

Е.Б. Файзулов, А.А. Никонова, В.В. Зверев

ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК

ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН, Москва

История изучения влияния антисмысловых полинуклеотидов на функции генов насчитывает более 30 лет. Открытие в конце 1990-х гг. явления интерференции РНК дало новый толчок для исследований в области антисмысловых технологий. На сегодняшний день доказано, что РНК-интерференция представляет собой один из основных механизмов регуляции генной активности у эукариот, в том числе и у млекопитающих. В научной литературе приводятся данные, прямо или косвенно подтверждающие участие интерференции РНК в противовирусном иммунитете у млекопитающих. Сегодня на разных стадиях разработки находятся десятки препаратов на основе малых интерферирующих РНК (миРНК) для лечения заболеваний соматической и инфекционной природы. Внедрение препаратов на основе миРНК в клиническую практику ограничивается рядом факторов, включая неспецифическое влияние миРНК на другие гены, а также недостаточную эффективность и безопасность средств доставки миРНК в клетки-мишени. До клинических испытаний дошел 21 лекарственный препарат на основе миРНК для лечения 14 различных заболеваний, в том числе 4 заболеваний вирусной этиологии. Из числа препаратов, использующих механизмы интерференции РНК, ни один пока не разрешен к применению. После завершения клинических испытаний и публикации их результатов станет возможным более объективно оценить перспективность этого направления разработок.

Ключевые слова: *интерференция РНК, противовирусные препараты, малые интерферирующие РНК, миРНК, гены коротких шпилечных РНК.*

**PROSPECTS FOR THE DEVELOPMENT OF ANTIVIRAL DRUGS BASED ON SMALL
INTERFERING RNA**

I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Russian Academy of Medical Sciences,
Moscow

The history of the studying of antisense polynucleotides influence on gene functions has more than 30 years. The discovery in the late 1990s the phenomenon of RNA interference has given a new impetus to research in the field of antisense technologies. To date proved that RNA interference is one of the major mechanisms regulating gene activity in eukaryotes, including mammals. The scientific literature contains data directly or indirectly confirming the participation of RNA interference in antiviral immunity in mammals. Tens of drugs based on small interfering RNA (siRNA) for the treatment of somatic and infectious diseases are at different stages of development. Introduction of siRNA-based drugs in clinical practice is limited by several factors, including non-specific siRNA effects on other genes as well as the lack of effective and safe siRNA delivery vehicles. Currently, there are more than 21 drugs on the basis of siRNA reached clinical trials including 4 antiviral drugs. Among the drugs that use the mechanisms of RNA interference none is approved for use. After completion of clinical trials and publication of their results will be possible to more objectively evaluate the prospects of these developments.

Key words: *RNA interference, antiviral drugs, small interfering RNA, siRNA, short hairpin RNA genes.*

На протяжении более трёх десятилетий молекулярные биологи изучают влияние комплементарных (или антисмысловых) полинуклеотидов на функции генов. Ещё в 1978 г. Paul Zamecnik и Mary Stephenson показали возможность подавления репродукции вируса саркомы Рауса в культуре клеток под влиянием специфического олигодезоксинуклеотида [1]. К числу комплементарных полинуклеотидов относятся также антисмысловые РНК, рибозимы, ДНКзимы. Различные виды антисмысловых полинуклеотидов применяются в научных исследованиях для изучения генных функций, а также представляют интерес как потенциальные терапевтические, в том числе противовирусные, средства. Открытие в конце 1990-х гг. явления

интерференции РНК дало новый толчок для исследований в области антисмысловых технологий.

Принято считать, что впервые феномен интерференции РНК наблюдали в начале 1990-х гг. американские генетики-цветоводы, которые при трансформации цветов петунии геном определенного пигмента, обнаружили необъяснимое изменение окраски цветов, ставшее следствием подавления генной экспрессии [2]. Однако они не смогли приблизиться к пониманию причин наблюдаемого явления, поэтому полученные ими результаты остались без должного внимания. Другая группа американских исследователей, возглавляемая Andrew Fire и Craig Mello, изучая влияние длинных одноцепочечных и двухцепочечных РНК (несколько сотен оснований) на активность гомологичных генов круглых червей вида *Caenorhabditis elegans*, к своему удивлению обнаружила, что влияние двухцепочечной (ДЦ) РНК на активность генов оказалось значительно более выраженным, чем одноцепочечной антисмысловой РНК [3]. В качестве мишеней были выбраны гены, выключение которых приводило к заметному изменению фенотипа, например к параличу, судорогам и т.д. Препараты РНК инъецировали в разные участки тела червя, в том числе гонады и результаты учитывали. Стойкий эффект наблюдался не только на червях, которым инъецировали ДЦ РНК, но и у их потомства. Подавление генной активности под влиянием ДЦ РНК было названо термином «интерференция РНК». Также было показано, что для проявления интерференции РНК достаточно всего нескольких молекул ДЦ РНК, что позволило авторам предположить, что в этом процессе имеет место амплификационная или каталитическая составляющая. Результатом этой работы стала статья в журнале *Nature*, опубликованная в 1998 г., которая вызвала без преувеличения революцию в функциональной геномике [3].

Методы исследования, основанные на использовании механизмов интерференции РНК, входят сегодня в число базовых методов молекулярной биологии. Короткие ДЦ РНК и их гены привлекают внимание учёных и фармкомпаний как действующие вещества перспективных лекарственных препаратов. Цель настоящего обзора – оценить перспективы создания противовирусных препаратов, использующих механизмы явления интерференции РНК.

Сущность явления интерференции РНК.

Молекулами, определяющими специфичность интерференции РНК, являются микроРНК и малые интерферирующие РНК (миРНК). Обе эти формы РНК представляют собой короткие фрагменты РНК, имеющие в своей структуре ДЦ участки размером 19–25 п.н., монофосфатные группы на 5'-концах и двухнуклеотидные неспаренные участки на 3'-концах. МикроРНК и миРНК отличаются между собой способом внутриклеточного синтеза. Субстратом для образования микроРНК служат транскрипты РНК-полимеразы II типа, имеющие во вторичной

структуре ДЦ участки достаточной длины (рис. 1.А). Субстратом для образования миРНК служат длинные ДЦ молекулы РНК или кшРНК (короткие шпилечные РНК) экзогенного происхождения (рис. 1.Б). Созревание микроРНК и миРНК происходит благодаря активности эндонуклеаз, представителей семейства РНКаз III – Drosha и/или Dicer [4]. Препараты функциональной миРНК можно получать путём химического синтеза (рис. 1.В) и вводить их в клетки путём трансфекции или электропорации. Хорошо известны также методы создания генов коротких шпилечных РНК (кшРНК), которые вводят в клетку в составе плазмидных или вирусных векторов. КшРНК, по своей структуре напоминающие предшественников миРНК (рис. 1.А), процессируются в цитоплазме клетки до зрелой формы миРНК под воздействием Dicer.

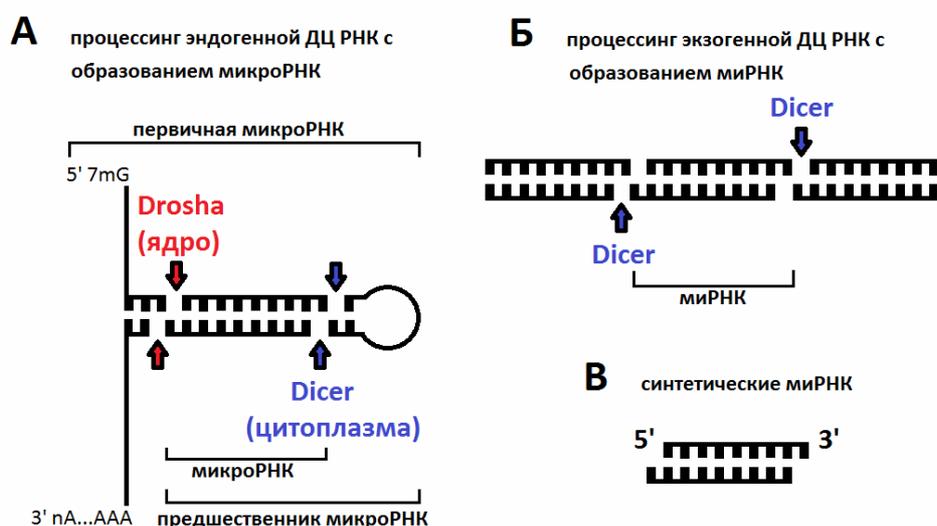


Рисунок 1. Типы малых РНК, участвующих в процессах РНК-интерференции. Обозначения: ДЦ РНК – двухцепочечная РНК, миРНК – малые интерферирующие РНК.

Известно, что интерференция РНК включает в себя не только взаимодействие двух типов РНК – миРНК и комплементарного ей участка РНК-мишени, но ещё и целого комплекса клеточных белков – RISC (RNA induced silencing complex, РНК-индуцируемый комплекс выключения гена). Важнейшим белковым компонентом RISC является белок из семейства Argonaute, обладающий рибонуклеазной активностью, которая, благодаря наличию в комплексе миРНК, является сиквенспецифической и направлена на расщепление РНК-мишени. Выключение гена может происходить как в результате разрушения мРНК-мишени, так и вследствие торможения процесса её трансляции [4]. Интерференция РНК является частью природного противовирусного иммунитета у растений, насекомых и круглых червей [5]. На сегодняшний день доказано, что микроРНК являются одним из основных механизмов регуляции

генной активности у эукариот, в том числе и у млекопитающих. По состоянию на июль 2013 г. у человека обнаружено 1 872 генов микроРНК (база данных miRBase, <http://www.mirbase.org>, Великобритания).

Интерференция РНК и противовирусный иммунитет у млекопитающих.

Роль интерференции РНК в системе противовирусного иммунитета у млекопитающих остается малоизученной, но активно исследуется. Для доказательства участия интерференции РНК в противовирусном иммунитете у млекопитающих требуется показать, что вирусная инфекция сопровождается появлением в зараженных клетках миРНК вирусного происхождения; ингибирование интерференции РНК усиливает репродукцию вируса; вирусы способны “обходить” противовирусный ответ, обусловленный интерференцией РНК, т.е. имеют генные продукты, ингибирующие интерференцию РНК. В научной литературе последних лет приводятся данные, прямо или косвенно подтверждающие участие интерференции РНК в противовирусном иммунитете у млекопитающих.

МиРНК вирусного происхождения. Несмотря на то, что явление интерференции РНК является высококонсервативным механизмом для эукариот, первоначально исследователям не удавалось обнаружить в зараженных вирусом клетках животных малых РНК вирусного происхождения. Однако применение технологий секвенирования следующего поколения позволило обнаружить в клетках, зараженных вирусами везикулярного стоматита (VSV), денге, гепатита С (ВГС), Западного Нила и полиовирусом, коротких вирус-специфических РНК [6, 7]. Для выявления их способности подавлять репродукцию вируса требуются дальнейшие исследования.

МикроРНК клеточного происхождения. Есть данные о существовании клеточных микроРНК, направленных к геномам некоторых вирусов и способных подавлять экспрессию вирусных генов, и, как следствие, репродукцию вирусов. По меньшей мере, для 4 вирусов обезьян и человека обнаружены микроРНК клеточного происхождения, направленные к вирусному геному и проявляющие противовирусную активность – ВИЧ-1, ВГС, обезьяньего пенящего вируса и VSV [8, 9, 10].

Huang J. с соавт. показано, что микроРНК miR-28, miR-125b, miR-150, miR-223 и miR-382 способны связываться с 3'-концом РНК-транскриптов ВИЧ-1 и подавлять экспрессию вирусных мРНК в покоящихся CD4⁺ Т-клетках. В активированных CD4⁺ Т-клетках экспрессия этих микроРНК снижена, что усиливает вирусную репродукцию [9]. Эти данные свидетельствуют о том, что клеточные микроРНК могут играть важную роль в переходе ВИЧ-1 в латентное состояние, которое характерно для покоящихся CD4⁺ Т-лимфоцитов, в которых вирус пребывает в состоянии провирусной ДНК, интегрированной в клеточный геном. Известно, что

латентное состояние ВИЧ-1 способствует ускользанию вируса от контроля иммунной системы и является одним из основных препятствий в попытках элиминации вируса из организма с помощью противовирусной терапии [5]. Есть также данные, свидетельствующие о том, что клеточные микроРНК определяют тканевую специфичность вирусов, защищая в частности моноциты периферической крови от продуктивной инфекции ВИЧ-1 [11].

Описано несколько клеточных микроРНК, подавляющих репродукцию ВГС (miR-1, miR-30, miR-128, miR-196, miR-296, miR-351, miR-431, miR-448, miR-199a) [5]. Интересно, что помимо микроРНК, подавляющих репродукцию вируса, геномом клетки кодируется микроРНК miR-122, стимулирующая репродукцию ВГС. MiR-122 активно экспрессируется в клетках печени человека, связывается с 5'-UTR участком генома вируса в области IRES и активирует трансляцию мРНК ВГС [12]. По другим данным miR-122 защищает геном ВГС от деградации экзонуклеазой Xn1.

В работе Otsuka M. с соавт. показано, что у дефицитных по Dicer мышей снижение экспрессии клеточных микроРНК miR-24 и miR-93, направленных к генам L и P белков VSV, приводило к усилению репродукции VSV и гибели мышей [13].

В ряде исследований показано, что вирусная инфекция вызывает в зараженной клетке изменение профиля экспрессии микроРНК, способных оказывать влияние на характер вирусной репродукции [5].

Вирусные факторы подавления интерференции РНК. Одним из важных индикаторов того, что интерференция РНК вовлечена в противовирусный иммунный ответ, явилась идентификация факторов подавления интерференции - RSS (RSS, RNA silencing suppressors), кодируемых вирусным геномом. Первоначально вирусные RSS были выявлены у вирусов растений [14]. Однако на сегодняшний день описано, по меньшей мере, 11 таких факторов для разных вирусов млекопитающих. Среди наиболее хорошо изученных вирусных RSS: белок NS1 вирусов гриппа А, В, С и белок E3L вируса осповакцины (связывают мРНК), белок Tat ВИЧ-1 и коровый белок ВГС (блокируют активность Dicer). В ряде исследований показано, что RSS вирусов млекопитающих способны проявлять аналогичную активность в клетках растений, а RSS вирусов растений, напротив, проявляли активность в клетках животных [5].

Большинство RSS, кодируемых вирусами млекопитающих, являются белками. Однако аденовирусы человека кодируют вирус-ассоциированные РНК I и II (VA-РНК I и II), экспрессируемые на поздней стадии инфекции, которые, вероятно также являются RSS. По своей структуре VA-РНК I и II напоминают предшественников микроРНК и могут распознаваться белком Dicer, процессироваться в вирусную микроРНК и включаться в состав комплекса RISC. Поскольку в зараженных аденовирусом клетках VA-РНК присутствуют в крайне высокой концентрации (до 10^8 копий на клетку), она может выступать в роли RSS,

связывая (отвлекая на себя) такие факторы интерференции РНК, как Exportin-5 (белок, транспортирующий предшественников микроРНК в цитоплазму), Dicer, белки 5].

Таким образом, на сегодняшний день накоплено достаточно данных, показывающих высокую степень вовлеченности процессов интерференции РНК в регуляцию вирусной репродукции у млекопитающих. В совокупности с результатами большого количества исследований по изучению противовирусной активности синтетических миРНК и генов миРНК [15], эти данные свидетельствуют о принципиальной возможности использования механизмов интерференции РНК при создании специфических противовирусных препаратов.

Разработка лекарственных препаратов на основе комплементарных полинуклеотидов.

Прогресс в молекулярной биологии за последние 20 лет позволил внедрить в клиническую практику лекарственные препараты на основе рекомбинатных белков и моноклональных антител. Несмотря на отставание от препаратов, основанных на белках, препараты на основе олигонуклеотидов также имеют определенный потенциал для использования в клинике. Известно 2 утвержденных FDA (US Food and Drug Administration) препарата, представляющих собой модифицированные антисмысловые олигодезоксирибонуклеотиды. Fomivirsen (торговое название Vitravene) направлен к мРНК одного из ключевых белков цитомегаловируса - предраннего белка IE2; применяется для лечения цитомегаловирусного ретинита у иммунокомпрометированных пациентов, в том числе ВИЧ-инфицированных (разрешен FDA в 1998 г.). Второй препарат – Mirumersen (торговое название Kynamgo), предназначен для лечения гомозиготной семейной гиперхолестеринемии (разрешен FDA в 2013 г.). С открытием феномена РНК-интерференции возрос интерес фармкомпаний к созданию препаратов нового поколения на основе синтетических миРНК или генов кшРНК. Препараты на основе малых РНК разрабатываются для лечения рака, инфекционных заболеваний и других патологий, которые ассоциированы с нарушениями в функциях специфических генов. Большое количество препаратов проходит на данный момент доклинические испытания [16]. С момента открытия миРНК до сегодняшнего дня было инициировано более 30 клинических испытаний с использованием 21 лекарственного препарата, основанных на миРНК или генах кшРНК, для лечения 14 различных заболеваний, 4 из которых – вирусной этиологии [16].

Синтетические миРНК. В 2001 г. Tuschl T. с соавторами показали, что синтетические двухцепочечные молекулы РНК с размером цепей в 21 основание с высокой специфичностью подавляют экспрессию гена-мишени [18]. С тех пор химически синтезированные миРНК широко применяются в молекулярно-биологических исследованиях. Период полураспада

немодифицированных миРНК в сыворотке крови составляет около 15 мин, что делает их применение *in vivo* малоэффективным [19]. Кроме того, немодифицированные миРНК могут вызывать индукцию нежелательных реакций врождённого иммунитета [20]. Синтетические миРНК могут быть дополнительно модифицированы для повышения их стабильности *in vivo* и снижения неспецифического влияния на другие гены. Так, свойства миРНК могут быть улучшены путём химической модификации их фосфатных групп – путём замены фосфодиэфирной связи фосфоротиоатной, либо введением в терминальную фосфатную группу борановой группы (-BH₃), что обеспечивает 150–300-кратное повышение нуклеазной устойчивости. Другой тип модификации подразумевает защиту сахарных остатков и нуклеозидных оснований, например модификацию 2'-гидроксильных групп пентозы 2'-О-метильными, 2'-флюоро- или О-(2-метоксиэтильными) группами. Одна или обе цепи миРНК могут быть также конъюгированы с какими-то веществами, например, липидами. Важно отметить, что химическая модификация миРНК, повышая её стабильность и снижая нежелательные иммунные реакции, вместе с тем может приводить к токсичности миРНК и/или снижать эффективность сайленсинга [21].

Гены коротких шпилечных РНК. Введение миРНК в клетки млекопитающих можно проводить с использованием плазмиды или вирусного вектора, стабильно экспрессирующих самокомплементарную короткую шпилечную РНК – кшРНК. Гены кшРНК под контролем промотора РНК-полимеразы III в составе плазмидного или вирусного (ретровирусного, аденовирусного или др.) вектора транскрибируются в ядре клетки, кшРНК транспортируются в цитоплазму, где нуклеаза Dicer отщепляет петлевой участок РНК, переводя её в активную форму [17]. Вирусные векторы могут быть эффективными при системном введении и обеспечивать тканеспецифическую и пролонгированную экспрессию кшРНК, но вопрос о безопасности их клинического применения остается дискуссионным.

Проблема доставки. Одна из главных проблем разработки лекарственных препаратов на основе миРНК – это их эффективная и безопасная доставка в клетки-мишени. Современные стратегии доставки основаны на использовании химических соединений или биологических носителей (вирусов и бактерий). Химические носители чаще всего используются для доставки синтетических миРНК, тогда как вирусные и бактериальные носители конструируются для доставки генов кшРНК, которые под действием внутриклеточных механизмов становятся функциональными миРНК. Вирусные векторы часто используют для доставки генов кшРНК *ex vivo*, когда клетки, модифицированные генами кшРНК, возвращают пациенту - донору этих клеток (терапия аутогенными клетками) [22–24]. При использовании большинства невирусных носителей препараты миРНК или плазмиды с генами кшРНК вводят в клетки в составе

комплексов с препаратом-носителем, что повышает стабильность нуклеиновых кислот и эффективность трансфекции *in vivo* [25].

Поскольку наибольший интерес представляют технологии доставки миРНК и генов кшРНК, реализованные в препаратах, успешно прошедших доклинические испытания, остановимся на некоторых из них.

Для достижения системного эффекта часто используется парентеральный способ введения лекарственных препаратов на основе миРНК. Такой подход, в частности, используется для доставки миРНК в клетки почек, печени и солидных опухолей. На сегодняшний день в клинических испытаниях участвуют 10 различных препаратов с парентеральным способом введения. В восьми из них в качестве средства для доставки миРНК используются синтетические носители, пять из которых основаны на технологии катионных липосом, в том числе четыре - это стабильный комплекс миРНК и смеси катионных и фузогенных липидов с полиэтиленгликолем, так называемые SNALP (stable nucleic acid lipid particle). Этот способ доставки был разработан компанией Tekmira, а лекарственные препараты на его основе предназначены для лечения гиперхолестеринемии, транстиретинового амилоидоза, онкологических заболеваний и инфекции, вызванной вирусом Эбола. Последний, пятый препарат представляет собой липоплекс известный как AtuPLEX™, разработан компанией Silence Therapeutics и предназначен для лечения солидных опухолей [17]. Один из разрабатываемых препаратов для лечения хронической миелоидной лейкемии, представляет собой миРНК, заключенную в анионную липосому [26]. В двух препаратах для парентерального введения в качестве носителя миРНК используются поликатионные соединения. В одном из них это наночастицы циклодекстрина, связанные с человеческим белком трансферрином и полиэтиленгликолем. Это разработка компанией Calando известна под названием RONDEL (RNAi/Oligonucleotide Nanoparticle Delivery). Препарат с этим типом носителя предназначен для терапии рецидивирующего или рефрактерного рака [27]. Ещё один препарат, основанный на биodeградируемой полимерной матрице, известный как LODER, принадлежит компании Silenseed Ltd. (Израиль) и предназначен для лечения протоковой аденокарциномы поджелудочной железы. Наконец, препарат 15NP компании Quark Pharmaceuticals (США, Израиль) представляет собой “голую” миРНК, которая предназначена для снижения уровня p53 и предотвращения острого повреждения почек [28]. Препараты на основе миРНК также могут быть введены непосредственно в пораженную ткань или опухоль. Глаза, лёгкие и кожа лучше всего подходят для местного введения миРНК [17]. Так, препарат ALN-RSV01 для лечения РСВ-инфекции применяется интраназально в виде аэрозоля (подробнее см. ниже).

Примером препарата на основе гена кшРНК в составе лентивирусного вектора может служить препарат для лечения ВИЧ-инфекции HIV7-shI-TAR-CCR5RZ (подробнее см. ниже). Кроме того, компания Marina Biotech (США) инициировала испытания препарата на основе гена кшРНК с пероральным применением для лечения семейного аденоматозного полипоза. В качестве стратегии доставки в препарате применяется технология tkRNAi (TransKingdom RNA™ interference), основанная на использовании непатогенных бактерий *Escherichia coli*, трансформированных плазмидой с геном кшРНК. Помимо гена кшРНК, плазида содержит локус Inv из *Yersinia pseudotuberculosis*, который кодирует белок инвазин и обеспечивает бактериям возможность проникнуть в эпителиальные клетки, экспрессирующие интегриновый поверхностный рецептор β -1. Вектор также содержит ген HlyA из *Listeria monocytogenes*, кодирующий белок листериолизин О, предназначенный для формирования пор, через которые кшРНК выходят из эндосом в цитоплазму клетки [29].

Противовирусные препараты на основе коротких РНК.

МиРНК представляют интерес как действующее вещество перспективных препаратов для лечения вирусных заболеваний. В литературе имеются данные об эффективном подавлении репродукции многих вирусов человека с помощью миРНК и генов кшРНК в экспериментах, как на клеточных, так и на животных моделях инфекции [15]. Однако, до клинических испытаний на настоящий момент дошли только четыре противовирусных препарата на основе миРНК (табл. 1).

Таблица 1. Противовирусные препараты, использующие механизмы интерференции РНК.

Медицинский препарат	Показания	Мишень	Фармацевтическая компания	Статус клинического испытания
Miravirsen	Гепатит С	miR-122	Santaris Pharma A/S	Активна II фаза
pHIV7-shI-TAR-CCR5RZ	ВИЧ-инфекция	Tat белок ВИЧ-1, гены белков Tat и Rev ВИЧ-1, мРНК рецептора CCR5 человека	Медицинский центр City of Hope/Benitec	Активна I фаза
ALN-RSV01	РСВ-инфекция	Ген нуклеокапсида РСВ	Alnylam Pharmaceuticals	Закончена II фаза
TKM-Ebola	Инфекция, вызванная вирусом Эбола	Гены полимеразы L и белков VP24, VP35 вируса.	Tekmira	Активна I фаза

Первый противовирусный препарат на основе мРНК, допущенный до клинических испытаний под названием ALN-RSV01, разработан компанией Alnylam Pharmaceuticals (США) и предназначен для лечения инфекции, вызванной респираторно-синцитиальным вирусом (РСВ). Препарат ALN-RSV01 содержит мРНК, направленную к мРНК гена нуклеокапсида N РСВ. Препарат выпускается в виде назального спрея и небулайзера. В настоящее время препарат успешно прошел стадию IIb клинических испытаний. Результаты испытаний, в частности, показали, что у взрослых добровольцев с экспериментальной РСВ-инфекцией, получавших препарат ALN-RSV01 (за 2 дня до и 3 дня после экспериментального заражения), РСВ удалось выделить в культуре клеток у 44.2 %, тогда как в группе, получавшей плацебо, - у 71.4 % добровольцев [30]. На сайте компании Alnylam представлены также результаты клинических испытаний, проводившихся на пациентах с РСВ-инфекцией, перенесших трансплантацию легких (<http://www.alnylam.com/>). Представленные данные свидетельствуют о том, что у пациентов, которые получали ALN-RSV01 (ежедневно, в течение 3 дней), значительно снижалось развитие синдрома облитерирующего бронхоолита на 90 и 180 день наблюдения; эффект от лечения наблюдался если введение препарата начинали не позднее 5 дня от начала проявления клинических симптомов и сохранялся вне зависимости от того, проводилось ли дополнительное лечение рибавирином или нет.

Другой препарат, HIV7-shI-TAR-CCR5RZ, предназначенный для лечения ВИЧ-инфекции, находится в настоящее время на первой фазе клинических испытаний. Разработкой препарата занимается австралийская компания Venitec совместно с национальным медицинским центром City of Hope (США). На начальной стадии испытаний пациентам-добровольцам с лимфомой, развившейся вследствие ВИЧ-инфекции, вводили аутогенные CD34+ гематопозитические стволовые клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором с генами 3 типов коротких РНК. 1-й тип РНК - кшРНК, направленные к генам Tat/Rev вирусной РНК, 2-й – «TAR-ловушки» (РНК, соответствующая TAR-элементу, расположенному на 5'-конце вирусной мРНК и ответственному за связывание вирусного белка-трансактиватора tat), и 3-й – рибозим, направленный к мРНК CCR5 (хемокиновый рецептор-5, являющийся одновременно корецептором для ВИЧ-1) [17, 22]. В доклинических испытаниях в экспериментах *in vitro* было показано, что такая конструкция обеспечивает длительное подавление вирусной репродукции в CD34+ моноцитах, зараженных ВИЧ-1 JRFL [31]. В клинических испытаниях было показано, что вводимые пациентам трансдуцированные клетки не вызывают токсических эффектов, а все три типа коротких РНК детектируются в течение года после инфузии. И, хотя ни один из пациентов не излечился от ВИЧ-инфекции, специалисты признали начальную фазу испытаний данного препарата успешной [22].

В феврале 2012 г. компания Tekmira инициировала первую фазу клинических испытаний препарата на основе миРНК для лечения инфекции, вызванной вирусом Эбола (ТКМ-Ebola). В серии доклинических испытаний на макаках-резусах было показано, что комбинация трех модифицированных миРНК, направленных к вирусным генам полимеразы L и белков VP24 и VP35, в комплексе со SNALP обеспечивает 100 % защиту животных от заражения летальной дозой вируса Эбола (вид Заир) [32].

Пожалуй, наиболее интересные результаты получены датской компанией Santaris Pharma A/S, разработавшей препарат Miravirsen. В основе препарата модифицированный олигодезоксинуклеотид – ингибитор клеточной микроРНК miR-122, экспрессирующейся в печени и защищающей геном вируса гепатита С от деградации экзонуклеазой Xnl [33]. Препарат представляет собой антисмысловый олигонуклеотид в виде замкнутой нуклеиновой кислоты (Locked Nucleic Acid), модифицированной фосфоротиоатной группой и направленной к miR-122. Препарат недавно успешно прошел стадию 2а клинических испытаний. В испытании приняли участие 36 пациентов, разделенные на четыре группы - по девять пациентов из трех групп получали на протяжении 29 дней дозы в три, пять или семь миллиграммов препарата на килограмм веса, остальным девяти давали плацебо. Результаты испытаний показали, что у пациентов с хронической инфекцией ВГС (генотип 1) Miravirsen обеспечивает пролонгированное дозозависимое снижение уровня РНК ВГС (в группе, получавшей наибольшую дозу препарата, концентрация РНК вируса снизилась в 500 раз, тогда как у четырех из девяти пациентов этой группы уровень вирусной РНК упал до неопределяемого уровня). При этом, ни у одного из них не было отмечено значительных токсических эффектов, кроме некоторой реакции в месте инъекции и краткосрочного повышения уровня печеночных ферментов, и отсутствовали признаки развития резистентности вируса к данному препарату [34].

Препарат Miravirsen является представителем препаратов, мишенью действия которых является элемент клетки-хозяина, участвующий в репликации вируса. Следует отметить, что миРНК являются удобным инструментом для выявления таких элементов. Так, в работе Karlas A. с соавт. описано применение библиотек миРНК для поиска генов клетки-хозяина, продукты которых вовлечены в регуляцию репродукции вируса гриппа А [35]. Такие работы вносят большой вклад в понимание фундаментальных механизмов репликации вирусов, а также вызывают большой интерес у фармкомпаний, заинтересованных в разработке эффективных противовирусных средств.

Следует отметить, что существует перспектива использования миРНК для лечения заболеваний, вызванных не только вирусами, но и внутриклеточными паразитами. Так, было

показано, что выключение субъединицы PP1 серин/треонин белковой фосфатазы малярийного плазмодия нарушает жизненный цикл *Plasmodium falciparum* [36].

Заключение.

Из числа лекарственных препаратов, использующих механизмы интерференции РНК, ни один пока не разрешен к применению; после завершения клинических испытаний и публикации их результатов станет возможным более объективно оценить перспективность этого направления разработок. Важно осознавать, что внедрение препаратов на основе миРНК в клиническую практику ограничивается рядом факторов. К числу наиболее значимых относятся недостаточная эффективность и безопасность средств доставки миРНК в клетки-мишени. Не менее важное ограничение заключается в необходимости контроля специфичности используемых миРНК и снижения неспецифического влияния миРНК на другие гены. Разработка и внедрение новых технологий химической модификации миРНК, более эффективных и безопасных средств доставки, наряду с более глубоким пониманием механизмов взаимодействия новых препаратов с клеткой и организмом, позволят расширить спектр заболеваний, лечение которых возможно препаратами на основе миРНК.

Литература.

1. *Zamecnik P., Stephenson M.* Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978; 75 (1) : 280–284.
2. *Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R.* Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. Plant Cell. 1990; 2 (4) : 279–289.
3. *Fire A., Xu S., Montgomery M., Kostas S., Driver S., Mello C.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature. 1998; 391 (6669) : 806–811.
4. *Jinek M., Doudna J.* A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. Nature. 2009; 457 (7228) : 405–412.
5. *Haasnoot J., Berkhout B.* RNAi and cellular miRNAs in infections by mammalian viruses. Methods Mol. Biol. 2011; 721 : 23–41.
6. *Parameswaran P., Sklan E., Wilkins C., Burgon T., Samuel M., et al.* Six RNA viruses and forty-one hosts: viral small RNAs and modulation of small RNA repertoires in vertebrate and invertebrate systems. PLoS Pathog. 2010; 6 (2) : e1000764.

7. *Yeung M., Bennasser Y., Watashi K., Le S., Houzet L., Jeang K.T.* Pyrosequencing of small non-coding RNAs in HIV-1 infected cells: evidence for the processing of a viral-cellular double-stranded RNA hybrid. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37 : 6575–6586.
8. *Pedersen I., Cheng G., Wieland S., Volinia S., Croce C., et al.* Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature.* 2007; 449 : 919–922.
9. *Huang J., Wang F., Argyris E., Chen K., Liang Z., et al.* Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat Med.* 2007; 13 : 1241–1247.
10. *Lecellier C., Dunoyer P., Arar K., Lehmann-Che J., Eyquem S., Himber C.* A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science.* 2005; 308 : 557–560.
11. *Wang X., Ye L., Hou W., Zhou Y., Wang Y., et al.* Cellular microRNA expression correlates with susceptibility of monocytes/macrophages to HIV-1 infection. *Blood.* 2009; 113 : 671–674.
12. *Jangra R., Yi M., Lemon S.* Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122. *J. Virol.* 2010; 84 : 6615–6625.
13. *Otsuka M., Jing Q., Georgel P., New L., Chen J., et al.* Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in Dicer1-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression. *Immunity.* 2007; 27 : 123–134.
14. *Li W., Ding S.* Viral suppressors of RNA silencing. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001; 12: 150–154.
15. *Blake S., Bokhari F., McMillan N.* RNA interference for viral infections. *Curr. Drug. Targets.* 2012; 13 (11) : 1411–1420.
16. *Davidson B., McCray P. Jr.* Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat. Rev. Genet.* 2011; 12 (5) : 329–340.
17. *Burnett J., Rossi J., Tiemann K.* Current progress of siRNA/shRNA therapeutics in clinical trials. *Biotechnol. J.* 2011; 6 (9) : 1130–1146.
18. *Elbashir S., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001; 411 (6836) : 494–498.
19. *Dowler T., Bergeron D., Tedeschi A., Paquet L., Ferrari N., Damha M.* Improvements in siRNA properties mediated by 2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleic acid (FANA). *Nucleic Acids Res.* 2006; 34 (6) : 1669–1675.
20. *Hartmann G.* Gene silencing below the immune radar. *J. Clin. Invest.* 2009; 119 (3) : 438–442.
21. *Glebova K., Marakhonov A., Baranova A., Skoblov M.* Therapeutic siRNAs and non-viral systems for their delivery. *Mol. Biol. (Mosk).* 2012; 46 (3) : 371–386.
22. *DiGiusto D., Krishnan A., Li L., Li H., Li S., et al.* RNA-based gene therapy for HIV with lentiviral vector-modified CD34(+) cells in patients undergoing transplantation for AIDS-related lymphoma. *Sci Transl Med.* 2010; 2 (36) : 36–43.

23. Rao D., Maples P., Senzer N., Kumar P., Wang Z., et al. Enhanced target gene knockdown by a bifunctional shRNA: a novel approach of RNA interference. *Cancer Gene Ther.* 2010; 17 (11) : 780–791.
24. Dannull J., Leshner D., Holzkecht R., Qi W., Hanna G., et al. Immunoproteasome down-modulation enhances the ability of dendritic cells to stimulate antitumor immunity. *Blood.* 2007; 110 (13) : 4341–4350.
25. Dominska M., Dykxhoorn D. Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape. *J. Cell Sci.* 2010; 123 (Pt 8) : 1183–1189.
26. Scherr M., Battmer K., Winkler T., Heidenreich O., Ganser A., Eder M. Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA. *Blood.* 2003; 101 (4) : 1566–1569.
27. Davis M., Zuckerman J., Choi C., Seligson D., Tolcher A., et al. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature.* 2010; 464 (7291) : 1067–1070.
28. Watts J., Corey D. Clinical status of duplex RNA. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010; 20(11): 3203-07.
29. Lage H, Kruhn A. Bacterial delivery of RNAi effectors: transkingdom RNAi. *J. Vis. Exp.* 2010; (42).
30. DeVincenzo J., Lambkin-Williams R., Wilkinson T., Cehelsky J., Nochur S., Walsh E. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107 (19) : 8800–8805.
31. Li M., Li H., Rossi J. RNAi in combination with a ribozyme and TAR decoy for treatment of HIV infection in hematopoietic cell gene therapy. *Ann. NY Acad. Sci.* 2006; 1082 : 172–179.
32. Geisbert T., Lee A., Robbins M., Geisbert J., Honko A., Sood V., et al. Postexposure protection of non-human primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study. *Lancet.* 2010; 375(9729) : 1896–1905.
33. Li Y., Masaki T., Yamane D., McGivern D., Lemon S. Competing and noncompeting activities of miR-122 and the 5' exonuclease Xrn1 in regulation of hepatitis C virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110 (5) : 1881–1886.
34. Janssen H., Reesink H., Lawitz E., Zeuzem S., Rodriguez-Torres M., et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N. Engl. J. Med.* 2013; 368 (18) : 1685–1694.
35. Karlas A., Machuy N., Shin Y., Pleissner K., Artarini A., et al. Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature.* 2010; 463 (7282) : 818–822.
36. Kumar R., Adams B., Oldenburg A., Musiyenko A., Barik S. Characterisation and expression of a PP1 serine/threonine protein phosphatase (PfPP1) from the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: demonstration of its essential role using RNA interference. *Malar. J.* 2002; 1 : 5.