

Что такое терапевтические нуклеиновые кислоты и как они взаимодействуют с клетками

М.А. Зенкова

Введение

Одним из вызовов современности является необходимость создание средств терапии, способных обеспечить длительную активную жизнь людей. Проблема обеспечения активного долголетия остро стоит во всем мире и в России в том числе. Причем Россия по основным показателям, характеризующих, в том числе, и обеспеченность средствами терапии (средняя продолжительность жизни, смертность от социально значимых заболеваний, качество жизни пожилых людей и др.) существенно уступает другим странам и несет в связи с этим огромные экономические потери. В связи с этим как приоритетное направление необходимо рассматривать создание принципиально новых лекарственных средств, которые смогут позволить решить задачи, нерешаемые препаратами, существующими сегодня.

Очевидно, что прорыв в создании новых эффективных методов лечения заболеваний может быть обеспечен при использовании достижений современной науки в разработке постгеномных методов, бионанотехнологий и клеточных технологий. Достижения в области генетики и химии нуклеиновых кислот создали основу для разработки принципиально новых терапевтических препаратов, избирательно воздействующих на первопричину заболеваний-генетические программы, ответственные за развитие патологических процессов. Такие препараты могут быть разработаны на основе фрагментов нуклеиновых кислот - олигонуклеотидов, способных избирательно взаимодействовать с заданными нуклеотидными последовательностями в составе генетических программ-мишеней и на основе искусственно созданных генетических конструкций, способных функционировать в клетках и обеспечивать синтез продуктов, которые в клетке не производятся или производятся в неактивной форме вследствие дефектов в клеточном геноме (заместительная терапия).

Исследования в области создания ген-направленных биологически активных веществ на основе нуклеиновых кислот приобрели в последние годы взрывоподобный характер. Уже продемонстрирована возможность подавления олигонуклеотидами экспрессии определенных генов, продемонстрирована возможность осуществления заместительной генотерапии и генной вакцинации путем введения в организм функционально активных генетических конструкций, активно развиваются подходы по коррекции регуляции экспрессии генов с использованием эффекта РНК интерференции и аналогов микроРНК.

Настоящая статья посвящена терапевтическим препаратам на основе нуклеиновых кислот: рассмотрены основные виды таких препаратов, их мишени и механизм действия, современное состояние исследований. В статье рассмотрены также пути доставки нуклеиновых кислот в клетки, поскольку проблема доставки в клетки является основной проблемой на пути широкого применения терапевтических нуклеиновых кислот и разработке терапевтических препаратов на их основе.

Терапевтические нуклеиновые кислоты

Одним из наиболее обещающих подходов к созданию эффективных высокоизбирательных средств терапии является конструирование препаратов на основе нуклеиновых кислот, мишенями для которых являются генетические программы

инфекционных агентов и клеточные генетические программы, ответственные за развитие заболеваний. К настоящему времени расшифрованы геномы большинства инфекционных агентов, поражающих человека, интенсивно идет поиск мутаций и специфических клеточных генов, ответственных за развитие патологических процессов. Уже идентифицированы или в ближайшее время будут известны конкретные генетические мишени для воздействия с целью лечения различных инфекционных заболеваний и заболеваний, связанных с нарушениями функций генов (генетические заболевания, заболевания, связанные с недостаточной продукцией клетками определенных белков или синтезом неактивных продуктов).

Работы по созданию терапевтических нуклеиновых кислот могут успешно развиваться в России. Российские ученые лидировали в развитии этого направления в 80е годы, и в стране сохранились сильные школы и специалисты, в настоящее время успешно работающие в данной области. Важно то, что в России имеются оригинальные технологии и приборы, необходимые для развития данного направления. Фирма Биоссет в Новосибирске производит робототехнику для манипуляций с нуклеиновыми кислотами и оригинальные эффективные синтезаторы олигонуклеотидов, которые экспортируются в развитые страны, в том числе, в США. Фирма Эконова производит надежные микроколоночные хроматографы, необходимые для выделения и анализа нуклеиновых кислот.

Можно с уверенностью утверждать, что в ближайшее время на основе нуклеиновых кислот будут созданы эффективные противовирусные и противоопухолевые препараты, иммуномодулирующие препараты и вакцины. Можно ожидать создания средств генотерапии для лечения наследственных заболеваний, таких как иммунодефицитные состояния, эндокринные нарушения. Особо следует отметить возможность быстрой разработки противовирусных препаратов, обеспечиваемую универсальной схемой синтеза нуклеиновых кислот. Создание базы для быстрой разработки и синтеза противовирусных препаратов необходимо для защиты от вновь возникающих опасных вирусов, таких, как высокопатогенные штаммы вируса гриппа.

1. Препараты на основе нуклеиновых кислот (НК)

Нуклеиновые кислоты (НК) выполняют роль хранителей и переносчиков генетической информации и являются неотъемлемой частью многих биологических процессов, начиная с синтеза белков и заканчивая узкоспецифичными регуляторными и каталитическими функциями. Без всякого преувеличения можно сказать, что НК представляют один из основополагающих элементов всех известных науке живых систем. Неудивительно, что интерес к НК за время их исследования приобрел не только фундаментальный, но и прикладной характер, что привело к разработке нового класса потенциальных терапевтических агентов на основе НК. К таким препаратам относятся экспрессирующие векторы, малые шпилечные РНК (shРНК) и короткие интерферирующие РНК (siРНК), антисмысловые, антигенные и иммуностимулирующие олигонуклеотиды, аптамеры, рибозимы и ДНКазимы.

Одним из наиболее важных преимуществ использования НК в качестве терапевтических агентов по сравнению с ныне существующими низкомолекулярными лекарственными соединениями является селективность их взаимодействия с молекулярными мишенями, что обеспечивается высокоточными комплементарными взаимодействиями между гетероциклическими основаниями взаимодействующих цепей. Именно такая точность взаимодействия определяет высокую специфичность вызываемых НК биологических эффектов.

Универсальная технологическая платформа получения различных НК позволяет легко нарабатывать необходимые количества препаратов на их основе, используя автоматизированный синтез для олигонуклеотидов и генно-инженерные процедуры для плазмидных ДНК (пДНК). Сегодня большинство препаратов на основе НК находятся либо на стадии разработки, либо на ранних стадиях клинических испытаний. Тем не менее, на основании полученных научных и клинических результатов уже можно сказать, что в рамках этого класса биологически активных веществ создаются перспективные кандидаты для лечения широкого спектра заболеваний, включая онкологические и сердечно-сосудистые заболевания, неврологические болезни, такие как болезни Паркинсона и Альцгеймера, тяжелые наследственные нарушения развития (например, некоторые мышечные дистрофии) и вирусные инфекции.

Препараты на основе НК достаточно разнообразны: они отличаются по механизму и продолжительности действия, типу используемой молекулы НК и локализации мишени. Общей чертой таких терапевтических агентов является необходимость селективной доставки НК внутрь клеток *in vitro* или *in vivo*. Существуют методы, позволяющие добиться проникновения различных молекул НК одновременно во многие ткани организма, либо в определенные типы клеток. В зависимости от размера доставляемой молекулы НК, требуемого количества введений в организм или в культуру клеток и типа клеток предпочтение отдается различным способам доставки НК к внутриклеточным мишеням.

1.1. Генотерапия

Это терапевтический метод, основанный на введении в клетки ДНК, содержащей функциональные гены и полученной методами генной инженерии. При генотерапии в клетки с помощью процедур, проводимых *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*, вводится новый генетический материал. В зависимости от мишени могут быть использованы различные стратегии: “выключение” гена-мишени (“knockout”); замена дефектной копии гена на функциональную; “стратегия самоубийства”, приводящая к запуску механизмов апоптоза в трансформированных клетках; иммуномодуляция. Помимо коррекции приобретенных с течением жизни нарушений генная терапия имеет потенциальное применение для лечения наследственных генетических заболеваний.

Основной проблемой, сдерживающей развитие генотерапевтических технологий, является очень низкая эффективность включения терапевтических нуклеиновых кислот в дифференцированные клетки организма. При *in vivo* генотерапии, функции дефектного гена в организме корректируются лишь временно. Задачей является развитие методов, позволяющих долговременную коррекцию функций генов.

Ex vivo генотерапия позволяет решить проблему долговременной коррекции функций генов. Этот подход основан на манипуляциях с клетками, временно извлеченными из организма, а также со стволовыми клетками, что позволяет использовать для введения в них нуклеиновых кислот более широкий арсенал методов.

Извлеченные из организма клетки (мезенхимальные или гематопоэтические стволовые, предшественники дендритных клеток) выращивают в лабораторных условиях. Терапевтические ДНК или РНК вводят в отдельные клетки, и эти трансфицированные клетки вводятся пациенту. Эти клетки и обеспечивают долговременный эффект в организме.

1.1.1. Плазмидные ДНК или пДНК

Чаще всего в качестве генотерапевтического ДНК вектора, экспрессирующего нужный белок, используют плазмидные ДНК, нарабатываемые в *E. coli*. При создании таких векторов основной целью является получение ДНК-конструкции, способной обеспечить длительную и эффективную экспрессию в клетках организма нужного белка при минимально возможных токсических эффектах. Полагалось, что только стабильная трансфекция клеток с использованием интегрирующихся в геном ретровирусных векторов может обеспечить постоянную экспрессию нужного белка, а все векторы на основе плазмид считались неэффективными для достижения длительного терапевтического эффекта. Сравнительно недавно было показано, что некоторые плазмиды могут существовать в эписомальной форме и производить нужный белок в течение длительного времени (до 6 месяцев). По сравнению с вирусными или интегрирующимися векторами такие эписомальные векторы имеют целый ряд преимуществ: 1) низкую иммуногенность, 2) низкую токсичность, 3) простоту и низкую стоимость производства, 4) невозможность рекомбинации, 5) невозможность онкогенной трансформации вследствие встраивания в геном, 6) возможность доставлять большие гены. Такие эписомальные векторы получили название мини-кольцевой ДНК. Эти векторы получают путем удаления из бактериальной плазмиды всех бактериальных последовательностей, что приводит к значительному повышению уровня экспрессии трансгенного белка (в 45-500 раз) и длительности его экспрессии (до 6-8 месяцев).

1.1.2. ДНК вакцины

ДНК вакцинация основана на введении в организм генов, кодирующих антиген связанный с причиной заболевания, для того, чтобы обеспечить синтез в организме этого антигена и обеспечить специфический иммунный ответ.

Инъекции в мышечную ткань свободной плазмидной ДНК, содержащей генетическую конструкцию, необходимую для синтеза антигена, приводит к развитию и гуморального и клеточного иммунитета. Проблема в том, что эффективность иммунизации свободной ДНК низка и предпринимаются интенсивные попытки решить эту проблему. Идущие в настоящее время клинические испытания связаны с попытками разработки технологии ДНК-вакцинации для профилактики вирусных заболеваний (гепатит С) и лечения опухолей.

В плане создания средств генной иммунизации, представляется перспективной разработка не вызывающих мутации РНК-вакцин.

1.1.3. Препараты на основе олигонуклеотидов.

К таким препаратам относятся малые шпилечные РНК (shРНК) и короткие интерферирующие РНК (siРНК), антисмысловые, антигенные и иммуностимулирующие олигонуклеотиды, аптамеры, рибозимы и ДНКазимы.

Действие антисмысловых олигонуклеотидов, рибозимов, siРНК и shРНК нацелено на снижение уровня специфической мРНК, экспрессируемой с последовательности гена-мишени. В основе биологической активности антисмысловых и антигенных олигонуклеотидов лежит образование дуплекса или триплекса с комплементарной последовательностью НК (мРНК или геномной ДНК, соответственно) внутри клетки, что либо индуцирует разрушение соответствующей мРНК под действием клеточных ферментов, либо приводит к изменению транскрипции мРНК гена-мишени.

Следует отметить, что связывание олигонуклеотидов и с мРНК, и с ДНК высокоспецифично: любая нуклеотидная последовательность длиной в 20 нуклеотидов

повторяется в геноме человека один раз. Конечно, существует проблема образования комплексов с неправильно спаренными основаниями, однако, в настоящее время селективность связывания антисмысловых олигонуклеотидов можно легко повысить путем их химической модификации.

Успехи в области химии и биохимии нуклеиновых кислот создали возможность производства олигонуклеотидов: РНК, ДНК и их химически модифицированных аналогов, которые способны модулировать функции целевых РНК и ДНК и инактивировать определенные нуклеиновые кислоты. Огромным преимуществом таких препаратов является то, что для них точно известны механизм действия, определены их терапевтические мишени, а также то, что разные терапевтические нуклеиновые кислоты отличаются лишь последовательностью составляющих их нуклеотидов, что позволяет синтезировать любые терапевтические нуклеиновые кислоты универсальными методами, по одной и той же технологии, из универсальных исходных мономеров.

Отдельно внимания заслуживают аналоги олигонуклеотидов – синтетические молекулы, в которых природные нуклеотидные звенья замещены на их модифицированные аналоги с целью 1) улучшения их гибридизационных свойств (способность взаимодействовать с комплементарной последовательностью), 2) повышение их устойчивости по отношению к эндо- и экзонуклеазам и как следствие, времени жизни в клетке и в организме; 3) введения флуоресцентных красителей; 4) получения реакционноспособных аналогов олигонуклеотидов, способных модифицировать или расщеплять нуклеиновую кислоту – мишень; 5) улучшения их проникновения в клетки и др. Получение химически модифицированных олигонуклеотидов в настоящее время представляет собой в основном решенную задачу. На рынке представлены мономеры, позволяющие синтезировать олигонуклеотиды, с практически любыми модификациями рибозо (дезоксирибозо)-фосфатного остова и оснований или содержащие широкий набор дополнительных функциональных групп. Следует отметить, что исследования в данной области продолжаются.

1.1.4. Олигонуклеотидные препараты для коррекции генов

В последние годы были сделаны важные открытия, которые позволяют надеяться на возможность использования олигонуклеотидных конструкций для эффективного долговременного подавления функций определенных генов и для коррекции дефектных генов живых организмов путем внесения в гены направленных мутаций.

Модифицированные олигонуклеотиды могут вносить в генетические программы точечные мутации, что открывает возможность создания препаратов для коррекции генетических нарушений. Механизм внесения точечных мутаций включает образование несовершенного комплекса корректирующего олигонуклеотида с целевым участком заданной генетической программы и последующую замену нуклеотида в цепи ДНК клеточными системами репарации. Создание корректирующих олигонуклеотидов, способных образовывать комплексы повышенной прочности с ДНК, разработка способов их доставки в клетки и эффективной мобилизации репарационных ферментов позволят исправлять ряд генетических дефектов, ответственных за наследственные заболевания.

Интерферирующие РНК (shРНК и siРНК)

Крайне перспективной является стратегия подавления экспрессии определенных генов, основанная на явлении РНК-интерференции. В процессе РНК интерференции, запускаемом при введении в клетку специфичной двуцепочечной РНК (siРНК, shРНК),

происходит разрушение мРНК, последовательности которой комплементарна антисмысловая цепь siРНК (или shРНК). Эффективность действия препаратов коротких двуцепочечных РНК (siРНК) чрезвычайно высока, и уже получены положительные данные в опытах на животных, в том числе, по подавлению вирусных инфекций. Разработка средств стабилизации и доставки siРНК в клетки приведет к получению препаратов, способных долговременно инактивировать определенные гены в организме и подавлять размножение инфекционных агентов.

Препараты на основе РНК- и ДНК- аптамеров

Создание методов молекулярной селекции открыло возможность быстрого получения аптамеров - структурированных ДНК и РНК, обладающих способностью избирательно взаимодействовать с любыми заданными биополимерами. На их основе могут быть получены препараты, блокирующие функции любых белков: ферментов, рецепторов и регуляторов активности генов. По механизму действия аптамеры очень напоминают антитела – белки, которые нарабатываются иммунной системой. Аптамеры обладают рядом уникальных свойств, а именно, аптамеры синтезируются искусственно, гарантированы их чистота, последовательность и качество. Кроме того, аптамеры нетоксичны, не вызывают аллергии, их свойства можно модулировать путем введения химических модификаций, аналогично олигонуклеотидам. К настоящему времени уже создано несколько аптамеров - терапевтических препаратов, блокирующих функции определенных белков. Кроме того, аптамеры могут быть использованы в качестве «адресующих» молекул, для доставки терапевтических нуклеиновых кислот только в определенные клетки.

Иммуномодулирующие нуклеиновые кислоты

Иммуномодулирующую активность проявляют и ДНК, и РНК молекулы определенного строения. Известно, что в организме млекопитающих олигонуклеотиды, содержащие неметилированные по цитозину CpG мотивы (CG-олигонуклеотиды) стимулируют иммунные реакции, Т-клеточного иммунитета. CpG ДНК активирует В-лимфоциты, Т1-хелперы, плазматические дендритные клетки, макрофаги, натуральные киллеры и другие типы клеток, что приводит к увеличению уровня секреции таких цитокинов, как ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, ИЛ-18, ФНО- α/β , ИНФ- $\alpha/\beta,\gamma$, координирующих местный и системный воспалительные процессы и продукцию иммуноглобулинов.

В клинических испытаниях CpG-олигонуклеотиды оказывали противоопухолевый эффект при раке легкого, молочной железы, почки, меланоме, неходжкинской лимфоме как в режиме монотерапии, так и в комбинации с антителами или химиотерапией. CpG-олигонуклеотиды являются перспективными противовирусными препаратами, поскольку стимулируют продукцию в организме IFN γ и специфический иммунный ответ. Комплексы таких олигонуклеотидов с пептидами полезны как адьюванты для стимуляции иммунного ответа. Иммуномодулирующие олигонуклеотиды используются как компоненты вакцины против гепатита В; успешно развиваются работы по созданию новых противовирусных, противовоспалительных и других лекарственных средств.

Иммуностимулирующие РНК (исРНК) – это молекулы РНК определенного строения, которые индуцируют синтез эндогенных интерферонов. Интерферогенная активность препаратов двуцепочечных РНК (дцРНК) показана в экспериментах на культурах клеток и *in vivo*. Несколько индукторов интерферонов на основе дцРНК (гомополимер поли(І:С) «Ampligen», высокополимерная дцРНК из вирусоподобных частиц киллерных штаммов

дрожжей (препарат «Ридостин») предлагались в качестве иммуномодулирующих, противовирусных и антипролиферативных препаратов.

В недавних работах в экспериментах на мышах была показана противоопухолевая активность коротких интерферирующих РНК (siРНК), действующих на двух уровнях регуляции: по механизму РНК-интерференции и путем активации синтеза интерферонов. Было установлено, что короткие двуцепочечные РНК имеющие определенные мотивы в нуклеотидной последовательности способны активировать систему врожденного иммунитета. Результаты ряда исследований свидетельствуют о возможности использования иммуностимулирующих РНК в качестве адъювантов при создании вакцин.

Попадая в клетку дцРНК распознаются основными сенсорами чужеродной дцРНК, к которым относятся Toll-подобные рецепторы (TLR3, TLR7 и TLR8) и ряд TLR независимых белков (OAS, PKR, RIG-1, Mda 5). Активация соответствующих сигнальных путей приводит к секреции интерферонов и цитокинов, глобальным изменениям профиля экспрессии генов и остановке клеточного деления. Длинные дцРНК при попадании внутрь клетки активируют все эти сигнальные пути, тогда как активация тех или иных сенсоров чужеродной РНК короткими дцРНК в значительной степени зависит от их структуры и последовательности.

2. Механизмы естественного транспорта нуклеиновых кислот в эукариотические клетки

В отличие от клеток микроорганизмов, для которых перенос генетического материала между особями является эффективным и значимым процессом, клетки высших многоклеточных животных обладают целым рядом защитных механизмов, препятствующих проникновению в них чужеродных молекул ДНК и РНК, что в первую очередь связано с защитой от вирусов. Захват клетками нуклеиновых кислот (НК) в свободной форме (т.е. в отсутствие трансфицирующих агентов (агентов, способствующих проникновению НК в клетки) – в англоязычной литературе обозначается терминами “naked” или “free”) в целом считается достаточно малоэффективным, что обусловлено представлениями о свойствах клеточной мембраны и самих НК. Поверхность эукариотических клеток имеет общий отрицательный заряд благодаря содержанию в мембране фосфатидилсерина, гликолипидов и гликопротеинов. Вследствие этого возникает электростатическое отталкивание между клеточной мембраной и молекулами НК, имеющими отрицательно заряженный сахарофосфатный остов, что снижает эффективность связывания НК с клетками. Транспорт плазмидной ДНК (пДНК) и других протяженных НК также затруднен в связи с их относительно большим размером, жесткой пространственной структурой и невысокой подвижностью в биологических жидкостях и цитоплазме клеток.

Долгое время было принято считать, что олигонуклеотиды и пДНК не проникают через мембраны эукариотических клеток. Однако, первые эксперименты с клеточными культурами, а позднее – *in vivo* – показали, что при добавлении к клеткам НК, в отсутствие каких-либо трансфицирующих агентов, способны проявлять специфическую биологическую активность, воздействуя на функции клеточных РНК и ДНК или вызывая экспрессию переносимых ими генов (в случае плазмидных конструкций), что косвенно свидетельствует о попадании этих НК внутрь клеток.

Несмотря на активные исследования в области фармакокинетики и биологической активности НК до сих пор нет единого мнения в вопросе о механизмах их проникновения через мембраны клеток. Было высказано предположение, что олигонуклеотиды и

протяженные НК проникают в клетки по пути эндоцитоза – процесса поглощения клетками объектов окружающей среды путем адсорбирования их мембраной с последующим ее впячиванием внутрь клетки и образованием везикул, в которых захваченные извне объекты проходят последующую утилизацию. Среди предполагаемых механизмов, которые могут участвовать в интернализации НК клетками, разными исследовательскими группами назывались практически все известные типы эндоцитоза.

С кинетической точки зрения выделяют три типа эндоцитоза: жидко-фазный, адсорбционный и рецептор-опосредованный эндоцитоз. Согласно современным представлениям жидкофазный эндоцитоз соответствует поглощению клеткой крупных объемов внеклеточной жидкости, при этом концентрация растворенных веществ, попадающих в образуемую эндосому, остается неизменной по отношению к концентрации во внеклеточном пространстве. Этот процесс принято считать малоэффективным и неспецифическим. В случае адсорбционного и рецептор-опосредованного эндоцитоза перед интернализацией происходит концентрирование поглощаемых соединений на поверхности клетки. Эффективность этих процессов определяется степенью связывания поглощаемых молекул с поверхностью клетки, что в свою очередь зависит от эффективности их взаимодействия с компонентами клеточной мембраны (адсорбционный эндоцитоз), либо от сродства НК к соответствующим клеточным рецепторам, а также представленности этих рецепторов в клетке (рецептор-опосредованный эндоцитоз).

В зависимости от объема поглощаемого внеклеточного вещества эндоцитоз подразделяют на два типа: фагоцитоз – процесс поглощения частиц большого размера, характерный для специализированных типов клеток, таких как макрофаги и дендритные клетки, и пиноцитоз – поглощение клетками жидкостей и растворенных веществ, свойственное практически всем типам клеток. В связи с узкой специфичностью фагоцитоза зачастую термины пиноцитоз и эндоцитоз используются в литературе как синонимы. Согласно одной из наиболее общепринятых классификаций пиноцитоз включает четыре типа механизмов интернализации клетками различных соединений: клатрин-зависимый эндоцитоз, кавеоларный эндоцитоз (потоцитоз), макропиноцитоз и клатрин/кавеолин-независимый эндоцитоз. Данные типы эндоцитоза отличаются друг от друга по наличию/отсутствию покрытия образуемых везикул, по составу покрытия, по размеру везикул и дальнейшим путям утилизации поглощаемых веществ.

Клатрин-зависимый эндоцитоз является наиболее изученным типом эндоцитоза. Ранее этот процесс ассоциировали с рецептор-опосредованным эндоцитозом, однако позднее стало ясно, что и в случае других типов эндоцитоза интернализация молекул клетками происходит зачастую в результате взаимодействия со специфическими рецепторами. Изначально размер везикул, образуемых при клатрин-зависимом эндоцитозе, не превышает 150 нм, но затем их объем существенно возрастает в результате слияния в зрелые эндосомы и последующего взаимодействия с лизосомами. По пути клатрин-зависимого эндоцитоза в клетки проникают необходимые питательные вещества, антигены, факторы роста, многие патогенные частицы. В качестве конкретных примеров соединений, попадающих в клетки при участии этого механизма, назовем связанные с холестерином частицы липопротеинов низкой плотности (LDL) и трансферрин.

Кавеолы представляют собой небольшие инвагинации клеточной мембраны разной формы, богатые холестерином и гликофинголипидами. В отличие от покрытых клатрином везикул, кавеолы редко полностью отпочковываются от клеточной мембраны; кроме того, в

случае кавеолярного эндоцитоза поглощаемые соединения не попадают в полость лизосом, то есть не проходят стадию соответствующей ферментативной деградации. Кавеолярный эндоцитоз играет важную роль в гомеостазе холестерина и транспорте гликофинголипидов; при участии этого механизма в клетки попадают некоторые вирусы, например, вирус SV-40 и бактериальные токсины. Потоцитоз – процесс интернализации клетками небольших молекул, при котором не происходит слияния с эндосомами везикул с поглощенными веществами, - тоже относят к кавеолярному типу транспорта. Одним из примеров веществ, попадающих в клетки по механизму потоцитоза, является фолиевая кислота. Поскольку большая часть кавеол имеет малый размер (~50-60 нм) и обладает низкой степенью интернализации клетками, представляется маловероятным, что эти структуры играют основную роль в трансмембранном транспорте. Исключение могут составить эндотелиальные клетки, в которых кавеолы занимают от 10 до 20% клеточной поверхности.

Макропиноцитоз представляет эффективный способ неспецифического поглощения клеткой из внеклеточного пространства больших количеств растворенных соединений. Судьба веществ, проникающих в клетки по этому механизму, зависит от типа клеток: например, в макрофагах содержимое макропиносом полностью переходит в лизосомальный компартмент клетки, в то время как в клетках эпидермальной карциномы человека линии A431 макропиносомы не сливаются с другими клеточными органеллами и частично встраиваются обратно в мембрану. Принято считать, что макропиносомы в значительно большей степени проницаемы для различных соединений, чем покрытые везикулы.

В более ранних исследованиях механизмов проникновения НК в клетки было предположено, что олигонуклеотиды переносятся через мембрану путем активного транспорта, причем этот процесс может зависеть от температуры, концентрации и структуры олигонуклеотида и используемой линии клеток. Полагали, что основную роль в переносе играет адсорбционный и жидкофазный эндоцитоз. Помимо адсорбционного эндоцитоза было показано вовлечение фагоцитоза и макропиноцитоза, обеспечивающих проникновение в клетки молекул размером до 2 нм. Вероятно, при высоких концентрациях НК в среде, когда происходит насыщение мембранных рецепторов, макропиноцитоз может быть преобладающим механизмом интернализации НК клетками.

При небольших концентрациях олигонуклеотидов во внеклеточном пространстве эндоцитоз может протекать в результате взаимодействия с белками, расположенными в мембране клетки. Большое количество клеточных белков, с разной специфичностью и эффективностью связывающих олигонуклеотиды и протяженные молекулы НК было выделено и описано многими авторами. Выявленные в этих работах белки обладают различным сродством к поли-, олиго- и зачастую мононуклеотидам. Уровень связывания олигонуклеотидов этими белками сильно различается. Были получены экспериментальные данные, свидетельствующие в пользу того, что транспорт молекул ДНК в лимфоциты, моноциты, нейтрофилы и клетки скелетных мышц происходит путем взаимодействия с НК с белками, расположенными на клеточной поверхности.

Считается общепринятым, что НК проникают в клетки именно по пути эндоцитоза. Тем не менее, существуют данные о возможном вовлечении и других механизмов: было показано, что небольшие молекулы НК могут проходить через мембрану клеток благодаря наличию в ней специальных белковых каналов. Также рассматривалась возможность попадания НК в цитоплазму путем прохождения через локальные отверстия в клеточной

мембране. Различные пути, по которым молекулы НК могут проникать во внутриклеточное пространство, просуммированы на диаграмме, представленной на **Рис. 1**.

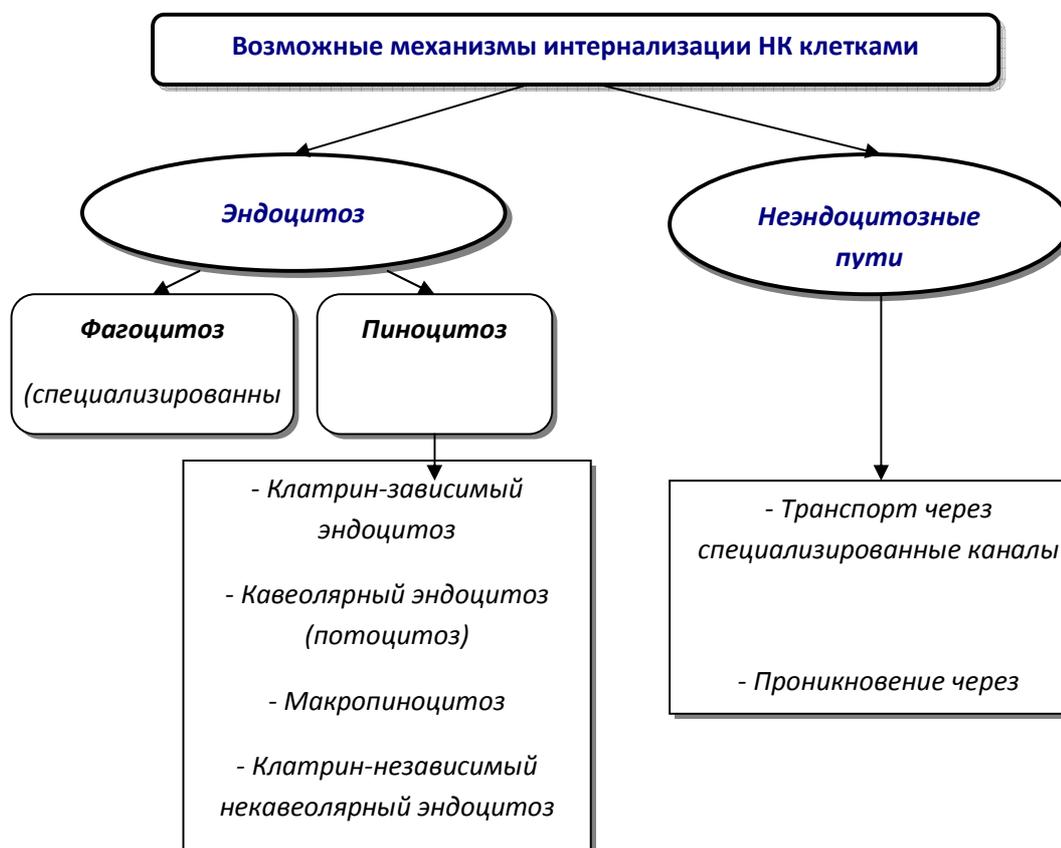


Рис. 1. Механизмы, которые могут принимать участие в интернализации НК клетками.

3. Механизмы проникновения свободной НК в клетки *in vitro*

Исследование взаимодействия НК с эукариотическими клетками *in vitro* привели к обнаружению НК-связывающей активности как некоторых известных клеточных белков, так и к выделению поверхностных мембранных белков, чья биологическая функция остается на сегодняшний день неопределенной. Белки, с разной эффективностью связывающие короткие и протяженные молекулы НК, были выявлены на различных типах клеток, что укрепило представление об основной роли рецептор-опосредованного эндоцитоза в интернализации НК при их невысокой концентрации в среде. Принято считать, что рецептор-опосредованный эндоцитоз в основном протекает по клатрин-зависимому механизму, при этом конечным клеточным компартментом, в котором оказываются поглощенные таким образом вещества, являются лизосомы.

С точки зрения доставки НК в клетки их попадание в полость лизосом нежелательно, поскольку в этом случае наиболее вероятно большая часть поглощенных клеткой НК будет гидролизована под действием лизосомальных ферментов. В связи с этим особый интерес

может представлять наличие других механизмов, помимо эндоцитоза, обеспечивающих поглощение НК клетками. Кроме белков-рецепторов, обеспечивающих интернализацию НК по пути эндоцитоза, было обнаружено существование белковых каналов, селективно транспортирующих в клетки короткие олигонуклеотиды, но не протяженные молекулы НК. В мембранах клеток почечных канальцев крыс был выявлен белок массой 45 кДа. Было показано, что данный белок является трансмембранным каналом, обеспечивающим транспорт через мембрану клеток коротких олигонуклеотидов, причем специфичность данного канала не отличается для фосфоротиоатных и фосфодиэфирных олигонуклеотидов.

В результате сравнения литературных данных, описывающих характер взаимодействия НК с различными культурами эукариотических клеток легко заметить высокую гетерогенность полученных на сегодняшний день данных. Отличия в эффективности связывания НК разными типами клеток отчасти подтверждают теорию преобладания рецептор-опосредованного эндоцитоза в процессе интернализации молекул НК клетками. Альтернативным объяснением служит предположение о различии механизмов, вовлекаемых в этот процесс разными типами клеток. Согласно недавно опубликованным данным, полученным Wittrup с соавторами, проникновение ДНК в клетки может происходить посредством протеогликан-зависимого макропиноцитоза, что оспаривает предположение о специфическом рецептор-опосредованном транспорте. Протеогликаны, как и НК, являются полианионными молекулами и представляют одну из основных составляющих клеточной мембраны. Wittrup с соавторами показали, что клетки, имеющие генетически обусловленный дефицит протеогликанов в мембране, проявляют значительно меньшую способность поглощать ДНК. Эти результаты частично перекликаются с данными, полученными другой группой, по проникновению пДНК в кератиноциты. Оказалось, что проникновение пДНК в кератиноциты происходит путем макропиноцитоза. При этом впервые было обнаружено, что поглощенная кератиноцитами пДНК является транскрипционно активной в культуре клеток, однако синтеза белка, кодируемого этой пДНК, обнаружено не было.

4. Механизмы проникновения свободной НК в клетки *in vivo*

Процесс интернализации как коротких, так и протяженных НК культивируемыми клетками за исключением особых случаев является малоэффективным. Однако данные экспериментов с культурами клеток зачастую существенно отличаются от результатов, наблюдаемых *in vivo*. Многие биохимические трансфектанты, обеспечивающие эффективную доставку НК к внутриклеточным мишеням *in vitro*, инактивируются при введении в организм. С другой стороны, эффективность интернализации коротких и длинных молекул НК в организме может происходить с привлечением иных механизмов или дополнительных факторов, позволяющих получать результаты трансфекции, превышающие ожидаемые.

После внутрисуставного введения в синовиальную ткань *in vivo* химически модифицированных рибозимов наблюдалось специфичное снижение уровня мРНК интерлейкин 1а индуцируемого стромелизина, что свидетельствовало о проникновении данной НК в клетки-мишени. Кроме того, при интратекальной инъекции флуоресцентно меченые олигонуклеотиды захватывались нейронами спинного корневого ганглия в отсутствие дополнительных трансфицирующих соединений. В этом случае введенный олигонуклеотид подавлял экспрессию периферического тетродоксин-устойчивого натриевого канала NaV1.8, что приводило к нейтрализации невропатической боли, вызванной повреждением спинномозгового нерва.

Транспортировка терапевтических агентов в нервные ткани является сложной задачей, особую важность которой придает растущее количество данных о молекулярных механизмах развития нейродегенеративных заболеваний. Для эффективной трансфекции антисмысловых олигонуклеотидов в культуре нервных клеток требуется использование катионных липосом или других искусственных методов трансфекции, однако при инъекции этого же антисмыслового олигонуклеотида в мозговую ткань крыс *in vivo* в отсутствие катионных липидов происходит поглощение молекул олигонуклеотида как нервными, так и соматическими клетками. Олигонуклеотиды при этом диффузно распределяются в цитоплазме клеток и обнаруживаются в ядре. В качестве предположительного механизма, по которому происходит интернализация олигонуклеотидов клетками нервной ткани, исследователи предлагают активность транспортного канала НК, аналогичного каналу, представленному в клетках почечных каналов крыс, обнаруженному *in vitro*. Предполагают, что канал нервной ткани для НК позволяет обеспечить внутриклеточный транспорт коротких олигонуклеотидов, но не плазмидной ДНК. Эффективное проникновение олигонуклеотидов в нервные клетки в результате внутримозгового введения *in vivo* наблюдали и в более ранних исследованиях, однако вопрос о механизме этого процесса детально не был изучен.

В то время как в экспериментах на клеточных культурах плазмидная ДНК (пДНК) при простом ее добавлении к культуре практически не проникает в клетки и оказывается неактивной, в условиях введения той же свободной ДНК в организм *in vivo* может наблюдаться эффективная экспрессия доставляемого гена. Несмотря на меньшую эффективность этого метода по сравнению с искусственными методами доставки, отсутствие каких-либо значительных побочных эффектов сделало этот способ трансфекции весьма привлекательным и наиболее приемлемым для доставки ДНК-вакцин и многих препаратов на основе НК, находящихся на стадии клинических испытаний и направленных на лечение таких заболеваний как мышечная дистрофия Дюшенна, периферическая лимбальная ишемия и сердечная ишемия.

Недостатком метода доставки ДНК в организм в свободной форме можно считать необходимость введения очень больших количеств пДНК, что связано как с ее быстрой деградацией под действием нуклеаз, так и с невысоким уровнем попадания в клетки-мишени. Тем не менее, поскольку пДНК может быть относительно легко наработана в желаемых количествах с использованием бактерий такой способ доставки препаратов на основе НК зачастую принято считать наиболее простым и выгодным для генной терапии. Кроме того, в определенных случаях предпочтение отдается введению НК именно в свободной форме при необходимости применения многократных инъекций, поскольку в отличие от использования вирусоподобных частиц, белковых конъюгатов и липосом, в данном случае не происходит развития иммунного ответа по отношению к самому препарату. В нескольких работах было показано, что введение свободной пДНК позволяет добиться продолжительной экспрессии доставляемого гена в случае трансфекции клеток, находящихся в постмитотическом состоянии (например, клетки мышечной ткани), или медленно делящихся клеток в том случае, если экспрессируемый белок не вызывает интенсивного иммунного ответа.

Впервые эффективная трансфекция протяженных свободных НК наблюдается при инъекции мРНК и пДНК в скелетные мышцы, при прямых инъекциях в другие органы и ткани, такие как печень, сердце и щитовидная железа. При использовании внутрикожных инъекций кератиноциты и дендритные клетки способны эффективно поглощать пДНК *in vivo*, поэтому кожная ткань тоже представляет собой привлекательную мишень для генной терапии. Кроме того, было обнаружено, что свободная пДНК может эффективно проникать в

клетки легочного эндотелия, при условии достаточно длительного взаимодействия НК с клетками для связывания с предполагаемым рецептором.

Тем не менее, по сравнению с результатами, достигаемыми с использованием искусственных систем трансфекции, эффективность доставки во всех упомянутых выше случаях была достаточно невысокой и отличалась существенной вариабельностью, особенно в экспериментах с не человекообразными приматами. Авторами исследования было показано, что быстрое введение относительно большого объема раствора пДНК в воротную вену, печеночную вену и желчный проток мышей и крыс приводит к эффективной трансфекции клеток печени и экспрессии доставляемого генетического материала. Эти данные нашли подтверждение при проведении экспериментов на собаках и кроликах. Дальнейшие исследования показали, что высокий уровень экспрессии доставляемого гена в гепатоцитах можно получить при простой быстрой инъекции большого объема раствора свободной пДНК в хвостовую вену у мышей. Быстрые внутрисосудистые инъекции при высоком давлении позволили добиться высокого уровня экспрессии при доставке пДНК в печень, в мышечную ткань.

Гидродинамическая процедура показала себя достаточно эффективной не только для протяженных НК, но и для олигонуклеотидов: так, при трансфекции клеток печени с помощью инъекции в хвостовую вену было достигнуто эффективное противовирусное действие короткой шпилечной РНК, направленной против вируса гепатита С. Этот метод применим и для трансфекции малых интерферирующих РНК (siРНК).

Сложность детального исследования механизмов интернализации НК клетками в экспериментах *in vivo* связана с отсутствием экспериментальной модели, позволяющей воссоздать условия, в которых клетки находятся, функционируя как часть целостного организма. Известно, что эукариотические клетки в составе пространственной структуры ткани имеют существенно отличающиеся паттерны экспрессии генов и характер дифференцировки по сравнению с клетками, культивируемыми на плоской поверхности. Вполне вероятно, что при извлечении из организма многие типы клеток могут терять способность к поглощению НК.

Wolff с соавторами, первыми продемонстрировавшие эффективность доставки НК в организм в свободной форме, попытались исследовать и механизм данного процесса. Оказалось, что проникновение ДНК в клетки происходит в результате специфического механизма трансмембранного транспорта НК в мышечные клетки, предположительно – с вовлечением кавеолярного транспорта (потоцитоза). Это предположение находится в некотором противоречии с гипотезой, выдвинутой позднее McNeil с соавторами, утверждающей что интернализация НК клетками может происходить по механизму, сходному с проникновением в клетки декстрина или пероксидазы хрена, обусловленному возникновением микроотверстий в структуре мембран клеток желудочного эпителия или эпидермальных клеток кожи. Satkauskas с соавторами показали, что эндоцитоз НК происходит в результате их связывания с клеточными рецепторами. Это же заключение ранее было сделано в обзорной работе, опубликованной Будкером с соавторами. Опираясь на предшествующий опыт исследования механизмов интернализации пДНК клетками организма *in vivo*, Будкер с соавторами придерживаются гипотезы о рецептор-опосредованном транспорте и высказывают предположение о наличии в организме пока не выявленных НК-связывающих рецепторных белков семейства scavenger рецепторов.

Вероятно, естественный транспорт НК в эукариотические клетки происходит при участии различных молекулярных процессов. Многие исследователи отдают предпочтение гипотезе о рецептор-опосредованном транспорте НК, другие - предполагают наличие альтернативных путей интернализации НК клетками. Не исключается возможность вовлечения как одних и тех же, так и разных белков в процесс транспорта через мембрану клеток организма разных НК: коротких олигонуклеотидов, одноцепочечных РНК и ДНК и дцДНК. Следует подчеркнуть, что поглощение чужеродного генетического материала принято считать нежелательным процессом для эукариотических клеток, поскольку в природных условиях такая активность была бы в первую очередь связана с проникновением в клетки вирусных НК. Можно предположить, что немаловажную роль в различии поведения молекул НК в организме и в культуре клеток играют взаимодействия между трансфицируемыми комплексами и элементами экстраклеточного скелета, а также более сложная, чем в культуре взаимная организация клеток в составе тканей организма.

В качестве заключения можно с уверенностью утверждать, что в ближайшее время на основе нуклеиновых кислот будут созданы эффективные противовирусные и противоопухолевые препараты, иммуномодулирующие препараты и вакцины. Можно ожидать создания средств генотерапии для лечения наследственных заболеваний, таких как иммунодефицитные состояния, эндокринные нарушения. Особо следует отметить возможность быстрой разработки противовирусных препаратов, обеспечиваемую универсальной схемой синтеза нуклеиновых кислот. Создание базы для быстрой разработки и синтеза противовирусных препаратов необходимо для защиты от вновь возникающих опасных вирусов, таких, как высокопатогенные штаммы вируса гриппа.