V. 35, - P. 5886-97.
180. Hong, C.A. and Nam, Y.S. Reducible Dimeric Conjugates of Small Internally Segment Interfering RNA for Efficient Gene Silencing. // *Macromol Biosci.* - 2016. -V. 16, - P. 1442-1449.
181. Mook, O., Vreijling, J., Wengel, S.L., Wengel, J., Zhou, C., Chattopadhyaya, J., Baas, F. and Fluiter, K. In vivo efficacy and off-target effects of locked nucleic acid (LNA) and unlocked nucleic acid (UNA) modified siRNA and small internally segmented interfering RNA (sisiRNA) in mice bearing human tumor xenografts. // *Artif DNA PNA XNA.* - 2010. -V. 1, - P. 36-44.
182. Frazao, C., McVey, C.E., Amblar, M., Barbas, A., Vonrhein, C., Arraiano, C.M. and Carrondo, M.A. Unravelling the dynamics of RNA degradation by ribonuclease II and its RNA-bound complex. // *Nature.* - 2006. -V. 443, - P. 110-4.
183. Eckstein, F. Nucleoside phosphorothioates. // *J Am Chem Soc.* - 1970. -V. 92, - P. 4718-23.
184. Eckstein, F. Phosphorothioates, essential components of therapeutic oligonucleotides. // *Nucleic Acid Ther.* - 2014. -V. 24, - P. 374-87.
185. Hall, A.H., Wan, J., Spesock, A., Sergueeva, Z., Shaw, B.R. and Alexander, K.A. High potency silencing by single-stranded boranophosphate siRNA. // *Nucleic Acids Res.* - 2006. -V. 34, - P. 2773-81.
186. Schwarz, D.S., Tomari, Y. and Zamore, P.D. The RNA-induced silencing complex is a Mg²⁺-dependent endonuclease. // *Curr Biol.* - 2004. -V. 14, - P. 787-91.
187. Wang, S., Allen, N., Vickers, T.A., Revenko, A.S., Sun, H., Liang, X.H. and Crooke, S.T. Cellular uptake mediated by epidermal growth factor receptor facilitates the intracellular activity of phosphorothioate-modified antisense oligonucleotides. // *Nucleic Acids Res.* - 2018. -V., - P.
188. Shen, W. et al. Chemical modification of PS-ASO therapeutics reduces cellular protein-binding and improves the therapeutic index. // *Nat Biotechnol.* - 2019. -V., - P.
189. Lee, M., Simon, A.D., Stein, C.A. and Rabbani, L.E. Antisense strategies to inhibit restenosis. // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* - 1999. -V. 9, - P. 487-92.
190. Iannitti, T., Morales-Medina, J.C. and Palmieri, B. Phosphorothioate oligonucleotides: effectiveness and toxicity. // *Curr Drug Targets.* - 2014. -V. 15, - P. 663-73.
191. Jahns, H., Roos, M., Imig, J., Baumann, F., Wang, Y., Gilmour, R. and Hall, J. Stereochemical bias introduced during RNA synthesis modulates the activity of phosphorothioate siRNAs. // *Nat Commun.* - 2015. -V. 6, - P. 6317.
192. Stec, W.J. et al. Stereodependent inhibition of plasminogen activator inhibitor type 1 by phosphorothioate oligonucleotides: proof of sequence specificity in cell culture and in vivo rat experiments. // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* - 1997. -V. 7, - P. 567-73.
193. Boczkowska, M., Guga, P. and Stec, W.J. Stereodefined phosphorothioate analogues of DNA: relative thermodynamic stability of the model PS-DNA/DNA and PS-DNA/RNA complexes. // *Biochemistry.* - 2002. -V. 41, - P. 12483-7.

194. Hall, A.H., Wan, J., Shaughnessy, E.E., Ramsay Shaw, B. and Alexander, K.A. RNA interference using boranophosphate siRNAs: structure-activity relationships. // *Nucleic Acids Res.* - 2004. -V. 32, - P. 5991-6000.
195. Selvam, C., Thomas, S., Abbott, J., Kennedy, S.D. and Rozners, E. Amides as excellent mimics of phosphate linkages in RNA. // *Angew Chem Int Ed Engl.* - 2011. -V. 50, - P. 2068-70.
196. Iwase, R., Toyama, T. and Nishimori, K. Solid-phase synthesis of modified RNAs containing amide-linked oligoribonucleosides at their 3'-end and their application to siRNA. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* - 2007. -V. 26, - P. 1451-4.
197. Mutisya, D. et al. Amide linkages mimic phosphates in RNA interactions with proteins and are well tolerated in the guide strand of short interfering RNAs. // *Nucleic Acids Res.* - 2017. -V. 45, - P. 8142-8155.
198. Weitzer, S. and Martinez, J. The human RNA kinase hClp1 is active on 3' transfer RNA exons and short interfering RNAs. // *Nature.* - 2007. -V. 447, - P. 222-6.
199. Chen, P.Y., Weinmann, L., Gaidatzis, D., Pei, Y., Zavolan, M., Tuschl, T. and Meister, G. Strand-specific 5'-O-methylation of siRNA duplexes controls guide strand selection and targeting specificity. // *RNA.* - 2008. -V. 14, - P. 263-74.
200. Allerson, C.R. et al. Fully 2'-modified oligonucleotide duplexes with improved in vitro potency and stability compared to unmodified small interfering RNA. // *J Med Chem.* - 2005. -V. 48, - P. 901-4.
201. Prakash, T.P. et al. Identification of metabolically stable 5'-phosphate analogs that support single-stranded siRNA activity. // *Nucleic Acids Res.* - 2015. -V. 43, - P. 2993-3011.
202. Lima, W.F. et al. Single-stranded siRNAs activate RNAi in animals. // *Cell.* - 2012. -V. 150, - P. 883-94.
203. Elkayam, E., Parmar, R., Brown, C.R., Willoughby, J.L., Theile, C.S., Manoharan, M. and Joshua-Tor, L. siRNA carrying an (E)-vinylphosphonate moiety at the 5' end of the guide strand augments gene silencing by enhanced binding to human Argonaute-2. // *Nucleic Acids Res.* - 2017. -V. 45, - P. 3528-3536.
204. Haraszti, R.A. et al. 5-Vinylphosphonate improves tissue accumulation and efficacy of conjugated siRNAs in vivo. // *Nucleic Acids Res.* - 2017. -V. 45, - P. 7581-7592.
205. Sipa, K., Sochacka, E., Kazmierczak-Baranska, J., Maszewska, M., Janicka, M., Nowak, G. and Nawrot, B. Effect of base modifications on structure, thermodynamic stability, and gene silencing activity of short interfering RNA. // *RNA.* - 2007. -V. 13, - P. 1301-16.
206. Somoza, A., Chelliserrykattil, J. and Kool, E.T. The roles of hydrogen bonding and sterics in RNA interference. // *Angew Chem Int Ed Engl.* - 2006. -V. 45, - P. 4994-7.
207. Somoza, A., Silverman, A.P., Miller, R.M., Chelliserrykattil, J. and Kool, E.T. Steric effects in RNA interference: probing the influence of nucleobase size and shape. // *Chemistry.* - 2008. -V. 14, - P. 7978-87.
208. Eberle, F., Giessler, K., Deck, C., Heeg, K., Peter, M., Richert, C. and Dalpke, A.H. Modifications in small interfering RNA that separate immunostimulation from RNA interference. // *J Immunol.* - 2008. -V. 180, - P. 3229-37.
209. Kannan, A. and Burrows, C.J. Synthesis of N2-alkyl-8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine derivatives and effects of these modifications on RNA duplex stability. // *J Org Chem.* - 2011. -V. 76, - P. 720-3.
210. Puthenveetil, S., Whitby, L., Ren, J., Kelnar, K., Krebs, J.F. and Beal, P.A. Controlling activation of the RNA-dependent protein kinase by siRNAs using site-specific chemical modification. // *Nucleic Acids Res.* - 2006. -V. 34, - P. 4900-11.
211. Chiu, Y.L. and Rana, T.M. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. // *RNA.* - 2003. -V. 9, - P. 1034-48.

212. Peacock, H., Kannan, A., Beal, P.A. and Burrows, C.J. Chemical modification of siRNA bases to probe and enhance RNA interference. // *J Org Chem.* - 2011. -V. 76, - P. 7295-300.
213. Anderson, B.R., Muramatsu, H., Nallagatla, S.R., Bevilacqua, P.C., Sansing, L.H., Weissman, D. and Kariko, K. Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation. // *Nucleic Acids Res.* - 2010. -V. 38, - P. 5884-92.
214. Akinc, A. et al. A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. // *Nat Biotechnol.* - 2008. -V. 26, - P. 561-9.
215. Foster, D.J. et al. Advanced siRNA Designs Further Improve In Vivo Performance of GalNAc-siRNA Conjugates. // *Mol Ther.* - 2018. -V. 26, - P. 708-717.
216. Viel, T., Boisgard, R., Kuhnast, B., Jego, B., Siquier-Pernet, K., Hinnen, F., Dolle, F. and Tavitian, B. Molecular imaging study on in vivo distribution and pharmacokinetics of modified small interfering (siRNAs). // *Oligonucleotides.* - 2008. -V. 18, - P. 201-212.
217. Dowler, T., Bergeron, D., Tedeschi, A.L., Paquet, L., Ferrari, N. and Damha, M.J. Improvements in siRNA properties mediated by 2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleic acid (FANA). // *Nucleic Acids Res.* - 2006. -V. 34, - P. 1669-75.
218. Mook, O.R., Baas, F., de Wissel, M.B. and Fluiter, K. Evaluation of locked nucleic acid-modified small interfering RNA in vitro and in vivo. // *Mol Cancer Ther.* - 2007. -V. 6, - P. 833-43.
219. Schyth, B.D., Bramsen, J.B., Pakula, M.M., Larashati, S., Kjems, J., Wengel, J. and Lorenzen, N. In vivo screening of modified siRNAs for non-specific antiviral effect in a small fish model: number and localization in the strands are important. // *Nucleic Acids Res.* - 2012. -V. 40, - P. 4653-65.
220. Pasternak, A. and Wengel, J. Unlocked nucleic acid--an RNA modification with broad potential. // *Org Biomol Chem.* - 2011. -V. 9, - P. 3591-7.
221. Dande, P. et al. Improving RNA interference in mammalian cells by 4'-thio-modified small interfering RNA (siRNA): effect on siRNA activity and nuclease stability when used in combination with 2'-O-alkyl modifications. // *J Med Chem.* - 2006. -V. 49, - P. 1624-34.
222. Hoshika, S., Minakawa, N., Kamiya, H., Harashima, H. and Matsuda, A. RNA interference induced by siRNAs modified with 4'-thioribonucleosides in cultured mammalian cells. // *FEBS Lett.* - 2005. -V. 579, - P. 3115-8.
223. Hoshika, S., Minakawa, N., Shionoya, A., Imada, K., Ogawa, N. and Matsuda, A. Study of modification pattern-RNAi activity relationships by using siRNAs modified with 4'-thioribonucleosides. // *Chembiochem.* - 2007. -V. 8, - P. 2133-8.
224. Ui-Tei, K., Naito, Y., Zenno, S., Nishi, K., Yamato, K., Takahashi, F., Juni, A. and Saigo, K. Functional dissection of siRNA sequence by systematic DNA substitution: modified siRNA with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with significantly reduced off-target effect. // *Nucleic Acids Res.* - 2008. -V. 36, - P. 2136-51.
225. Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. and Tuschl, T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. // *Embo J.* - 2001. -V. 20, - P. 6877-88.
226. Parrish, S., Fleenor, J., Xu, S., Mello, C. and Fire, A. Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. // *Mol Cell.* - 2000. -V. 6, - P. 1077-87.
227. Ovaere, M., Herdewijn, P. and Van Meervelt, L. The crystal structure of the CeNA:RNA hybrid ce(GCGTAGCG):r(CGCUACGC). // *Chemistry.* - 2011. -V. 17, - P. 7823-30.
228. Harborth, J., Elbashir, S.M., Vandenburgh, K., Manninga, H., Scaringe, S.A., Weber, K. and Tuschl, T. Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs

- and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* - 2003. -V. 13, - P. 83-105.
229. Henry, S.P. et al. Complement activation is responsible for acute toxicities in rhesus monkeys treated with a phosphorothioate oligodeoxynucleotide. // *Int Immunopharmacol.* - 2002. -V. 2, - P. 1657-66.
 230. Vlaho, D., Fakhoury, J.F. and Damha, M.J. Structural Studies and Gene Silencing Activity of siRNAs Containing Cationic Phosphoramidate Linkages. // *Nucleic Acid Ther.* - 2017. -V., - P.
 231. Meade, B.R. et al. Efficient delivery of RNAi prodrugs containing reversible charge-neutralizing phosphotriester backbone modifications. // *Nat Biotechnol.* - 2014. -V. 32, - P. 1256-61.
 232. Kel'in, A.V. et al. Structural Basis of Duplex Thermodynamic Stability and Enhanced Nuclease Resistance of 5'-C-Methyl Pyrimidine-Modified Oligonucleotides. // *J Org Chem.* - 2016. -V. 81, - P. 2261-79.
 233. Turner, J.J., Jones, S.W., Moschos, S.A., Lindsay, M.A. and Gait, M.J. MALDI-TOF mass spectral analysis of siRNA degradation in serum confirms an RNase A-like activity. // *Mol Biosyst.* - 2007. -V. 3, - P. 43-50.
 234. Terrazas, M., Alagia, A., Faustino, I., Orozco, M. and Eritja, R. Functionalization of the 3'-ends of DNA and RNA strands with N-ethyl-N-coupled nucleosides: a promising approach to avoid 3'-exonuclease-catalyzed hydrolysis of therapeutic oligonucleotides. // *Chembiochem.* - 2013. -V. 14, - P. 510-20.
 235. Hsu, C.L. and Stevens, A. Yeast cells lacking 5'→3' exonuclease 1 contain mRNA species that are poly(A) deficient and partially lack the 5' cap structure. // *Mol Cell Biol.* - 1993. -V. 13, - P. 4826-35.
 236. Petrova Kruglova, N.S., Meschaninova, M.I., Venyaminova, A.G., Zenkova, M.A., Vlassov, V.V. and Chernolovskaya, E.L. 2'-O-methyl-modified anti-*MDR1* fork-siRNA duplexes exhibiting high nuclease resistance and prolonged silencing activity. // *Oligonucleotides.* - 2010. -V. 20, - P. 297-308.
 237. Schirle, N.T., Kinberger, G.A., Murray, H.F., Lima, W.F., Prakash, T.P. and MacRae, I.J. Structural Analysis of Human Argonaute-2 Bound to a Modified siRNA Guide. // *Journal of the American Chemical Society.* - 2016. -V. 138, - P. 8694-8697.
 238. Hassler, M.R. et al. Comparison of partially and fully chemically-modified siRNA in conjugate-mediated delivery in vivo. // *Nucleic Acids Res.* - 2018. -V., - P.
 239. Nair, J.K. et al. Impact of enhanced metabolic stability on pharmacokinetics and pharmacodynamics of GalNAc-siRNA conjugates. // *Nucleic Acids Res.* - 2017. -V. 45, - P. 10969-10977.
 240. Takahashi, M., Minakawa, N. and Matsuda, A. Synthesis and characterization of 2'-modified-4'-thioRNA: a comprehensive comparison of nuclease stability. // *Nucleic Acids Res.* - 2009. -V. 37, - P. 1353-62.
 241. McNamara, J.O., 2nd, Andrechek, E.R., Wang, Y., Viles, K.D., Rempel, R.E., Gilboa, E., Sullenger, B.A. and Giangrande, P.H. Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. // *Nat Biotechnol.* - 2006. -V. 24, - P. 1005-15.
 242. Lau, S., Graham, B., Cao, N., Boyd, B.J., Pouton, C.W. and White, P.J. Enhanced extravasation, stability and in vivo cardiac gene silencing via in situ siRNA-albumin conjugation. // *Mol Pharm.* - 2012. -V. 9, - P. 71-80.
 243. Kwiatkowska, A., Sobczak, M., Mikolajczyk, B., Janczak, S., Olejniczak, A.B., Sochacki, M., Lesnikowski, Z.J. and Nawrot, B. siRNAs modified with boron cluster and their physicochemical and biological characterization. // *Bioconjug Chem.* - 2013. -V. 24, - P. 1017-26.
 244. Stringham, E.P., Miller, J.K. and Clark, J.R. Overcoming Barriers to Entry in an Established Industry: TESLA MOTORS. // *California Management Review.* - 2015. -V. 57, - P. 85-103.

245. Turner, J.J., Ivanova, G.D., Verbeure, B., Williams, D., Arzumanov, A.A., Abes, S., Lebleu, B. and Gait, M.J. Cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids (PNA) as inhibitors of HIV-1 Tat-dependent trans-activation in cells. // *Nucleic Acids Res.* - 2005. -V. 33, - P. 6837-49.
246. Dovydenko, I., Tarassov, I., Venyaminova, A. and Entelis, N. Method of carrier-free delivery of therapeutic RNA importable into human mitochondria: Lipophilic conjugates with cleavable bonds. // *Biomaterials.* - 2016. -V. 76, - P. 408-17.
247. Rozema, D.B. et al. Dynamic PolyConjugates for targeted in vivo delivery of siRNA to hepatocytes. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2007. -V. 104, - P. 12982-7.
248. Yang, J., Chen, C. and Tang, X. Cholesterol-Modified Caged siRNAs for Photoregulating Exogenous and Endogenous Gene Expression. // *Bioconjug Chem.* - 2018. -V., - P.
249. Letsinger, R.L., Zhang, G.R., Sun, D.K., Ikeuchi, T. and Sarin, P.S. Cholesteryl-conjugated oligonucleotides: synthesis, properties, and activity as inhibitors of replication of human immunodeficiency virus in cell culture. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1989. - V. 86, - P. 6553-6.
250. Ikonen, E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. // *Nat Rev Mol Cell Biol.* - 2008. -V. 9, - P. 125-38.
251. Chait, A. The role of lipoprotein receptors in lipid transport and in the pathogenesis of the hyperlipoproteinemias. // *Spec Top Endocrinol Metab.* - 1983. -V. 5, - P. 1-53.
252. Shah, A.S., Tan, L., Long, J.L. and Davidson, W.S. Proteomic diversity of high density lipoproteins: our emerging understanding of its importance in lipid transport and beyond. // *J Lipid Res.* - 2013. -V. 54, - P. 2575-85.
253. Schaefer, E.J., Santos, R.D. and Asztalos, B.F. Marked HDL deficiency and premature coronary heart disease. // *Curr Opin Lipidol.* - 2010. -V. 21, - P. 289-97.
254. Duriez, P. and Fruchart, J.C. High-density lipoprotein subclasses and apolipoprotein A-I. // *Clin Chim Acta.* - 1999. -V. 286, - P. 97-114.
255. Goldstein, J.L., Brown, M.S., Anderson, R.G., Russell, D.W. and Schneider, W.J. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. // *Annu Rev Cell Biol.* - 1985. -V. 1, - P. 1-39.
256. Yvan-Charvet, L., Pagler, T.A., Wang, N., Senokuchi, T., Brundert, M., Li, H., Rinninger, F. and Tall, A.R. SR-BI inhibits ABCG1-stimulated net cholesterol efflux from cells to plasma HDL. // *J Lipid Res.* - 2008. -V. 49, - P. 107-14.
257. Feingold, K.R. and Grunfeld, C. (2000) Introduction to Lipids and Lipoproteins. In *Endotext* (Feingold, K.R. et al., eds), South Dartmouth (MA).
258. Feinberg, E.H. and Hunter, C.P. Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. // *Science.* - 2003. -V. 301, - P. 1545-7.
259. Mendez-Acevedo, K.M., Valdes, V.J., Asanov, A. and Vaca, L. A novel family of mammalian transmembrane proteins involved in cholesterol transport. // *Sci Rep.* - 2017. -V. 7, - P. 7450.
260. Nguyen, T.A. et al. SIDT2 Transports Extracellular dsRNA into the Cytoplasm for Innate Immune Recognition. // *Immunity.* - 2017. -V. 47, - P. 498-509 e6.
261. Takahashi, M., Contu, V.R., Kabuta, C., Hase, K., Fujiwara, Y., Wada, K. and Kabuta, T. SIDT2 mediates gymnosis, the uptake of naked single-stranded oligonucleotides into living cells. // *RNA Biol.* - 2017. -V. 14, - P. 1534-1543.
262. Gilleron, J. et al. Identification of siRNA delivery enhancers by a chemical library screen. // *Nucleic Acids Res.* - 2015. -V. 43, - P. 7984-8001.
263. Ly, S. et al. Visualization of self-delivering hydrophobically modified siRNA cellular internalization. // *Nucleic Acids Res.* - 2017. -V. 45, - P. 15-25.
264. Lakadamyali, M., Rust, M.J. and Zhuang, X. Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. // *Cell.* - 2006. -V. 124, - P. 997-1009.

265. Brown, M.S. and Goldstein, J.L. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. // *Science*. - 1976. -V. 191, - P. 150-4.
266. Alterman, J.F. et al. Hydrophobically Modified siRNAs Silence Huntingtin mRNA in Primary Neurons and Mouse Brain. // *Mol Ther Nucleic Acids*. - 2015. -V. 4, - P. e266.
267. Moschos, S.A. et al. Lung delivery studies using siRNA conjugated to TAT(48-60) and penetratin reveal peptide induced reduction in gene expression and induction of innate immunity. // *Bioconjug Chem*. - 2007. -V. 18, - P. 1450-9.
268. Byrne, M. et al. Novel hydrophobically modified asymmetric RNAi compounds (sd-rxRNA) demonstrate robust efficacy in the eye. // *J Ocul Pharmacol Ther*. - 2013. -V. 29, - P. 855-64.
269. Khan, T. et al. Silencing Myostatin Using Cholesterol-conjugated siRNAs Induces Muscle Growth. // *Mol Ther Nucleic Acids*. - 2016. -V. 5, - P. e342.
270. Chernikov, I.V., Gladkikh, D.V., Meschaninova, M.I., Karelina, U.A., Ven'yaminova, A.G., Zenkova, M.A., Vlassov, V.V. and Chernolovskaya, E.L. Fluorophore Labeling Affects the Cellular Accumulation and Gene Silencing Activity of Cholesterol-Modified siRNAs In Vitro. // *Nucleic Acid Ther*. - 2019. -V. 29, - P. 33-43.
271. Nikan, M. et al. Docosahexaenoic Acid Conjugation Enhances Distribution and Safety of siRNA upon Local Administration in Mouse Brain. // *Mol Ther Nucleic Acids*. - 2016. -V. 5, - P. e344.
272. Nikan, M. et al. Synthesis and Evaluation of Parenchymal Retention and Efficacy of a Metabolically Stable O-Phosphocholine-N-docosahexaenoyl-l-serine siRNA Conjugate in Mouse Brain. // *Bioconjug Chem*. - 2017. -V. 28, - P. 1758-1766.
273. Biscans, A., Coles, A., Haraszti, R., Echeverria, D., Hassler, M., Osborn, M. and Khvorova, A. Diverse lipid conjugates for functional extra-hepatic siRNA delivery in vivo. // *Nucleic Acids Res*. - 2018. -V., - P.
274. Osborn, M.F. et al. Hydrophobicity drives the systemic distribution of lipid-conjugated siRNAs via lipid transport pathways. // *Nucleic Acids Res*. - 2018. -V. 47, - P.
275. Kordasiewicz, H.B. et al. Sustained therapeutic reversal of Huntington's disease by transient repression of huntingtin synthesis. // *Neuron*. - 2012. -V. 74, - P. 1031-44.
276. Chen, Q. et al. Lipophilic siRNAs mediate efficient gene silencing in oligodendrocytes with direct CNS delivery. // *J Control Release*. - 2010. -V. 144, - P. 227-32.
277. Turanov, A.A. et al. RNAi modulation of placental sFLT1 for the treatment of preeclampsia. // *Nat Biotechnol*. - 2018. -V. 36, - P.
278. Wong, S.C. et al. Co-injection of a targeted, reversibly masked endosomolytic polymer dramatically improves the efficacy of cholesterol-conjugated small interfering RNAs in vivo. // *Nucleic Acid Ther*. - 2012. -V. 22, - P. 380-90.
279. Wooddell, C.I. et al. Hepatocyte-targeted RNAi therapeutics for the treatment of chronic hepatitis B virus infection. // *Mol Ther*. - 2013. -V. 21, - P. 973-85.
280. Wooddell, C.I. et al. RNAi-based treatment of chronically infected patients and chimpanzees reveals that integrated hepatitis B virus DNA is a source of HBsAg. // *Sci Transl Med*. - 2017. -V. 9, - P.
281. Hsu, T. and Mitragotri, S. Delivery of siRNA and other macromolecules into skin and cells using a peptide enhancer. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2011. -V. 108, - P. 15816-21.
282. Cen, B. et al. An Efficient Bivalent Cyclic RGD-PIK3CB siRNA Conjugate for Specific Targeted Therapy against Glioblastoma In Vitro and In Vivo. // *Mol Ther Nucleic Acids*. - 2018. -V. 13, - P. 220-232.
283. Chiu, Y.L., Ali, A., Chu, C.Y., Cao, H. and Rana, T.M. Visualizing a correlation between siRNA localization, cellular uptake, and RNAi in living cells. // *Chem Biol*. - 2004. -V. 11, - P. 1165-75.
284. Muratovska, A. and Eccles, M.R. Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. // *FEBS Lett*. - 2004. -V. 558, - P. 63-8.

285. Ni, X. et al. Prostate-targeted radiosensitization via aptamer-shRNA chimeras in human tumor xenografts. // *J Clin Invest.* - 2011. -V. 121, - P. 2383-90.
286. Neff, C.P. et al. An aptamer-siRNA chimera suppresses HIV-1 viral loads and protects from helper CD4(+) T cell decline in humanized mice. // *Sci Transl Med.* - 2011. -V. 3, - P. 66ra6.
287. Esposito, C.L., Nuzzo, S., Catuogno, S., Romano, S., de Nigris, F. and de Franciscis, V. STAT3 Gene Silencing by Aptamer-siRNA Chimera as Selective Therapeutic for Glioblastoma. // *Mol Ther Nucleic Acids.* - 2018. -V. 10, - P. 398-411.
288. Lai, W.Y., Wang, W.Y., Chang, Y.C., Chang, C.J., Yang, P.C. and Peck, K. Synergistic inhibition of lung cancer cell invasion, tumor growth and angiogenesis using aptamer-siRNA chimeras. // *Biomaterials.* - 2014. -V. 35, - P. 2905-14.
289. Ma, Y. et al. Humanized Lewis-Y specific antibody based delivery of STAT3 siRNA. // *ACS Chem Biol.* - 2011. -V. 6, - P. 962-70.
290. Xia, C.F., Zhang, Y., Boado, R.J. and Pardridge, W.M. Intravenous siRNA of brain cancer with receptor targeting and avidin-biotin technology. // *Pharm Res.* - 2007. -V. 24, - P. 2309-16.
291. Sugo, T. et al. Development of antibody-siRNA conjugate targeted to cardiac and skeletal muscles. // *J Control Release.* - 2016. -V. 237, - P. 1-13.
292. Hossain, D.M. et al. Leukemia cell-targeted STAT3 silencing and TLR9 triggering generate systemic antitumor immunity. // *Blood.* - 2014. -V. 123, - P. 15-25.
293. Rozema, D.B. et al. Protease-triggered siRNA delivery vehicles. // *J Control Release.* - 2015. -V. 209, - P. 57-66.
294. Pooga, M., Hallbrink, M., Zorko, M. and Langel, U. Cell penetration by transportan. // *FASEB J.* - 1998. -V. 12, - P. 67-77.
295. Alberici, L. et al. De novo design of a tumor-penetrating peptide. // *Cancer Res.* - 2013. -V. 73, - P. 804-12.
296. Vives, E., Brodin, P. and Lebleu, B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. // *J Biol Chem.* - 1997. -V. 272, - P. 16010-7.
297. Console, S., Marty, C., Garcia-Echeverria, C., Schwendener, R. and Ballmer-Hofer, K. Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. // *J Biol Chem.* - 2003. -V. 278, - P. 35109-14.
298. van den Berg, A. and Dowdy, S.F. Protein transduction domain delivery of therapeutic macromolecules. // *Curr Opin Biotechnol.* - 2011. -V. 22, - P. 888-93.
299. Thoren, P.E., Persson, D., Karlsson, M. and Norden, B. The antennapedia peptide penetrates translocates across lipid bilayers - the first direct observation. // *FEBS Lett.* - 2000. -V. 482, - P. 265-8.
300. Gagat, My., Zielinska, W. and Grzanka, A. Cell-penetrating peptides and their utility in genome function modifications (Review). // *Int J Mol Med.* - 2017. -V. 40, - P. 1615-1623.
301. Lee, S.H., Castagner, B. and Leroux, J.C. Is there a future for cell-penetrating peptides in oligonucleotide delivery? // *Eur J Pharm Biopharm.* - 2013. -V. 85, - P. 5-11.
302. Heitz, F., Morris, M.C. and Divita, G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. // *Br J Pharmacol.* - 2009. -V. 157, - P. 195-206.
303. Meyer, M., Dohmen, C., Philipp, A., Kiener, D., Maiwald, G., Scheu, C., Ogris, M. and Wagner, E. Synthesis and biological evaluation of a bioresponsive and endosomolytic siRNA-polymer conjugate. // *Mol Pharm.* - 2009. -V. 6, - P. 752-62.
304. Alam, M.R., Ming, X., Fisher, M., Lackey, J.G., Rajeev, K.G., Manoharan, M. and Juliano, R.L. Multivalent cyclic RGD conjugates for targeted delivery of small interfering RNA. // *Bioconjug Chem.* - 2011. -V. 22, - P. 1673-81.

305. Sugahara, K.N. et al. Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors. // *Cancer Cell*. - 2009. -V. 16, - P. 510-20.
306. Dubey, P.K., Mishra, V., Jain, S., Mahor, S. and Vyas, S.P. Liposomes modified with cyclic RGD peptide for tumor targeting. // *J Drug Target*. - 2004. -V. 12, - P. 257-64.
307. Weis, S.M. and Cheresh, D.A. α V integrins in angiogenesis and cancer. // *Cold Spring Harb Perspect Med*. - 2011. -V. 1, - P. a006478.
308. El-Andaloussi, S., Jarver, P., Johansson, H.J. and Langel, U. Cargo-dependent cytotoxicity and delivery efficacy of cell-penetrating peptides: a comparative study. // *Biochem J*. - 2007. -V. 407, - P. 285-92.
309. Boeckle, S., Wagner, E. and Ogris, M. C- versus N-terminally linked melittin-polyethylenimine conjugates: the site of linkage strongly influences activity of DNA polyplexes. // *J Gene Med*. - 2005. -V. 7, - P. 1335-47.
310. Hamil, A.S. and Dowdy, S.F. Synthesis and Conjugation of Small Interfering Ribonucleic Neutral SiRNAs. // *Methods Mol Biol*. - 2016. -V. 1364, - P. 1-9.
311. Kolosenko, I., Edsbacker, E., Bjorklund, A.C., Hamil, A.S., Goroshchuk, O., Grander, D., Dowdy, S.F. and Palm-Apergi, C. RNAi prodrugs targeting Plk1 induce specific gene silencing in primary cells from pediatric T-acute lymphoblastic leukemia patients. // *J Control Release*. - 2017. -V. 261, - P. 199-206.
312. Musk, E. Making Humans a Multi-Planetary Species. // *New Space*. - 2017. -V. 5, - P. 46-61.
313. Sun, J., Pohl, E.E., Krylova, O.O., Krause, E., Agapov, II, Tonevitsky, A.G. and Pohl, P. Membrane destabilization by ricin. // *Eur Biophys J*. - 2004. -V. 33, - P. 572-9.
314. Chen, G., Wang, Y., Xie, R. and Gong, S. Tumor-targeted pH/redox dual-sensitive unimolecular nanoparticles for efficient siRNA delivery. // *J Control Release*. - 2017. -V. 259, - P. 105-114.
315. Tu, Y. and Kim, J.S. A fusogenic segment of glycoprotein H from herpes simplex virus enhances transfection efficiency of cationic liposomes. // *J Gene Med*. - 2008. -V. 10, - P. 646-54.
316. Wadia, J.S., Stan, R.V. and Dowdy, S.F. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. // *Nat Med*. - 2004. -V. 10, - P. 310-5.
317. Lee, Y.J., Johnson, G., Peltier, G.C. and Pellois, J.P. A HA2-Fusion tag limits the endosomal release of its protein cargo despite causing endosomal lysis. // *Biochim Biophys Acta*. - 2011. -V. 1810, - P. 752-8.
318. Barati, S., Chegini, F., Hurtado, P. and Rush, R.A. Hybrid tetanus toxin C fragment-diphtheria toxin translocation domain allows specific gene transfer into PC12 cells. // *Exp Neurol*. - 2002. -V. 177, - P. 75-87.
319. Nikam, R.R. and Gore, K.R. Journey of siRNA: Clinical Developments and Targeted Delivery. // *Nucleic Acid Ther*. - 2018. -V., - P.
320. Spiess, M. The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors. // *Biochemistry*. - 1990. -V. 29, - P. 10009-18.
321. Willoughby, J.L.S. et al. Evaluation of GalNAc-siRNA Conjugate Activity in Pre-clinical Animal Models with Reduced Asialoglycoprotein Receptor Expression. // *Mol Ther*. - 2018. -V. 26, - P. 105-114.
322. Xia, W. and Low, P.S. Folate-targeted therapies for cancer. // *J Med Chem*. - 2010. -V. 53, - P. 6811-24.
323. Parker, N., Turk, M.J., Westrick, E., Lewis, J.D., Low, P.S. and Leamon, C.P. Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. // *Anal Biochem*. - 2005. -V. 338, - P. 284-93.
324. Low, P.S., Henne, W.A. and Doorneweerd, D.D. Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases. // *Acc Chem Res*. - 2008. -V. 41, - P. 120-9.

325. Zhou, J. and Rossi, J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. // *Nat Rev Drug Discov.* - 2017. -V. 16, - P. 181-202.
326. Catuogno, S., Esposito, C.L., Condorelli, G. and de Franciscis, V. Nucleic acids delivering nucleic acids. // *Adv Drug Deliv Rev.* - 2018. -V., - P.
327. Esposito, C.L. et al. A combined microRNA-based targeted therapeutic approach to eradicate glioblastoma stem-like cells. // *J Control Release.* - 2016. -V. 238, - P. 43-57.
328. Ireson, C.R. and Kelland, L.R. Discovery and development of anticancer aptamers. // *Mol Cancer Ther.* - 2006. -V. 5, - P. 2957-62.
329. Yan, A.C. and Levy, M. Aptamer-Mediated Delivery and Cell-Targeting Aptamers: Room for Improvement. // *Nucleic Acid Ther.* - 2018. -V. 28, - P. 194-199.
330. Hori, S.I., Herrera, A., Rossi, J.J. and Zhou, J. Current Advances in Aptamers for Cancer Diagnosis and Therapy. // *Cancers (Basel).* - 2018. -V. 10, - P.
331. Baumer, S. et al. Antibody-mediated delivery of anti-KRAS-siRNA in vivo overcomes therapy resistance in colon cancer. // *Clin Cancer Res.* - 2015. -V. 21, - P. 1383-94.
332. Ibtehaj, N. and Huda, R. High-dose BAFF receptor specific mAb-siRNA conjugate generates Fas-expressing B cells in lymph nodes and high-affinity serum autoantibody in a myasthenia mouse model. // *Clin Immunol.* - 2017. -V. 176, - P. 122-130.
333. Chen, P.I., Schauer, K., Kong, C., Harding, A.R., Goud, B. and Stahl, P.D. Rab5 isoforms orchestrate a "division of labor" in the endocytic network; Rab5C modulates Rac-mediated cell motility. // *PLoS One.* - 2014. -V. 9, - P. e90384.
334. Lee, Y.S. et al. Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking. // *Nat Cell Biol.* - 2009. -V. 11, - P. 1150-6.
335. Nechaev, S. et al. Intracellular processing of immunostimulatory CpG-siRNA: Toll-like receptor 9 facilitates siRNA dicing and endosomal escape. // *J Control Release.* - 2013. -V. 170, - P. 307-15.
336. Zhang, Q. et al. TLR9-mediated siRNA delivery for targeting of normal and malignant human hematopoietic cells in vivo. // *Blood.* - 2013. -V. 121, - P. 1304-15.
337. 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. -V. 27, - P. 925-32.
338. Sen, M. et al. First-in-human trial of a STAT3 decoy oligonucleotide in head and neck tumors: implications for cancer therapy. // *Cancer Discov.* - 2012. -V. 2, - P. 694-705.
339. Zhang, Q. et al. Serum-resistant CpG-STAT3 decoy for targeting survival and immune checkpoint signaling in acute myeloid leukemia. // *Blood.* - 2016. -V. 127, - P. 1687-700.
340. Turner, A.M. et al. Hepatic-targeted RNA interference provides robust and persistent knockdown of alpha-1 antitrypsin levels in ZZ patients. // *J Hepatol.* - 2018. -V. 69, - P. 378-384.
341. Adams, D. et al. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. // *N Engl J Med.* - 2018. -V. 379, - P. 11-21.
342. Garber, K. Alnylam launches era of RNAi drugs. // *Nat Biotechnol.* - 2018. -V. 36, - P. 777-778.
343. Solomon, S.D. et al. Effects of Patisiran, an RNA Interference Therapeutic, on Cardiac Parameters in Patients With Hereditary Transthyretin-Mediated Amyloidosis. // *Circulation.* - 2019. -V. 139, - P. 431-443.
344. Huang, Y. Preclinical and Clinical Advances of GalNAc-Decorated Nucleic Acid Therapeutics. // *Mol Ther Nucleic Acids.* - 2017. -V. 6, - P. 116-132.
345. Springer, A.D. and Dowdy, S.F. GalNAc-siRNA Conjugates: Leading the Way for Delivery of RNAi Therapeutics. // *Nucleic Acid Ther.* - 2018. -V. 28, - P. 109-118.
346. Croke, S.T., Witztum, J.L., Bennett, C.F. and Baker, B.F. RNA-Targeted Therapeutics. // *Cell Metab.* - 2018. -V. 27, - P. 714-739.
347. Shen, X. and Corey, D.R. Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs. // *Nucleic Acids Res.* - 2017. -V., - P.

348. Bellon, L. Oligoribonucleotides with 2'-O-(tert-butyldimethylsilyl) groups. // *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. - 2001. -V., - P. 10.1002/0471142700.nc0306s01.
349. MacKellar, C., Graham, D., Will, D.W., Burgess, S. and Brown, T. Synthesis and physical properties of anti-HIV antisense oligonucleotides bearing terminal lipophilic groups. // *Nucleic Acids Res.* - 1992. -V. 20, - P. 3411-7.
350. Manoharan, M., Kesavan, V. and Rajeev, K.G. Modified iRNA agents. // US Patent 20050107325 A1 -2005.
351. Petrova, N.S., Chernikov, I.V., Meschaninova, M.I., Dovydenko, I.S., Venyaminova, A.G., Zenkova, M.A., Vlassov, V.V. and 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, - P. 2330-44.
352. Kanamaru, H., Kakehi, Y., Yoshida, O., Nakanishi, S., Pastan, I. and Gottesman, M.M. *MDR1* RNA levels in human renal cell carcinomas: correlation with grade and prediction of reversal of doxorubicin resistance by quinidine in tumor explants. // *J Natl Cancer Inst.* - 1989. -V. 81, - P. 844-9.
353. Proudnikov, D. and Mirzabekov, A. Chemical methods of DNA and RNA fluorescent labeling. // *Nucleic Acids Res.* - 1996. -V. 24, - P. 4535-42.
354. Leonard, G.D., Fojo, T. and Bates, S.E. The role of ABC transporters in clinical practice. // *Oncologist*. - 2003. -V. 8, - P. 411-24.
355. Noonan, K.E. et al. Quantitative analysis of *MDR1* (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1990. -V. 87, - P. 7160-4.
356. Consoli, U. et al. Multidrug resistance mechanisms in chronic lymphocytic leukaemia. // *Br J Haematol.* - 2002. -V. 116, - P. 774-80.
357. Gottesman, M.M. Mechanisms of cancer drug resistance. // *Annu Rev Med.* - 2002. -V. 53, - P. 615-27.
358. Robey, R.W., Pluchino, K.M., Hall, M.D., Fojo, A.T., Bates, S.E. and Gottesman, M.M. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. // *Nat Rev Cancer.* - 2018. -V. 18, - P. 452-464. дичь
359. Tamaki, A., Ierano, C., Szakacs, G., Robey, R.W. and Bates, S.E. The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. // *Essays Biochem.* - 2011. -V. 50, - P. 209-32.
360. Binkhathlan, Z. and Lavasanifar, A. P-glycoprotein Inhibition as a Therapeutic Approach for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: Current Status and Future Perspectives. // *Current Cancer Drug Targets.* - 2013. -V. 13, - P. 326-346.
361. Sharom, F.J. Complex Interplay between the P-Glycoprotein Multidrug Efflux Pump and the Membrane: Its Role in Modulating Protein Function. // *Front Oncol.* - 2014. -V. 4, - P. 41.
362. Logashenko, E.B., Chernolovskaya, E.L., Vladimirova, A.V., Repkova, M.N., Ven'yaminova, A.G. and Vlasov, V.V. Short double-stranded RNA suppresses multiple drug resistance gene expression in tumor cells. // *Dokl Biochem Biophys.* - 2002. -V. 386, - P. 296-7.
363. Logashenko, E.B., Vladimirova, A.V., Repkova, M.N., Venyaminova, A.G., Chernolovskaya, E.L. and Vlassov, V.V. Silencing of *MDR 1* gene in cancer cells by siRNA. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* - 2004. -V. 23, - P. 861-6.
364. Logashenko, E.B., Vladimirova, A.V. and Volkov, A.A. Suppression of *MDR1* gene expression by chemically modified siRNAs. // *Russian Chemical Bulletin, International Edition.* - 2006. -V. 55 -P. 1275—1283.
365. Landry, B., Valencia-Serna, J., Gul-Uludag, H., Jiang, X., Janowska-Wieczorek, A., Brandwein, J. and Uludag, H. Progress in RNAi-mediated Molecular Therapy of Acute and Chronic Myeloid Leukemia. // *Mol Ther Nucleic Acids.* - 2015. -V. 4, - P. e240.

366. Matsuda, S. et al. siRNA conjugates carrying sequentially assembled trivalent N-acetylgalactosamine linked through nucleosides elicit robust gene silencing in vivo in hepatocytes. // *ACS Chem Biol.* - 2015. -V. 10, - P. 1181-7.
367. Rossi, J.J. Medicine: a cholesterol connection in RNAi. // *Nature.* - 2004. -V. 432, - P. 155-6.
368. Zhang, M., Pickart, C.M. and Coffino, P. Determinants of proteasome recognition of ornithine decarboxylase, a ubiquitin-independent substrate. // *EMBO J.* - 2003. -V. 22, - P. 1488-96.
369. Richert, N.D., Aldwin, L., Nitecki, D., Gottesman, M.M. and Pastan, I. Stability and covalent modification of P-glycoprotein in multidrug-resistant KB cells. // *Biochemistry.* - 1988. -V. 27, - P. 7607-13.
370. Gilleron, J. et al. Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. // *Nat Biotechnol.* - 2013. -V. 31, - P. 638-46.
371. Eckford, P.D. and Sharom, F.J. The reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter is a flippase for glucosylceramide and other simple glycosphingolipids. // *Biochem J.* - 2005. -V. 389, - P. 517-26.
372. Leventis, R. and Silvius, J.R. Use of cyclodextrins to monitor transbilayer movement and differential lipid affinities of cholesterol. // *Biophys J.* - 2001. -V. 81, - P. 2257-67.
373. Kotula, J.W., Pratico, E.D., Ming, X., Nakagawa, O., Juliano, R.L. and Sullenger, B.A. Aptamer-Mediated Delivery of Splice-Switching Oligonucleotides to the Nuclei of Cancer Cells. // *Nucleic Acid Therapeutics.* - 2012. -V. 22, - P. 187-195.
374. Ivanov, A.I. Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? // *Methods Mol Biol.* - 2008. -V. 440, - P. 15-33.
375. Alam, M.R., Ming, X., Dixit, V., Fisher, M., Chen, X. and Juliano, R.L. The biological effect of an antisense oligonucleotide depends on its route of endocytosis and trafficking. // *Oligonucleotides.* - 2010. -V. 20, - P. 103-9.
376. Osborn, M.F., Alterman, J.F., Nikan, M., Cao, H., Didiot, M.C., Hassler, M.R., Coles, A.H. and Khvorova, A. Guanabenz (Wytensin) selectively enhances uptake and efficacy of hydrophobically modified siRNAs. // *Nucleic Acids Res.* - 2015. -V. 43, - P. 8664-72.
377. Crooke, S.T., Wang, S., Vickers, T.A., Shen, W. and Liang, X.H. Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides. // *Nat Biotechnol.* - 2017. -V. 35, - P. 230-237.
378. Chen, Y.H., Lin, W.W., Liu, C.S., Hsu, L.S., Lin, Y.M. and Su, S.L. Caveolin-1 provides palliation for adverse hepatic reactions in hypercholesterolemic rabbits. // *PLoS One.* - 2014. -V. 9, - P. e71862.
379. Wang, J., Fedoseienko, A., Chen, B., Burstein, E., Jia, D. and Billadeau, D.D. Endosomal receptor trafficking: Retromer and beyond. // *Traffic.* - 2018. -V., - P.
380. Juliano, R.L. Intracellular Trafficking and Endosomal Release of Oligonucleotides: What We Know and What We Don't. // *Nucleic Acid Ther.* - 2018. -V. 28, - P. 166-177.
381. Pei, Y. et al. Quantitative evaluation of siRNA delivery in vivo. // *RNA.* - 2010. -V. 16, - P. 2553-63.
382. Czimmerer, Z. et al. A versatile method to design stem-loop primer-based quantitative PCR assays for detecting small regulatory RNA molecules. // *PLoS One.* - 2013. -V. 8, - P. e55168.
383. Wahba, A.S. et al. Phenylpyrrolocytosine as an unobtrusive base modification for monitoring activity and cellular trafficking of siRNA. // *ACS Chem Biol.* - 2011. -V. 6, - P. 912-9.
384. Jeong, J.H., Kim, S.W. and Park, T.G. Novel intracellular delivery system of antisense oligonucleotide by self-assembled hybrid micelles composed of DNA/PEG conjugate and cationic fusogenic peptide. // *Bioconjug Chem.* - 2003. -V. 14, - P. 473-9.
385. Wada, S., Yasuhara, H., Wada, F., Sawamura, M., Waki, R., Yamamoto, T., Harada-Shiba, M. and Obika, S. Evaluation of the effects of chemically different linkers on

- hepatic accumulations, cell tropism and gene silencing ability of cholesterol-conjugated antisense oligonucleotides. // *Journal of Controlled Release*. - 2016. -V. 226, - P. 57-65.
386. Agrawal, N., Toner, M. and Irimia, D. Neutrophil migration assay from a drop of blood. // *Lab Chip*. - 2008. -V. 8, - P. 2054-61.
387. Miller, C.M., Tanowitz, M., Donner, A.J., Prakash, T.P., Swayze, E.E., Harris, E.N. and Seth, P.P. Receptor-Mediated Uptake of Phosphorothioate Antisense Oligonucleotides in Different Cell Types of the Liver. // *Nucleic Acid Ther.* - 2018. -V. 28, - P. 119-127.
388. Golombek, S.K., May, J.N., Theek, B., Appold, L., Drude, N., Kiessling, F. and Lammers, T. Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses. // *Adv Drug Deliv Rev.* - 2018. -V. 130, - P. 17-38.
389. Matsumura, Y. and Maeda, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. // *Cancer Res.* - 1986. -V. 46, - P. 6387-92.
390. Kutova, O.M., Guryev, E.L., Sokolova, E.A., Alzeibak, R. and Balalaeva, I.V. Targeted Delivery to Tumors: Multidirectional Strategies to Improve Treatment Efficiency. // *Cancers (Basel)*. - 2019. -V. 11, - P.
391. Zenkov, A.N., Scvortsova, N.V., Chernolovskaya, E.L., Pospelova, T.I. and Vlassov, V.V. Expression of the *MDR1* and *MRP* genes in patients with lymphoma with primary bone marrow involvement. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. - 2004. -V. 23, - P. 843-7.
392. Wu, H., Hait, W.N. and Yang, J.M. Small interfering RNA-induced suppression of *MDR1* (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. // *Cancer Res.* - 2003. -V. 63, - P. 1515-9.
393. Xu, D., Kang, H., Fisher, M. and Juliano, R.L. Strategies for inhibition of *MDR1* gene expression. // *Mol Pharmacol.* - 2004. -V. 66, - P. 268-75.
394. Guo, N., Gao, C., Liu, J., Li, J., Liu, N., Hao, Y., Chen, L. and Zhang, X. Reversal of Ovarian Cancer Multidrug Resistance by a Combination of LAH4-L1-si*MDR1* Nanocomplexes with Chemotherapeutics. // *Mol Pharm.* - 2018. -V. 15, - P. 1853-1861.
395. Navarro, G., Sawant, R.R., Biswas, S., Essex, S., Tros de Ilarduya, C. and Torchilin, V.P. P-glycoprotein silencing with siRNA delivered by DOPE-modified PEI overcomes doxorubicin resistance in breast cancer cells. // *Nanomedicine (Lond)*. - 2012. -V. 7, - P. 65-78.
396. Risnayanti, C., Jang, Y.S., Lee, J. and Ahn, H.J. PLGA nanoparticles co-delivering *MDR1* and *BCL2* siRNA for overcoming resistance of paclitaxel and cisplatin in recurrent or advanced ovarian cancer. // *Sci Rep.* - 2018. -V. 8, - P. 7498.
397. Essex, S., Navarro, G., Sabhachandani, P., Chordia, A., Trivedi, M., Movassaghian, S. and Torchilin, V.P. Phospholipid-modified PEI-based nanocarriers for in vivo siRNA therapeutics against multidrug-resistant tumors. // *Gene Ther.* - 2015. -V. 22, - P. 257-66.
398. Yhee, J.Y. et al. Cancer-targeted MDR-1 siRNA delivery using self-cross-linked glycol chitosan nanoparticles to overcome drug resistance. // *J Control Release.* - 2015. -V. 198, - P. 1-9.
399. Shi, X.L., Li, Y., Zhao, L.M., Su, L.W. and Ding, G. Delivery of MTH1 inhibitor (TH287) and *MDR1* siRNA via hyaluronic acid-based mesoporous silica nanoparticles for oral cancers treatment. // *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces.* - 2019. -V. 173, - P. 599-606.
400. Zhang, J. et al. Overcoming Multidrug Resistance by Codelivery of *MDR1*-Targeting siRNA and Doxorubicin Using EphA10-Mediated pH-Sensitive Lipoplexes: In Vitro and In Vivo Evaluation. // *ACS Appl Mater Interfaces.* - 2018. -V. 10, - P. 21590-21600.