Д. М. Белоусов[1,2], М. М. Левина[1], Г. А. Старостин[1]

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В ГЕННОЙ ТЕРАПИИ (ОБЗОР)

Поступила в редакцию 06.08.2018. Принята к печати 22.01.2019.

В обзоре освещены возможности применения некодирующих РНК, действующих по механизму РНК-интерференции. Проанализированы особенности строения, способы повышения стабильности малых интерферирующих РНК, а также методы усиления эффективности посттранскрипционного сайленсинга. Описаны некоторые методы химической модификации олигонуклеотидов и системы их доставки в клетку. Рассмотрены новейшие лекарственные препараты на основе некодирующих РНК. Описаны их фармакокинетика и фармакодинамика, ход клинических исследований. Особое внимание уделено биобезопасности данных препаратов.

Ключевые слова: генная терапия, РНКи, микроРНК, миРНК, РНК-интерференция.

Молекулярная биология — молодая, быстро развивающаяся наука. Датой ее рождения принято считать 25 апреля 1953 г., когда в журнале «Nature» Дж. Уотсон и Ф. Крик опубликовали статью «Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid» [1]. Статья привлекла внимание исследователей со всего мира. Согласно ресурсу PubMed если в 1952 г., за год до открытия структуры ДНК, было опубликовано 7 статей о ДНК, то в 1953 г. — уже 111 статей на эту тему, а в течение 10 лет их количество возросло почти в 14 раз.

РНК обнаружили задолго до открытия структуры ДНК, но не так давно стало известно о роли некодирующих РНК в живых организмах. Существует множество различных типов некодирующих РНК (нкРНК): транспортные, рибосомные, малые ядерные и ядрышковые, антисмысловые, малые интерферирующие (миРНК), микроРНК и др. Они вовлечены во многие процессы жизнедеятельности клетки, многие из которых пока до конца не изучены. В 1993 г. Р. Ли, Р. Фейнбаум и В. Амброс опубликовали результаты исследований генов lin-4 и lin-14, регулирующих развитие личинки нематоды *Caenorhabditis elegans* [2]. Ген lin-4 кодирует малые РНК, названные впоследствии микроРНК, которые комплементарно связываются по антисмысловому механизму с транскриптом lin-14, нарушая тем самым развитие личинки. В дальнейшем множество исследований показали, что микроРНК участвуют во многих процессах у многоклеточных животных. Помимо того что влияют на развитие организма, они участвуют в канцерогенезе в качестве онкосупрессоров и онкогенов [3, 4], в патогенезе различных сердечно-сосудистых заболеваний [5, 6] и многих других. В 1998 г. Э. Файер и К. Меллоу, проводя эксперименты над *C. elegans,* обнаружили, что при введении малых доз коротких двухцепочечных РНК (дцРНК) уровень матричной РНК (мРНК), комплементарной ей, стремительно снижается [7]. За исследования в области РНК-интерференции (РНКи) в 2006 г. они были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине.

Фармацевтические компании и научно-исследовательские лаборатории по достоинству оценили большой потенциал малых РНК. За последние 20 лет появились новые игроки на фармацевтическом рынке, которые занялись разработкой и испытанием препаратов на их основе, например, на базе MIT была основана компания Alnylam Pharmaceuticals, исследования в этой области проводят также Santaris Pharma совместно с Hoffman-La Roche (Швейцария); Regulus Therapeutics (США), Mirna Therapeutics (США), Sirna Therapeutics (США) и др.

ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДИЗАЙНА ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Эффективность действия миРНК зависит от различных параметров, включая доступность

[1] ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России» (Сеченовский университет), 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2.

[2] dmbelousov1806@gmail.com

мишени, вторичную структуру и характеристики мРНК. При выборе сайта присоединения молекулы следует избегать зон однонуклеотидного полиморфизма (SNP), нетранслируемых регионов (UTR), палиндромов и несколько раз повторяющихся оснований. Наиболее предпочтительно, чтобы сайт присоединения располагался на расстоянии 50 – 100 nb от старт-кодона, ближе к 5′- и 3′-концам. Оптимальная длина полимера 19 – 25 nb. Для повышения стабильности связывания с мРНК между 2 и 7 основаниями должно содержаться 19 % GC, а между 8 и 18 — 52 %. При этом для увеличения эффективности связывания с RISC между 9 и 14 основаниями содержание пар GC должно быть снижено. Добавление на 3′-концы дополнительных нуклеотидов, в особенности TT, повышает функциональную эффективность миРНК [8].

МЕТОДЫ ПОВЫШЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ РНК

Прежде чем испытывать эффективность препаратов на основе нкРНК, необходимо решить проблему их доставки и продлить время их полураспада *in vivo*. При гидролизе РНК РНКазой осуществляется нуклеофильная атака 2′-OH группы на атом фосфора. В 2003 г. проведены исследования 2′-F-замещенных малых РНК; при незначительном снижении эффективности РНКи была достигнута устойчивость к действию РНКаз [9].

Эффективность ингибиторов микроРНК — antimiR — определяется их стабильностью, афинностью к своей мишени, а также их фармакокинетическими особенностями. Наиболее часто используют модификации сахара, приводящие к повышению температуры плавления и устойчивости к действию нуклеаз, например: 2′-O-Me, 2′-O-метоксиэтил, 2′-F модификации, бициклические закрытые нуклеиновые кислоты (LNA), и среди них всех LNA имеют наибольшую аффинность к ингибируемой микроРНК [10].

Особый интерес представляют пептидно-нуклеиновые кислоты (ПНК). Их остов состоит из мономеров N-(2-аминоэтил)глицина, соединенных между собой пептидной связью. Азотистые основания присоединены к полипептидному остову посредством метилен-карбонильных «сцепок». Таким образом достигается устойчивость к ферментативной деградации, а также повышение аффинности к другим нуклеиновым кислотам. Однако поскольку полипептидный остов гидрофобен, молекулы ПНК адсорбируются на поверхности гидрофобных макромолекул, а при определенных концентрациях ПНК образуют агрегаты. Чтобы повысить растворимость, исследователи вводят ПЭГ в состав ПНК в γ-положение [11].

Для повышения стабильности РНК кислород в фосфатной группе замещают серой. Помимо устойчивости к действию нуклеаз и увеличения эффективности [12], фосфоротиоатмодифицированная (PS РНК) РНК гораздо лучше связывается с белками плазмы крови, таким образом снижая выделение PS РНК с мочой [10].

МЕТОДЫ ДОСТАВКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Одной из проблем, стоящей перед учеными, является доставка олигонуклеотидов непосредственно к мишени. Ученые из Университета Анкары изучили методы доставки пеметрекседа и miR-21 с помощью липидных наночастиц для лечения мультиформной глиобластомы [13]. Наибольшую эффективность показали образцы с радиусом мицелл 124,9 – 135,7 нм, содержащие 1 % тримиристина (липидная фаза), 0,3 % диметилдиоктадециламмония бромида в качестве катионогенного ПАВ и 2 % твин-80 в качестве неионогенного ПАВ. Достоинствами данной системы доставки являются высокая степень поглощения частиц клеткой (до 70 %), устойчивость к коалесценции в течение долгого времени (более 3-х месяцев), а также возможность преодоления гематоэнцефалического барьера.

Учеными из Университета Гонконга исследована система доставки миРНК в раковые клетки, основанная на дендримерных нановекторах [14]. Каждый дендример состоит из ядра, содержащего триэтаноламин, в точках ветвления находятся третичные, а на поверхности дендримера — первичные амины. Таким образом, эти высокомолекулярные соединения (ВМС) обладают положительным зарядом, а поскольку олигонуклеотиды обладают отрицательным зарядом, дендримеры присоединяются к ним и образуют сферические наночастицы размером чуть менее 50 нм, что способствует их адресной доставке в опухолевые клетки.

Для снижения экспрессии определенных генов используют также вирусные векторы в генной терапии — аденовирусные, аденоассоциированные и ретровирусные [15]. Учеными из Ирана и США проведены исследования, целью которых являлось снижение экспрессии аденозинкиназы (ADK) при помощи лентивирусных векторов, которые вызывали экспрессию

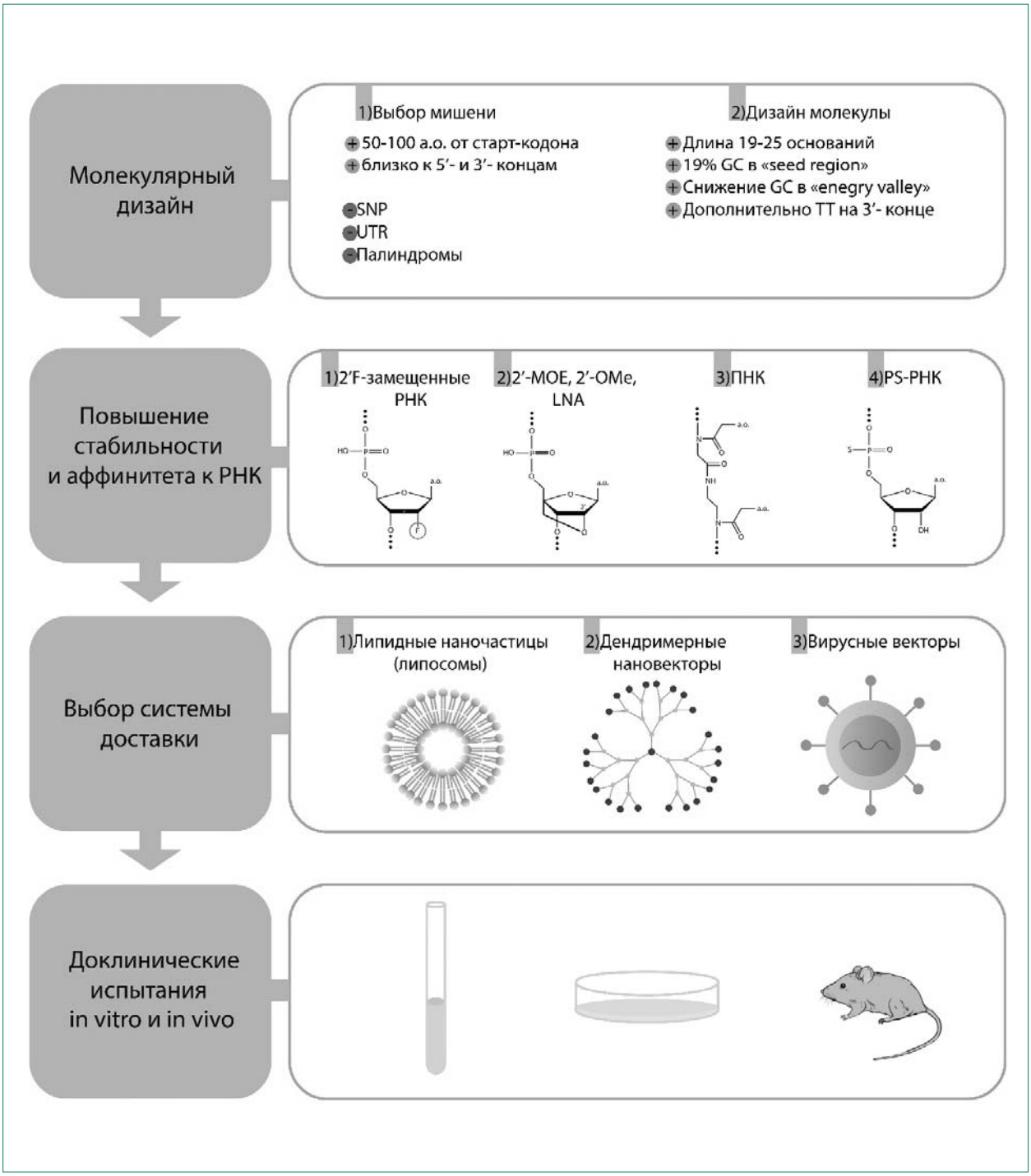

Рис. 1. Расшифровка сокращений: а.о. — азотистое основание, SNP — однонуклеотидный полиморфизм, UTR — нетранслируемый регион, 2′-MOE — 2′-метоксиэтил, 2′-OMe — 2′-оксиметил, LNA — закрытая нуклеиновая кислота, ПНК — пептидно-нуклеиновая кислота, PS РНК — фосфоротиоат-модифициоранная РНК.

shРНК (short hairpin RNA) в стволовых клетках и раковых стволовых клетках глиобластомы человека. С помощью таких векторов удалось снизить уровень экспрессии ADK на 95 % [16]. Однако исследователям предстоит решить ряд проблем, связанных с эффективностью, безопасностью и легкостью производства вирусных векторов [17].

ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ микроРНК

«Мимикрирующие» микроРНК — синтетические двухцепочечные молекулы РНК, обладающие той же последовательностью, что и соответствующая микроРНК. Их целью является восполнение сниженной экспрессии мик-

роРНК. На данный момент несколько «мимикрирующих» микроРНК проходят I стадию клинических испытаний. В основном препараты «мимикрирующих» микроРНК используют для восполнения экспрессии онкосупрессорных микроРНК. Такие препараты показывают свою эффективность в лечении мезотелиомы (MesomiR-1, NCT02369198); MRX34 (NCT01829971) оказался эффективен для лечения различных опухолей — лимфомы, меланомы, множественной миеломы и др [18].

Антисмысловые олигонуклеотиды — одноцепочечные олигонуклеотиды, связывающиеся с мРНК. Ярчайшим представителем данного типа является Kynamro (Mipomersen sodium) (Kastle Therapeutics LLC, США), предназначенный для лечения семейной гиперхолестеринемии. Его действие заключается в ингибировании трансляции апо-B100 образованием гетеродуплекса молекулой Mipomersen с мРНК апо-B100. Это приводит к уменьшению ЛПНП в крови и, следовательно, к значительному снижению вероятности сердечно-сосудистых заболеваний, в частности атеросклероза [19]. Препарат вводят подкожно, по результатам II фазы клинических испытаний в дозировке 200 мг/нед [20]. У пациентов с тяжелой гиперхолестеринемией после курса Mipomersen уровень холестерина ЛПНП снизился на 36 %; уровень апо-B100 также снизился на 35,9 %, а уровень общего холестерина — на 28,3 % у пациентов, принимающих Mipomersen [21]. Близкие значения получены в ходе исследований на пациентах с тяжелой гиперхолестеринемией с высоким риском сердечно-сосудистых заболеваний — снижение на 36,9, 37,5 и 26,4 % соответственно [22]. В ходе III фазы клинических испытаний также обнаружено значительное снижение липопротеина (а) в среднем на 26,4 % [23], чего не достигается при статиновой терапии. Липопротеин (а) является компонентом ЛПНП, обладает провоспалительным и атерогенным действием, стимулирует тромбогенез и ингибирует фибринолиз, является фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний, таких как атеросклероз, коронарная недостаточность, инсульт [24]. Среди побочных явлений преобладали осложнения после инъекций, миалгия, артралгия, эритема, тошнота и др. У некоторых пациентов также были зарегистрированы такие осложнения, как стеатоз печени, стенокардия, сердечная и коронарная недостаточность [21]. FDA (US Food and Drug Administration) в 2013 г. одобрила данный препарат [25], в то время как EMA (European Medicines Agency) отказала в регистрации данного препарата. В своем отказе, опубликованном в 13 декабря 2012 г, Committee for Medicinal Products for Human Use выразил обеспокоенность профилем безопасности Kynamro, поскольку среди побочных эффектов были отмечены гепатотоксичность, накопление триглицеридов в гепатоцитах, острые сердечно-сосудистые заболевания [26].

Анти-микроРНК являются одноцепочечными молекулами РНК, ингибирующими микроРНК. Представителем данного типа препаратов является Miravirsen, разработанный компанией Santaris Pharma A/S совместно с Hoffmann-La Roche (Швейцария) — β-D-окси-закрытый фосфоротиоат-модифицированный антисмысловой олигонуклеотид, состоящий из 15 нуклеотидов, из которых 8 LNA нуклеотидов и 7 ДНК нуклеотидов. МикроРНК-122, являющаяся мишенью данного препарата, участвует в обмене жирных кислот и холестерина, а также в жизненном цикле вируса гепатита С (HCV) [27]. Вирусная РНК имеет 3 сайта связывания для микроРНК-122, S1 и S2 на 5′-UTR и S3 на 3′-UTR. Предполагается, что таким образом вирусная РНК оказывается защищенной от нуклеазной деградации, поддерживаются вирусная репликация и трансляция [28]. Miravirsen образует стабильный гетеродуплекс с микроРНК-122, что приводит к нарушению инфекционного цикла вируса гепатита С. Согласно рекомендации ВОЗ пациентам, имеющим хроническую инфекцию HCV генотипа 1, показаны ледипасвир/софосбувир без или вместе с рибовирином либо даклатасвир/софосбувир без или вместе с рибовирином [29]. Однако вследствие высокой скорости репликации и ее низкой точности происходит множество точечных мутаций, чего обычно достаточно для снижения аффинности данных препаратов к белкам-мишеням. В ходе исследований *in vitro* в 5′-UTR обнаружена нуклеотидная замена аденина на цитозин в положении 4 (A4C-мутация). Однако это не привело к появлению вирусной резистентности HCV к Miravirsen [28]. Также в ходе доклинических испытаний и клинических испытаний I фазы не зарегистрировано никаких негативных и цитотоксических эффектов. В ходе II фазы клинических испытаний были отобраны 36 человек, 9 из которых получали плацебо, из остальных 27 сформировали 3 группы, которые получали дозы препарата по 3, 5 и 7 мг/кг. Также 2 человека из плацебо-группы получали PEG-интерферон и рибавирин, 5 человек из группы, получающей 3 мг/кг Miravirsen, 3 человека из группы, получающей 5 мг/кг, и 2 человека, получающих 7 мг/кг. Вводили Miravirsen подкожно. Препарат показал доза-зависимый эффект. Наиболее эффективной дозой оказалась 7 мг/кг. Участники испытаний, принимающие помимо Mira-

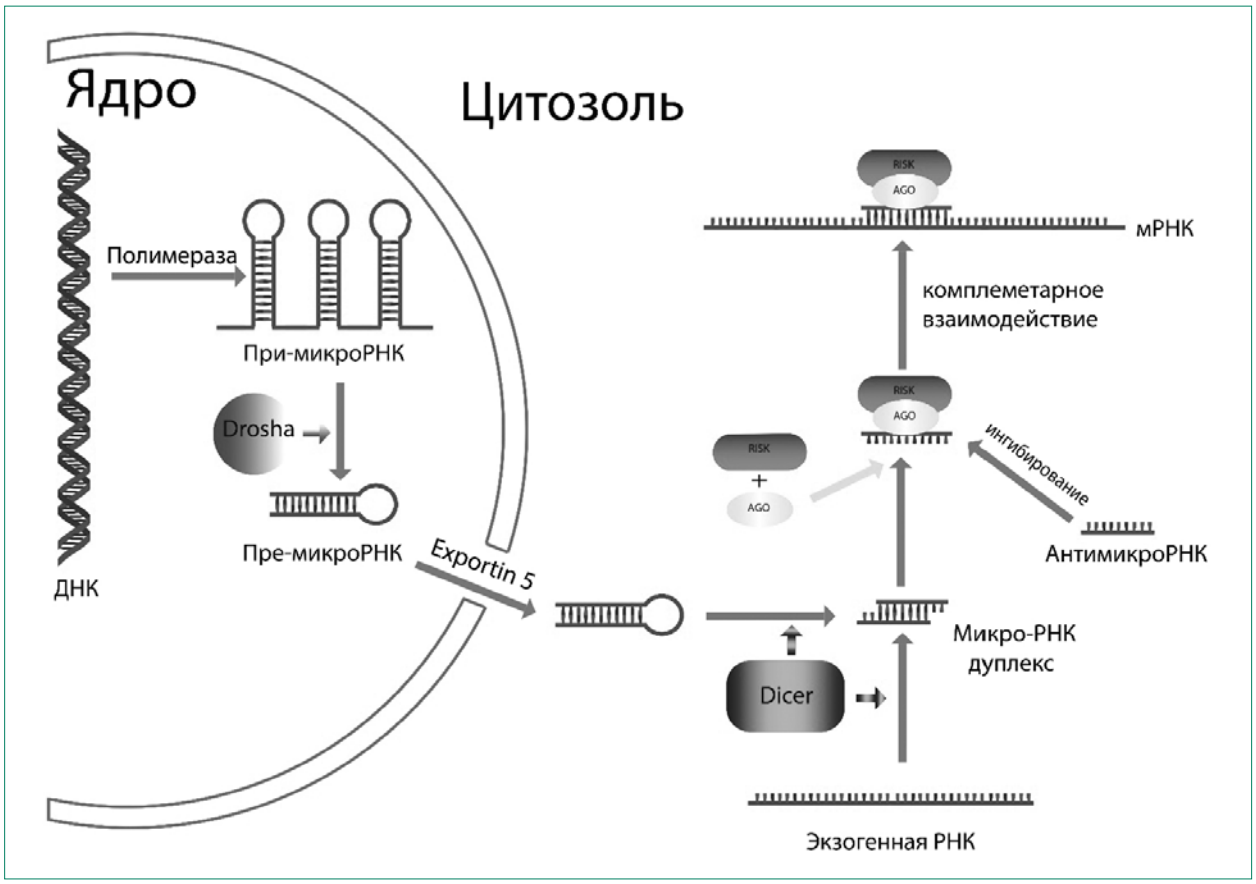

Рис. 2. Изображен механизм действия микроРНК и механизм РНК-интерференции, а также механизм действия ингибиторов микроРНК — антимикроРНК. МикроРНК транскрибируются РНК-полимеразой II с ДНК. Первичный транскрипт процессируется эндорибонуклеазой Drosha. Пре-микроРНК транспортируется белком Exportin 5 в цитоплазму, где она процессируется эндорибонуклеазой Dicer. Продуктом процессинга является дуплекс микроРНК. Дуплекс расплетается с образованием одноцепочечных РНК — гидовой и пассажирской (на данном этапе вступают препараты на основе малых интерферирующих РНК). Пассажирская РНК деградирует. Гидовая РНК присоединяется к Ago, который входит в состав комплекса RISC. РНК-интерференция является защитным механизмом клетки. При попадении в эукариотическую клетку экзогенной двухцепочечной РНК, дцРНК процессируется Dicer, образуя множество двухцепочечных отрезков длиной 22 – 25 пар нуклеотидов. Далее процесс идет по тому же пути, который описан выше. АнтимикроРНК образуют стабильный дуплекс с микроРНК, что приводит к нарушению связывания с таргетной мРНК. Расшифровка сокращений: RISC — RNA induced silencing complex, Ago — Argonaute.

virsen рибавирин и PEG-интерферон, имели более низкий показатель lgME HCV РНК/мл, чем пациенты, которые принимали только Miravirsen. Среди побочных эффектов зарегистрировано устойчивое снижение в сыворотке крови уровня холестерина, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы и γ-глутамилранспептидазы, а также незначительное повышение уровня креатинина [30]. Средняя концентрация Miravirsen в плазме повышалась вместе с дозой. Время полужизни препарата в плазме — 37 дней. Начало снижения вирусной нагрузки отмечено после 3-й дозы [31]. У участников, принимавших только Miravirsen, наблюдалось явление «вирусного отскока». В клинических пробах, взятых у пациентов с вирусным отскоком, обнаружена замена цитозина на урацил в 5′-UTR в положении 3 (C3U-мутация). Существует несколько гипотетических моделей, объясняющих это явление. Согласно одной из них из-за генетических изменений вирус может стать независимым от микроРНК-122, изменив свое предпочтение к другой микроРНК, либо ее функция может быть заменена внутримолекулярным взаимодействием. Согласно другой модели генетические изменения позволяют каким-то образом осуществить взаимодействие мироРНК-122 и вирусной РНК даже несмотря на присутствие Miravirsen [28].

RG-101 — аналог Miravirsen, разработанный компанией Regulus Therapeutics (США) — N-ацетил-D-галактозамин-конъюгированная анти-микроРНК, мишенью которой также является микроРНК-122. В ходе I фазы клинических

испытаний установлена наиболее эффективная доза — 2 – 4 мг/кг. В ходе исследований отмечено значительное снижение показателя lgME HCV РНК/мл [32]. В ходе II фазы клинических испытаний испытуемые получали RG-101 (2 мг/кг, подкожно) вместе с антивирусными препаратами: 1 группа — Harvoni (ледипасфир+софосбувир), 2 группа — Olysio (симепревир), 3 группа — Daclinza (даклатасвир). Наиболее эффективной оказалась комбинация RG-101 с Harvoni — в течение 24-недельного курса не было обнаружено вирусных рецидивов [33]. Однако в июне 2016 г. FDA потребовала приостановить клинические испытания RG-101 из-за двух случаев желтухи у участников испытаний [34]. В июне 2017 г. компания объявила о прекращении клинического развития RG-101 из-за высокого риска гипербилирубинемии, однако в пресс-релизе не была исключена дальнейшая разработка других видов анти-микроРНК-122 [35]. Regulus Therapeutics совместно с Sanofi Genzyme (Франция) разрабатывает RG-012 — препарат для лечения синдрома Альпорта, полностью комплементарный микроРНК-21. На данный момент подходит к концу I фаза клинических испытаний [36] и происходит набор пациентов с синдромом Альпорта для II стадии клинических испытаний [37].

ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ миРНК

РНК-интерференция (RNAi) — это способ посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, совершивший революцию в функциональной геномике. RNAi играет роль естественного «выключателя», который способен предотвращать или останавливать трансляцию определенных мРНК. Этот процесс запускается дцРНК, которые затем проходят стадию процессинга при участии фермента Dicer и превращаются в малые дцРНК (менее 25 nb в длину). Их процессинг завершает комплекс RISC, который расщепляет малые дцРНК и связывается с одним из одноцепочечных фрагментов — миРНК. Таким образом, общий механизм действия препаратов на основе миРНК — доставка в клетку малых дцРНК.

Patisiran (ALN-TTR02) — препарат, разработанный компанией Alnylam Pharmaceuticals на базе Массачусетского технологического института (США), для лечения аутосомно-доминантного наследственного TTR амилоидоза (hATTR). Транстиретин (TTR) — транспортный белок, синтезируемый в печени, который в форме гомотетрамера транспортирует тироксин и в соединении с ретинол-связывающим белком переносит витамин А [38]. В меньших количествах TTR синтезируется в сетчатке и хороидном сплетении. Известно более 100 различных мутаций в гене TTR, которые приводят к изменению конформации и, как следствие, нарушению стабильности гомотетрамерного комплекса. Мутанты TTR транспортируются во внеклеточную жидкость, где они накапливаются и образуют фибриллы, что приводит к нарушению функционирования органов [39]. Patisiran — двухцепочечный олигонуклеотид, функционирующий по принципу РНК-интерференции. Его мишенью является 3′-UTR мРНК гена TTR. Несмотря на то что миРНК присоединяются к транслируемым регионам, данный регион был выбран по причине его консервативности среди всех мутантных форм TTR. Препарат вводят внутривенно. В качестве системы доставки выбраны липидные переносчики, разработанные Arbutus Biopharma Corporation (Tekmira). После введения в кровь липидные частицы опсонизируются апо-Е, что обеспечивает адресную доставку препарата в печень [40]. Доклинические испытания данного препарата проводили на *Macaca fascicularis*. При дозе 0,1 мг/кг уровень TTR снизился на 75 %, а при дозе 0,3 мг/кг — на 90 %, эффект сохранялся на протяжении 28 дней. Тот же результат был получен при проведении I фазы клинических испытаний. Наиболее выраженный эффект наблюдался в диапазоне доз 0,15 – 0,5 мг/кг. Уровень TTR резко снижался, достигая минимума к 7-му дню, и сохранялся практически неизменным до 28-го дня. Никаких значительных изменений в анализах крови, печеночных и почечных пробах не обнаружено; нарушения функции тироксина, серьезные побочные эффекты также не зарегистрированы [41]. Во II фазе клинических испытаний 29 пациентов (которые по условию проведения клинических испытаний до этого принимали TTR-стабилизаторы тафамидис и дифлюнизал) с семейной амилоидотической полиневропатией получали по 2 дозы Patisiran каждые 3 (Q3W) или каждые 4 (Q4W) недели. В зависимости от группы пациенты получали 0,01 Q4W, 0,05 Q4W, 0,15 Q4W, 0,3 Q4W и 0,3 мг/кг Q3W. Препарат вводили пациентам внутривенно, с разными режимами: 3,3 мл/мин в течение 60 или 70 мин, используя схему микродозирования (1,1 мл/мин в течение 15 мин и 3,3 мл/мин для оставшейся дозы). Перед каждым введением пациенты получали дексаметазон, парацетамол (ацетаминофен), блокаторы H_2-гистаминовых рецепторов (например, рантидин или фамотидин), блокаторы H_1-гистаминовых рецепторов (например, цетиризин, гидроксизин

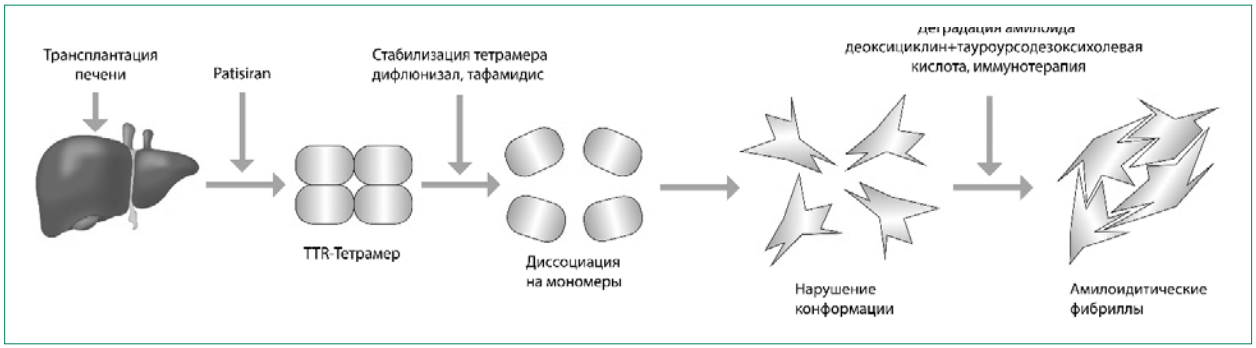

Рис. 3. Транстиретин — белок, синтезируемый в печени и, в меньшей степени, в ретине и хороидном сплетении. Существует в форме гомотетрамера. Инициирующая стадия — диссоциация тетрамера на мономеры. Это приводит к нарушению конформации мономеров. Затем они транспортируются во внеклеточную жидкость, где, накапливаясь, они формируют фибриллы. До недавнего времени существовало несколько методов терапии данного заболевания: трансплантация печени, стабилизация тетрамера, торможение образования фибрилл. Patisiran — препарат на основе малых интерферирующих РНК, связываясь с комплексом RISC, приводит к остановке трансляции TTR мРНК. Расшифровка сокращений: TTR — транстиретин.

или фексофенадин), чтобы снизить риск IRR. Наиболее эффективной оказалась доза 0,3 мг/кг с режимом Q3W, уровень TTR снизился на 83,8 % после первого и на 86,7 % после второго введений. Среди негативных побочных эффектов преобладали IRR (тахикардия, головокружения, боли в животе, бронхоспазмы, диспноэ, эритема, озноб, бледность, тахипноэ). Однако среди пациентов, принимавших 0,3 мг/кг Q3W с режимом микродозирования, не замечено никаких IRR. Серьезные негативные эффекты наблюдались у 2 пациентов (инфекция мочеиспускательного канала, сепсис, тошнота, рвота, воспаление подкожной жировой клетчатки) [42].

В августе 2017 г. закончилась III стадия клинических испытаний APOLLO, продолжавшаяся 46 месяцев. В ходе нее исследовали безопасность и эффективность Patisiran, изменения качества жизни пациентов, моторной функции, функционирования вегетативной нервной системы [43]; 1 февраля 2018 г. FDA приняла заявление на регистрацию [44].

Исследования по разработке лекарственных препаратов на основе миРНК проводят во многих направлениях. Вышеупомянутая компания Alnylam Pharmaceuticals разрабатывает препарат для лечения гемофилии A и B Fitusiran. Мишенью данного препарата является мРНК антитромбина, обладающего антикоагулянтным действием. При подкожном введении 1,8 мг на дозу 1 раз в месяц в течение 3 месяцев удалось достичь снижения уровня антитромбина в плазме крови на 89 ± 1 % [45]. На данный момент проводится III стадия клинических испытаний (NCT03417102). Tivanisiran — препарат миРНК, разработанный испанской компанией Sylentis S. A.. Мишенью данного препарата является мРНК TRPV1. TRPV1 экспрессируется в эпителии роговицы глаза и базальном слое конъюнктивы, участвует в передаче болевых сигналов. Препарат показал значительную эффективность, при ежедневном введении и дозировке 1,125 %, уже к 4-му дню наблюдалось значительное снижение болевых ощущений [46]. Исследования в этой области проводят и в Российской Федерации. В Институте иммунологии (Москва) проведены доклинические испытания лекарственного препарата для терапии аллергической бронхиальной астмы siIL4-89-153 [47].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Открытие РНК-интерференции и микроРНК является огромным прорывом для современного медико-биологического сообщества. За последнее десятилетие разработано множество экспериментальных препаратов на их основе, некоторые из них показали свою высокую эффективность. В скором времени благодаря всё больше возрастающему багажу знаний о механизмах действия данных молекул, совершенствованию методов доставки и методов предсказания их эффективности терапия малыми нкРНК, возможно, станет клинической реальностью. Изучение их роли в патогенезе различных заболеваний, таких как различные вирусные инфекции [48, 49], канцерогенез [4], респираторные заболевания [50], а также в развитии патологических процессов, таких как гипоксия [51], позволит найти новые мишени для патогенетической терапии, а также использовать их в качестве биомаркеров [52]. Это даст возможность разработки новых более эффективных методов диагностики и терапии для многих заболеваний.

СПИСОК ССЫЛОК

1. *Watson J. D.*, *CRICK F. H. C.* Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid // Nature. 1953. Т. 171. С. 737.
2. *Lee R. C.*, *Feinbaum R. L.*, *Ambros V.* The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14 // Cell. 1993. Т. 75. № 5. С. 843 – 854.
3. *Rupaimoole R.*, *Slack F. J.* MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases // Nat. Rev. Drug Discov. 2017. Т. 16. С. 203.
4. *Detassis S.* et al. microRNAs Make the Call in Cancer Personalized Medicine // Front. Cell Dev. Biol. 2017. Т. 5. С. 86.
5. *Y. Cao R.* et al. The Emerging Role of MicroRNA-155 in Cardiovascular Diseases., 2016. 1 – 5 с.
6. *Laffont B.*, *Rayner K. J.* MicroRNAs in the Pathobiology and Therapy of Atherosclerosis. // Can. J. Cardiol. 2017. Т. 33. № 3. С. 313 – 324.
7. *Fire A.* et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans // Nature. 1998. Т. 391. С. 806.
8. *Fakhr E.*, *Zare F.*, *Teimoori-Toolabi L.* Precise and efficient siRNA design: a key point in competent gene silencing // Cancer Gene Ther. 2016. Т. 23. С. 73.
9. *Chiu Y.-L.*, *Rana T. M.* siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. // RNA. 2003. Т. 9. № 9. С. 1034 – 1048.
10. *Rooij E. van*, *Kauppinen S.* Development of microRNA therapeutics is coming of age. // EMBO Mol. Med. 2014. Т. 6. № 7. С. 851 – 864.
11. *Quijano E.* et al. Therapeutic Peptide Nucleic Acids: Principles, Limitations, and Opportunities. // Yale J. Biol. Med. 2017. Т. 90. № 4. С. 583 – 598.
12. *Lennox K. A.*, *Behlke M. A.* A direct comparison of anti-microRNA oligonucleotide potency. // Pharm. Res. 2010. Т. 27. № 9. С. 1788 – 1799.
13. *Kucukturkmen B.*, *Bozkir A.* Development and characterization of cationic solid lipid nanoparticles for co-delivery of pemetrexed and miR-21 antisense oligonucleotide to glioblastoma cells. // Drug Dev. Ind. Pharm. 2018. Т. 44. № 2. С. 306 – 315.
14. *Ma J.* et al. Blocking Stemness and Metastatic Properties of Ovarian Cancer Cells by Targeting $p70^{S6K}$ with Dendrimer Nanovector-Based siRNA Delivery // Mol. Ther. 2018. Т. 26. № 1. С. 70 – 83.
15. *Moore C. B.* et al. Short Hairpin RNA (shRNA): Design, Delivery, and Assessment of Gene Knockdown // Methods Mol. Biol. 2010. Т. 629. С. 141 – 158.
16. *Estiri H.* et al. Stable Knockdown of Adenosine Kinase by Lentiviral Anti-ADK miR-shRNAs in Wharton's Jelly Stem Cells. // Cell J. 2018. Т. 20. № 1. С. 1 – 9.
17. *Chira S.* et al. Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors. // Oncotarget. 2015. Т. 6. № 31. С. 30675 – 30703.
18. URL: https://clinicaltrials.gov/show/NCT01829971.
19. *Duell P. B.* et al. Long-term mipomersen treatment is associated with a reduction in cardiovascular events in patients with familial hypercholesterolemia. // J. Clin. Lipidol. 2016. Т. 10. № 4. С. 1011 – 1021.
20. *Akdim F.* et al. Effect of mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, on low-density lipoprotein cholesterol in patients with familial hypercholesterolemia. // Am. J. Cardiol. 2010. Т. 105. № 10. С. 1413 – 1419.
21. *McGowan M. P.* et al. Randomized, placebo-controlled trial of mipomersen in patients with severe hypercholesterolemia receiving maximally tolerated lipid-lowering therapy. // PLoS One. 2012. Т. 7. № 11. С. e49006.
22. *Thomas G. S.* et al. Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, reduces atherogenic lipoproteins in patients with severe hypercholesterolemia at high cardiovascular risk: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. // J. Am. Coll. Cardiol. 2013. Т. 62. № 23. С. 2178 – 2184.
23. *Santos R. D.* et al. Mipomersen, an antisense oligonucleotide to apolipoprotein B-100, reduces lipoprotein(a) in various populations with hypercholesterolemia: results of 4 phase III trials. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2015. Т. 35. № 3. С. 689 – 699.
24. *Jayasinghe R.*, *Craig I. H.*, *Mohan R. K. A.* Lipoprotein (A) in clinical practice. // J. Pak. Med. Assoc. 2014. Т. 64. № 4. С. 447 – 450.
25. URL: http://bit.ly/2MvZ2Lo.
26. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en GB/document library/Summary of opinion-Initial authorisation/human/002429/WC500136279.pdf.
27. *Jopling C. L.* et al. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA // Science. 2005. Т. 309. № 5740. С. 1577 – 1581.
28. *Ottosen S.* et al. In vitro antiviral activity and preclinical and clinical resistance profile of miravirsen, a novel anti-hepatitis C virus therapeutic targeting the human factor miR-122. // Antimicrob. Agents Chemother. 2015. Т. 59. № 1. С. 599 – 608.
29. World Health Organization. Guidelines for the Screening, Care and Treatment of Persons with Chronic Hepatitis C Infection Updated Version April 2016 Guidelines. 2016. 71 с.
30. *Janssen H. L. A.* et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. // N. Engl. J. Med. 2013. Т. 368. № 18. С. 1685 – 1694.
31. *Persson R.* et al. 1204 Pharmacokinetics of Miravirsen, a MIR-122 Inhibitor, Predict the Prolonged Viral Load Reduction in Treatment Naive Genotype 1 HCV Infected Patients // J. Hepatol. 2012. Т. 56. С. S477.
32. URL: http://bit.ly/2MwOawR.
33. URL: http://bit.ly/2P1X5bf.
34. URL: http://bit.ly/2MxSLz3.
35. URL: http://bit.ly/2o4ErEE.
36. URL: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03373786.
37. URL:http://bit.ly/2o5Doo0.
38. *Vieira M.*, *Saraiva M. J.* Transthyretin: a multifaceted protein. // Biomol. Concepts. 2014. Т. 5. № 1. С. 45 – 54.
39. *Rizk M.*, *Tuzmen S.* Update on the clinical utility of an RNA interference-based treatment: focus on Patisiran. // Pharmgenomics. Pers. Med. 2017. Т. 10. С. 267 – 278.
40. Titze-*de-Almeida R.*, *David C.*, Titze-*de-Almeida S. S.* The Race of 10 Synthetic RNAi-Based

Drugs to the Pharmaceutical Market. // Pharm. Res. 2017. Т. 34. № 7. С. 1339 – 1363.
41. *Coelho T.* et al. Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. // N. Engl. J. Med. 2013. Т. 369. № 9. С. 819 – 829.
42. *Suhr O. B.* et al. Efficacy and safety of patisiran for familial amyloidotic polyneuropathy: a phase II multi-dose study. // Orphanet J. Rare Dis. 2015. Т. 10. С. 109.
43. URL: http://bit.ly/2VYle3L.
44. URL: http://bit.ly/2MxSU5z.
45. *Pasi K. J.* et al. Targeting of Antithrombin in Hemophilia A or B with RNAi Therapy. // N. Engl. J. Med. 2017. Т. 377. № 9. С. 819 – 828.
46. Benitez-*Del-Castillo J. M.* et al. Safety and Efficacy Clinical Trials for SYL1001, a Novel Short Interfering RNA for the Treatment of Dry Eye Disease. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2016. Т. 57. № 14. С. 6447 – 6454.
47. *Шиловский И. П.* / Применение интерференции РНК для разработки подходов к антицитокиновой терапии аллергической бронхиальной астмы. Дисс. докт. наук., Институт Иммунологии ФМБА. М., 2017.
48. *Swaminathan G.*, *Navas-Martín S.*, *Martín-García J.* MicroRNAs and HIV-1 infection: Antiviral activities and beyond // J. Mol. Biol. 2014. Т. 426. № 6. С. 1178 – 1197.
49. *Ishida H.* et al. Alterations in microRNA expression profile in HCV-infected hepatoma cells: Involvement of miR-491 in regulation of HCV replication via the PI3 kinase/Akt pathway // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011. Т. 412. № 1. С. 92 – 97.
50. *Brown D.*, *Rahman M.*, *Nana-Sinkam S. P.* MicroRNAs in respiratory disease: A clinician's overview // Ann. Am. Thorac. Soc. 2014. Т. 11. № 8. С. 1277 – 1285.
51. *Zhi F.* et al. Characteristic MicroRNA Expression Induced by δ-Opioid Receptor Activation in the Rat Liver Under Prolonged Hypoxia // Cell. Physiol. Biochem. 2017. Т. 44. № 6. С. 2296 – 2309.
52. *Souza M. F. De* et al. Circulating mRNAs and miRNAs as candidate markers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer // PLoS One. 2017. Т. 12. № 9. С. 1 – 16.

PROSPECTS FOR NON-CODING RNA (NCRNA) IN GENE THERAPY

D. M. Belousov[1,2], M. M. Levina[1], G. A. Starostin[1]

[1] I. M. Sechenov First Moscow State Medical University
[2] dmbelousov1806@gmail.com

The study was intended to establish the prospects for non-coding RNA (ncRNA) in gene therapy acting according to the RNA-interference mechanism. Structural features, methods for increasing the stability of small interfering RNA, as well as methods for increasing the efficiency of posttranscriptional silencing was analysed. Some methods of chemical modification of oligonucleotides and their delivery systems to the cell was described. The newest medicinal preparations based on non-coding RNA was considered. The pharmacokinetics, pharmacodynamics and the course of clinical trials was described with special attention to the biosafety of these drugs.

Keywords: gene therapy, RNAi, microRNA, siRNA, RNA-interference.