

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научно-исследовательский институт гриппа»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Бродская Александра Валерьевна

**РАЗРАБОТКА ПРОТИВОВИРУСНОЙ КОМПОЗИЦИИ МАЛЫХ
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ РЕПРОДУКЦИИ
ВИРУСА ГРИППА А**

03.02.02 – Вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Васин Андрей Владимирович
кандидат биологических наук

Санкт-Петербург - 2018

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	3
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Вирусы гриппа	11
1.1.1. Строение и жизненный цикл вируса гриппа А	11
1.1.2. Антигенная изменчивость вирусов гриппа	18
1.1.3. Распространение, профилактика и терапевтические подходы для лечения ВГА.	20
1.2. РНК-интерференция	23
1.2.1. Возможность применения РНК-интерференции в качестве противовирусной терапии.	25
1.2.1.1. Вирус-ингибирующая активность синтетических малых РНК.....	25
1.2.1.2. Применение миРНК для подавления вируса гриппа А.	27
1.2.1.3. Подбор и дизайн противогриппозных терапевтических миРНК.....	33
1.3. Доставка миРНК в клетку.....	37
1.3.1. Доставка миРНК в клетку вирусными системами	37
1.3.2. Невирусная доставка миРНК в клетку	39
1.3.2.1. Липосомальная доставка миРНК	40
1.3.2.2. Полиплексная доставка миРНК.....	42
1.3.2.2.1. Полиэтиленимин	43
1.3.2.2.2. Хитозан.....	44
1.3.2.3. Доставка миРНК с помощью микро-/наноконтейнеров	45
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	49
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	60
3.1. Дизайн миРНК, направленных на выключение экспрессии генов PA и NP вируса гриппа	60
3.2. Скрининг противовирусной активности анти-PA и анти-NP миРНК, доставляемых в клетки с помощью липофектамина, <i>in vitro</i>	63
3.3. Выбор носителей противовирусных миРНК на основе полиэтиленимина, производных хитозана и гибридных микрокапсул	69
3.4. Сравнение эффективности внутриклеточной доставки миРНК в комплексе с производными хитозана, ПЭИ и SiO ₂ -МК	80
3.5. Сравнение противовирусной активности миРНК в комплексе с производными хитозана, ПЭИ и SiO ₂ -МК	84
3.6. Оценка противовирусного действия композиции миРНК, инкапсулированных в SiO ₂ -МК	90
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	100
ВЫВОДЫ.....	102
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	104

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Грипп — это острая респираторная инфекция, вызываемая одноименными вирусами семейства *Orthomyxoviridae*. Грипп представляет серьезную проблему для общественного здравоохранения, вызывая ежегодные сезонные эпидемии и периодические пандемии с высокой летальностью. Грипп приводит к развитию множества осложнений, основным из которых является вторичная бактериальная пневмония, способная вызывать смертельные исходы в группах риска. По данным ВОЗ ежегодно фиксируются десятки миллионов случаев заболевания гриппом, в том числе до полумиллиона смертельных исходов.

Вследствие сегментированности генома вирус гриппа имеет потенциал к реассортации генов, приводящей к кардинальному изменению биологических свойств вируса (вирулентность и инфекционность). Вирусы гриппа также обладают способностью к очень высокой мутационной изменчивости, и, как следствие, к быстрому приобретению устойчивости к лекарственным препаратам [1]. В настоящее время противовирусные средства для лечения гриппа представляют собой крайне ограниченную группу препаратов, при этом для части из них известна лекарственная резистентность [2–4]. За последние десятилетия в связи с угрозой возникновения новых штаммов вируса гриппа типа А (ВГА), нехарактерных для человеческой популяции, как в случае «птичьего» в 2006 и «свиного» гриппа в 2009 годах [5,6], возросла потребность в разработке принципиально новых этиотропных препаратов, способных обойти проблему резистентности вируса, или же противовирусных препаратов широкого спектра действия, обладающих повышенной эффективностью и доступностью в применении. Одним из перспективных направлений создания противовирусных препаратов является использование ингибиторов вирусной репродукции на основе малых интерферирующих РНК (миРНК) [7].

Впервые синтетические миРНК были применены в качестве терапевтических агентов против респираторно-синтициального вируса в 2001 году [8]. С тех пор были исследованы различные подходы по использованию

РНК-интерференции для терапии респираторных вирусных инфекций [9–11]. Основным препятствием практического применения миРНК по сей день является проблема эффективной и нетоксичной доставки этих молекул в клетки и длительной защиты их функционально активного состояния. В случае вируса гриппа человека наиболее целесообразной видится система доставки миРНК, подходящая для интраназального введения. Этот путь доставки минимизирует системную потерю миРНК, так как они доставляются непосредственно к месту репликации вируса гриппа – эпителиальным клеткам дыхательных путей. Для этой цели часто используются поликатионные полимеры, способные за счет положительного заряда связывать миРНК и обеспечивать защиту от нуклеаз и хорошую растворимость. В настоящее время существует ряд препаратов на основе молекул миРНК, находящихся на стадии доклинических исследований [12]. Тем не менее, несмотря на полученные положительные результаты, проблема оптимальной доставки миРНК для терапии гриппа все еще не решена, и разрешенный к применению фармацевтический препарат на основе миРНК в настоящее время отсутствует.

Таким образом, разработка новых современных подходов к терапии гриппа на основе использования механизма РНК-интерференции и сопутствующее ей решение задачи высокоэффективной и безопасной доставки препарата миРНК в инфицированные клетки являются чрезвычайно актуальными задачами современной молекулярной и клинической вирусологии.

Степень разработанности темы исследования

Разработка новых противовирусных препаратов, в частности, направленных на лечение и профилактику гриппа, является общемировой актуальной задачей. На сегодняшний день уровень развития биотехнологий позволяет синтезировать множество соединений, обладающих биологической/фармакологической активностью с высокой специфичностью к вирусным мишеням. Разработка таких препаратов проводится с применением методов высокоточного молекулярного докинга с дальнейшим скринингом – оптимизацией для селективного взаимодействия с определенной мишенью. Однако, практический выход такого

подхода, к сожалению, невелик. Более того, высокая адресность действия лекарственных средств может приводить к быстрому появлению резистентных вирусных штаммов.

В связи с этим требуются новые подходы к созданию противовирусных препаратов, позволяющие как проводить их быстрый дизайн, так и избавиться от моноспецифичности в отношении мишени. Перспективным направлением ингибирования вирусной репродукции на уровне экспрессии генов считается использование миРНК. После успешного применения терапевтических миРНК для подавления гриппозной инфекции в исследованиях на клеточных культурах и лабораторных мышах в 2009 году [13,14], многие научные коллективы тестировали различные миРНК, направленные на подавление экспрессии всех консервативных генов ВГА: *NP*, *PA*, *PB1*, *PB2*, *M*, *NS* [15–19]. Убедительно продемонстрировано, что одна миРНК может обеспечить защиту от ВГА разных подтипов [20]. Относительно недавно компанией siRNAomics был разработан новый препарат STP702 многоцелевого действия, объединяющий в себе коктейль миРНК, направленных на различные консервативные области генома ВГА. Было показано, что STP702 эффективен в отношении штаммов ВГА подтипов H5N1 и H1N1 [21]. Вместе с тем, вопрос о стабильном защитном действии миРНК остается не решенным. Открытым также является вопрос максимально эффективной и биологически безопасной доставки миРНК в инфицированные клетки. Существует ряд обзоров, посвящённых методам невирусной доставки миРНК [22,23], однако четкого понимания, какая система может быть признана оптимальной для использования на уровне организма, до сих пор нет.

Перспективные результаты по доставке миРНК были получены при их инкапсулировании в гибридные микро- и наноконтейнеры, представляющие собой полиэлектролитные капсулы с поверхностью, модифицированной неорганическими соединениями [24,25]. Технология капсулирования показала себя как эффективная мультифункциональная платформа для доставки различных биомолекул, позволяющая включать в себя несколько биомолекул с высоким их содержанием и контролируемым соотношением, а также большой

степенью защиты от биодegradации [26]. Благодаря возможности модификации микрокапсул за счет химического состава наружного слоя, скорость их деградации и распределение содержимого могут легко варьироваться. Это позволяет осуществлять направленный транспорт к клеткам-мишеням с оптимальной терапевтической концентрацией. Применение этой технологии для доставки терапевтических миРНК для подавления репродукции ВГА было впервые осуществлено в рамках выполнения данного исследования в 2017 г на базе ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России научным коллективом при участии автора [25].

Цель исследования

Разработать комбинацию малых интерферирующих РНК (миРНК) в комплексе с эффективной системой доставки для ингибирования экспрессии генов вируса гриппа типа А человека *in vitro*.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

Задачи исследования

1. Провести подбор миРНК, направленных на консервативные области геномных сегментов PA и NP ВГА человека.
2. Выбрать наиболее перспективные миРНК по результатам *in vitro* скрининга их противовирусной активности при внутриклеточной доставке с использованием липофектамина.
3. Выбрать наиболее эффективный носитель для миРНК по результатам сравнения эффективности внутриклеточной доставки и противовирусной активности миРНК в комплексе с полиэтиленимином, производными хитозана, липофектаминои и гибридными микрокапсулами.
4. Оценить противовирусный потенциал композиции выбранных миРНК и носителя в отношении ВГА *in vitro*.
5. Провести исследование противовирусного действия разработанной композиции *in vitro* в отношении ВГА разных подтипов.

Научная новизна работы

В процессе выполнения исследования впервые подобраны миРНК, направленные на «выключение» экспрессии генов ВГА, кодирующих белки NP, PA, PA-N155, PA-N182 и PA-X, и обладающие противовирусной активностью *in vitro*.

Впервые проведено сравнительное исследование эффективности внутриклеточной доставки и противовирусного в отношении ВГА действия препаратов миРНК с различными невирусными носителями: полиплексами, липосомами и микрокапсулами.

Впервые продемонстрировано эффективное применение упакованных в гибридные микрокапсулы миРНК для эффективного подавления репродукции ВГА *in vitro*.

Разработана не имеющая прямых аналогов противовирусная композиция для подавления экспрессии генов PA, NP и NS ВГА, представляющая собой комбинацию из трех направленных на эти гены миРНК, инкапсулированных в гибридные полиэлектролитные микрокапсулы с поверхностью, модифицированной частицами SiO₂.

Теоретическая и практическая значимость работы

Выполненная работа представляет собой фундаментальное научное исследование, посвященное проблеме внутриклеточной доставки противовирусных миРНК в клетки, обладающее, помимо теоретической значимости, прикладным потенциалом.

Продемонстрирована возможность успешного применения инкапсулированных терапевтических миРНК, направленных на подавление экспрессии нескольких генов ВГА, в опытах *in vitro* в отношении штаммов ВГА различных подтипов.

Полученные результаты исследования противовирусного потенциала миРНК будут в дальнейшем использоваться для разработки фармакологической формы препарата на основе миРНК, предназначенного для профилактики и/или лечения вирусной инфекции, вызванной ВГА человека.

Предложенные подходы по эффективной внутриклеточной доставке миРНК с помощью гибридных микрокапсул, поверхность которых может быть при необходимости модифицирована с целью достижения большей биосовместимости, биodeградируемости, эффективности и таргетности доставки, будут также использованы при разработке новых фармацевтических препаратов различного действия.

Методология и методы исследования.

В работе применялись стандартные вирусологические, биохимические, молекулярно-биологические и иммунологические методы. Кроме того, были применены оригинальные подходы при компьютерном анализе последовательностей и подборе миРНК. Более подробно способы проведения экспериментов отражены в разделе «Материалы и методы».

Основные положения, выносимые на защиту

1. Синтетические миРНК PA-1630, NP-717, NP-1004 и NP-1341, направленные на консервативные области мРНК PA и NP, обладают противовирусным действием в отношении ВГА *in vitro*.
2. Гибридные SiO₂-микрокапсулы обладают низкой цитотоксичностью и высокой инкапсулирующей способностью в отношении миРНК, обеспечивают длительную защиту миРНК от РНКаз, а также эффективную и быструю трансфекцию миРНК внутрь клетки и их полное высвобождение в цитозоль через 24 часа инкубации.
3. Препарат инкапсулированных в гибридные SiO₂-микрокапсулы миРНК, направленных на подавление экспрессии генов NP, PA и NS ВГА, обладает высокоспецифичным противовирусным действием в отношении ВГА подтипов H1N1, H1N1_{pdm09}, H5N2, H7N9. Эффективность ингибирования вирусной репродукции в случае профилактического введения препарата из комбинации трех миРНК выше, чем эффективность каждого препарата по отдельности.

Личный вклад автора состоит в самостоятельном планировании и выполнении всех основных лабораторных исследований, анализе и статистической обработке полученных результатов. Автором лично проведен подбор миРНК, направленных на подавление экспрессии генов *PA* и *NP* ВГА, и первичный скрининг их противовирусного действия *in vitro* в комплексе с липофектаминол. Также автором проведены все работы по подбору параметров и характеристике комплексов миРНК с поликатионными носителями, сравнительное исследование эффективности доставки, опыты *in vitro* по определению противовирусной активности препаратов миРНК.

Вклад соавторов. При выполнении данного исследования методическая помощь была оказана сотрудниками ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России: Даниленко Д.М., Штро А.А. – при культивировании используемых в работе штаммов вируса гриппа, Сахенберг Е.И. – при культивировании используемых в работе клеточных культур А549 и MDCK, Горшковым А.Н. – при проведении экспериментов с использованием электронной микроскопии, Шурыгиной А.П. С. – при проведении экспериментов по проточной цитофлуориметрии. Химический синтезе микрокапсул, их характеристика и помощь в проведении конфокальной микроскопии для оценки внутриклеточной доставки миРНК, были осуществлены сотрудниками рабочей группы RASA-центра СПбПУ Петра Великого Тиминим А.С. и Муслимовым А.Р. под руководством проф. Сухорукова Г.Б.

Степень достоверности и апробация материалов диссертации

Достоверность результатов исследований, проведенных автором, подтверждена статистическим анализом данных, полученных в ходе независимых экспериментов. Материалы диссертационной работы доложены на 42-м Международном конгрессе FEBS (Иерусалим, Израиль 2017); на Международной научной конференции «Trends in Influenza Research 2017» (Санкт-Петербург, 2017); на XVIII Зимней молодежной школ-конференции по биофизике и молекулярной биологии ПИЯФ (Ленинградская область, п. Рощино, 2017), на X Всероссийском Конгрессе с международным участием молодых ученых-биологов "Симбиоз 2017" (Казань, 2017), на Конференции с международным участием

XLVI «Неделя науки СПбПУ», (Санкт-Петербург, 2017), а также в виде доклада на научно-практическом курсе Европейской Организации Молекулярной Биологии EMBO «Small non-coding RNA in infection» (Вюрцбург, Германия, 2014).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, в том числе 7 статей, из них 4 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, и 10 тезисов докладов.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 115 страницах машинописного текста, включая 7 таблиц и 35 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, шести глав собственных исследований и обсуждения полученных результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 130 источников на русском и английском языках. Диссертация изложена в соответствии с общими требованиями к оформлению кандидатских и докторских диссертаций, утверждёнными в ГОСТ Р 7.0.11–2011.

Работа поддержана грантом РФФИ 15-15-13734 «Клеточные микроРНК – новые молекулярные мишени для терапии тяжелых вирусных инфекций», грантом для студентов, аспирантов, молодых учёных, молодых кандидатов наук ВУЗов и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга в 2015 году. Также работа проводилась в рамках темы Государственного задания, выполняемого в ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. *Вирусы гриппа*

Вирусы гриппа относятся к семейству *Orthomyxoviridae* и подразделяются на 4 типа: А, В, С и D. Вирусы гриппа различных типов отличаются друг от друга по количеству сегментов генома, кругу возможных хозяев, а также антигенным различиям внутренних белков (NP и M), не дающими перекрестных межтиповых серологических реакций. Несмотря на то, что вирусы гриппа типов В и С достаточно широко циркулируют в человеческой популяции, только вирусы гриппа типа А (ВГА), которые обнаружены также у других видов позвоночных таких как птицы, свиньи, лошади, тюлени, киты, а также собаки и кошки, способны вызывать пандемии, представляющие серьезную опасность для человечества. Для ВГА характерно различие в антигенных свойствах двух поверхностных белков: гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA). Вследствие наличия множества антигенных вариантов этих белков в 1980 г. для ВГА была введена новая классификация, основанная на обозначении антигенного подтипа HA и NA. В настоящее время известно 16 подтипов HA и 9 подтипов NA ВГА. Различие аминокислотных последовательностей участков HA, отвечающих за антигенность, составляет более 30% между различными подтипами ВГА [27].

У вирусов гриппа типов В и С антигенные варианты существуют, но они не столь значительны, как для ВГА. По этой причине они не нуждаются в дополнительной классификации, за исключением того, что для вирусов гриппа типа В выделяют две линии: Викторианскую и Ямагатскую.

1.1.1. *Строение и жизненный цикл вируса гриппа А*

ВГА является оболочечным вирусом, зрелый вирион имеет сферическую или овальную форму и диаметр 80-120 нм. ВГА имеет сегментированный геном, состоящий из 8 сегментов РНК с отрицательной полярностью. В вирионе геномная РНК ассоциирована с вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразой (RdRp) и многочисленными молекулами нуклеопротеина (NP) и формирует рибонуклеопротеиновые комплексы (РНП). Главными структурными белками

ВГА являются HA, NA, белки матрикса M1 и M2, NP и три субъединицы RdRp — PB1, PB2 и PA. В составе вирионов ВГА, по-видимому, присутствует также небольшое количество белка ядерного экспорта NS2 (NEP), ассоциированного с M1 [28]. Кроме того, по данным протеомного исследования вирионы ВГА включают в себя в невысоких концентрациях группу белков клеток-хозяев, в том числе белки цитоскелета, аннексины, гликолитические ферменты, тетраспанины [29]. Функциональная значимость присутствия перечисленных клеточных белков в вирионах ВГА остаётся невыясненной. Недавно было показано, что неструктурный белок NS1 также входит в состав вириона ВГА [30].

Схема организации вириона ВГА и локализация его главных структурных белков представлена на рисунке 1.1.

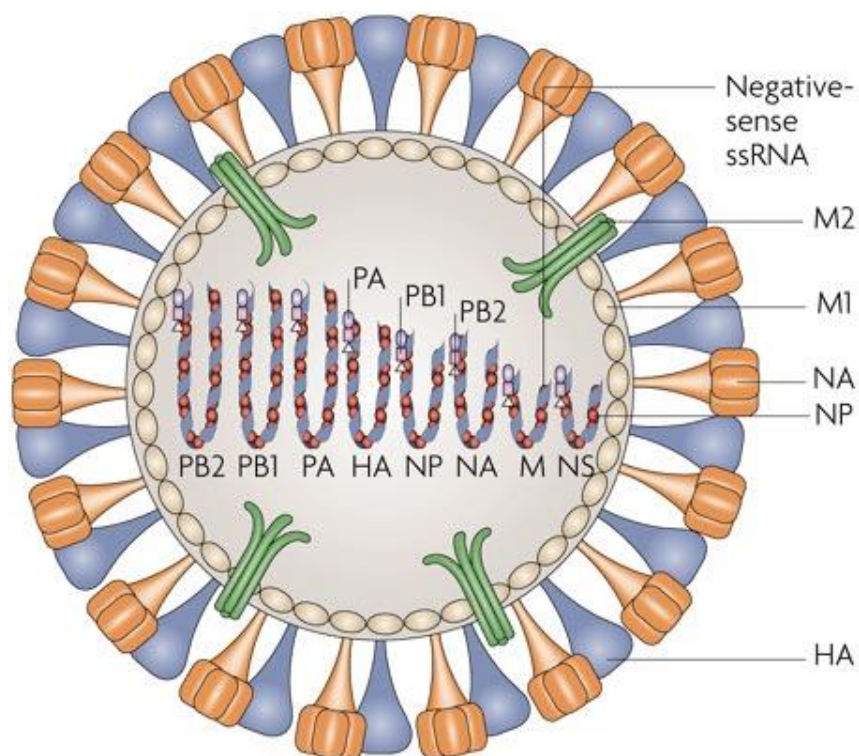


Рисунок 1.1 – Строение вируса гриппа типа А [31].

Свойства и функции белков ВГА кратко суммированы в таблице 1.1.

Таблица 1.1 – Сегменты генома ВГА и функциональная роль продуктов их экспрессии в жизненном цикле вируса [32,33]

Сегмент	Название белка	Функции белка
I	PВ2 Основной полимеразный белок 2 <i>(несплайсированная мРНК)</i>	Субъединица вирусной полимеразы; инициирует транскрипцию вирусной мРНК, распознает 5'-кэп структуры хозяйской пре-мРНК. Было обнаружено, что PВ2 влияет на вирулентность и диапазон хозяев ВГА. Взаимодействует с РА.
II	PВ1 Основной полимеразный белок 1 <i>(несплайсированная мРНК)</i>	Каталитическая субъединица вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы, отвечающей удлинению цепи РНК; участвует в транскрипции. Взаимодействует с PВ2 и РА.
	PВ1-F2 <i>(несплайсированная мРНК, вторая рамка считывания)</i>	Усеченная форма PВ1, взаимодействует с PВ1 и влияет на активность полимеразного комплекса. Показано что является фактором вирулентности; индуцирует апоптоз зараженных клеток, ассоциированный с митохондриями
	PВ1-N40 <i>(несплайсированная мРНК, третья рамка считывания)</i>	N-терминально усеченная форма PВ1; поддерживает баланс между PВ1 и PВ1-F2
III	РА <i>(несплайсированная мРНК, вторая рамка считывания)</i>	Субъединица вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы, обладающая эндонуклеазной а также протеазной активностью. Были высказаны предположения, что белок вовлечен в сборку функциональных комплексов вирусной РНК полимеразы из неактивных интермедиатов.
	РА-Х <i>(несплайсированная мРНК, рибосомальный сдвиг рамки)</i>	Неструктурный белок вируса; участвует в модуляции клеточного ответа на инфекционный процесс, предположительно является фактором вирулентности ВГА[32]

Продолжение таблицы 1.1

Сегмент	Название белка	Функции белка
III	РА-N155 (<i>несплайсированная мРНК, вторая рамка считывания</i>)	Минорные неструктурные белки; предположительно ассоциированы с вирулентностью и отвечают за регуляцию взаимодействий между вирусом и клеткой
	РА-N182 (<i>несплайсированная мРНК, третья рамка считывания</i>)	
IV	НА (<i>несплайсированная мРНК</i>)	Поверхностный гликопротеин, гомотример. Отвечает за связывание с рецепторами (сиаловая кислота) на мембране клеток-мишеней, прикрепление и проникновение вируса в клетку на начальных стадиях инфекции.
V	NP Нуклеокапсидный белок (<i>несплайсированная мРНК</i>)	Основной компонент вирусного капсида. Взаимодействует с сегментами вирусной РНК, образуя частицы вирусного РНП; осуществляет контроль ядерно-цитоплазматического транспорта РНК.
VI	НА Нейраминидаза (<i>несплайсированная мРНК</i>)	Интегральный мембранный гликопротеин. Отщепляет остатки сиаловых кислот с поверхности гликопротеинов у вирусных частиц и клеток хозяина, способствуя выходу новых вирусных частиц из инфицированных клеток и освобождая вирусы от рецепторов клеточных мембран.
VII	M1 Белок матрикса 1 (<i>несплайсированная мРНК</i>)	Основной компонент вирусной мембраны; самый многочисленный белок, лежащий в основе вирусной оболочки. Обеспечивает процессы самосборки вирусных частиц и их почкование, оказывает влияние на морфологию вирионов. Взаимодействует с белками NP, PB1, PB2, PA, M2.
	M2 Белок матрикса 2 (<i>альтернативный сплайсинг мРНК</i>)	Интегральный мембранный белок. Образует ионный канал — протонную помпу. Закачивает протоны (H ⁺) внутрь вирусных частиц, тем самым снижая pH в вирионах, пока они находятся в эндосомах. Низкий pH облегчает диссоциацию M1 от РНП и способствует высвобождению РНП в цитоплазму.
	M42 (<i>альтернативный сплайсинг мРНК, вторая рамка считывания</i>)	Укороченная форма матриксного белка. Функции не выяснены до конца, однако показано, что при отсутствии в вирионе белка M2 M42 может функционально его заменить

Продолжение таблицы 1.1

Сегмент	Название белка	Функции белка
VIII	NS1 Неструктурный белок1 (<i>несплайсированная мРНК</i>)	Неструктурный многофункциональный белок, который участвует в различных процессах взаимодействия между вирусом и клеткой; контролирует сплайсинг и полиаденилирование мРНК; является антагонистом интерферона и RIG-1; содержит классический иммуносупрессивный домен.
	NS2 Неструктурный белок2 (NEP) (<i>альтернативный сплайсинг мРНК</i>)	Неструктурный белок (но небольшое количество присутствует в составе вириона в ассоциации с M1) Контролирует ядерно-цитоплазматический транспорт вирусного РНП комплекса.
	NS3 (<i>альтернативный сплайсинг мРНК</i>)	Минорный белок. Роль NS3 потенциально связана с адаптацией вируса к новому видовому хозяину

Жизненный цикл вируса гриппа состоит из следующих этапов:

- прикрепление вируса к рецепторам на поверхности клетки;
- проникновение вируса в клетку в процессе рецептор-опосредованного эндоцитоза
- репликация и транскрипция вирусных РНП внутри клеточного ядра;
- сборка и выход вирусных частиц из клетки.

Первой стадией инфицирования вирусами гриппа клеток хозяина является распознавание рецептор-связывающим сайтом НА рецепторов N-ацетилнейраминовой (сиаловой) кислоты, которые присутствуют преимущественно на поверхности клеток верхних дыхательных путей. После связывания с рецепторами на клеточной поверхности вирус попадает внутрь клетки в процессе эндоцитоза. Низкий уровень pH в поздней эндосоме открывает M2-ионный канал, в результате чего внутри вириона понижается pH, происходит конформационное изменение НА, что в конечном итоге приводит к слиянию вирусной и эндосомальной мембран и высвобождению вирусных РНП в цитоплазму. Далее РНП транслоцируются в ядро, где происходит транскрипция и

репликация под действием RdRp, являющейся гетеротримером из субъединиц PA, PB1 и PB2 [27].

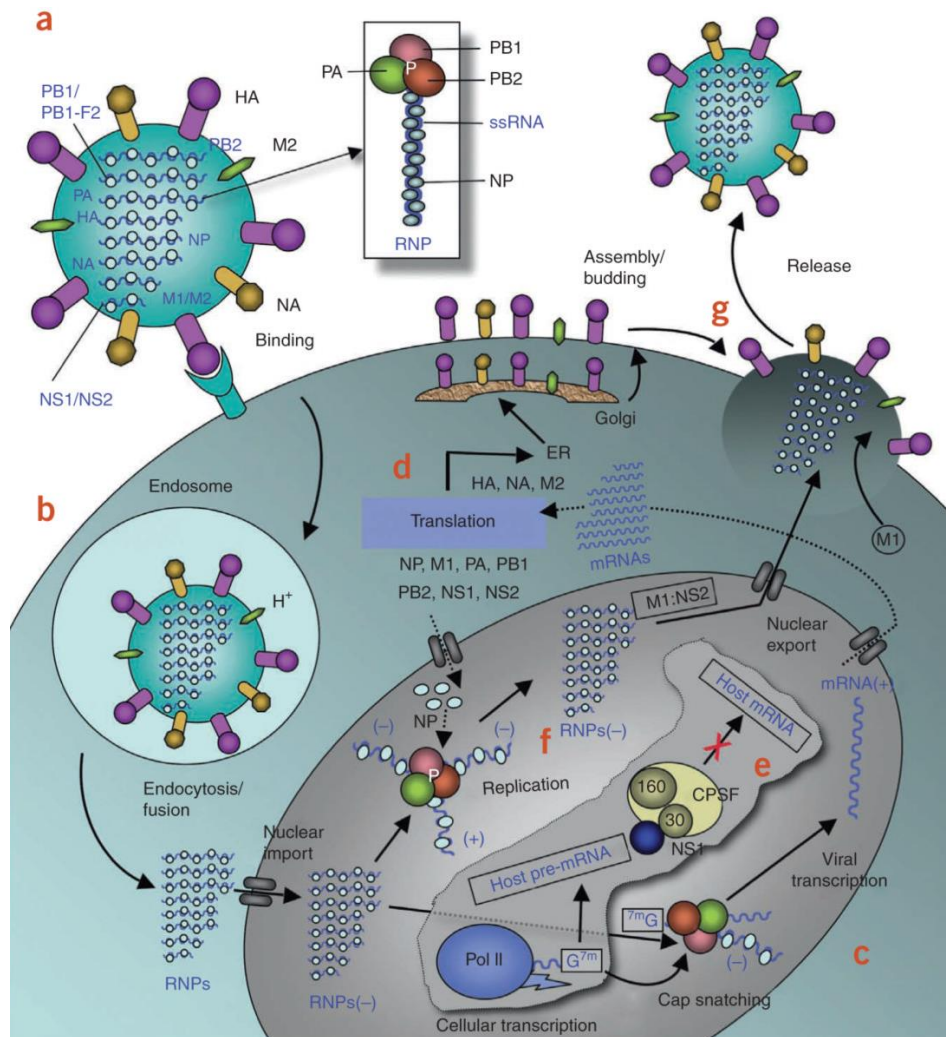
В жизненном цикле ВГА участвуют три типа РНК: геномная (-)-РНК (вРНК), комплементарная ей (+)-РНК (кРНК) и матричная РНК (мРНК). PB1 является каталитической субъединицей RdRp, которая содержит четыре консервативных мотива (мотивы I, II, III и IV) и четыре инвариантных аминокислотных остатка (по одному в каждом мотиве), сохраняющихся среди всех вирусных РНК-зависимых РНК- и ДНК-полимераз. Она катализирует последовательное присоединение нуклеотидов к растущей цепи РНК. Таким образом, PB1 отвечает за репликацию и транскрипцию [34]. PB1 не способна самостоятельно инициировать синтез мРНК и модифицировать ее 5'-конец с помощью кэпирования и присоединения метильной группы. PB1 использует в качестве затравки для транскрипции кэпированный 5'-конец клеточных мРНК, образованных РНК-полимеразой II. ПолиА-хвост вирусных мРНК образуется за счёт «пробуксовки» RdRp на полиУ-последовательности вРНК. Для экспорта вирусных мРНК из ядра используется ряд клеточных белков, в частности, TREX и NXF1/TAP [35,36]

На более поздних стадиях ВГА инфекции RdRp переключается с транскрипционной на репликативную активность. У всех вирусов с (-)РНК геномом репликация осуществляется вирус-специфическими белками. Белки, ответственные за транскрипцию, участвуют и в репликации генома ВГА. Первичным продуктом репликативного синтеза вРНК являются комплементарные копии всех сегментов геномной вРНК. Эти РНК отличаются от мРНК структурой концевых последовательностей. В отличие от мРНК они не содержат кэпированных и метилированных затравочных последовательностей, и оба их конца строго комплементарны концам РНК-матриц; этим они отличаются от укороченных и полиаденилированных транскриптов [37]. Эти антигеномные сегменты РНК служат в свою очередь матрицами для синтеза точных копий геномных вРНК сегментов.

Синтезированные на рибосомах белки РА, РВ1, РВ2 и NР проникают в ядро и образуют РНП комплекс с вновь образованными копиями вРНК. Экспорт РНП из ядра происходит вследствие формирования NS2-M1-РНП-комплекса, который может взаимодействовать с высококонсервативным ядерным рецептором клетки хозяина.

Главным фактором в формировании и отпочковании нового вириона является белок M1, содержащий структурную информацию, необходимую для сборки вириона и его взаимодействия с клеточной мембраной [38].

Обеспечение выхода вновь образованных вирионов ВГА из клетки - это основная функция NA. В связи с тем, что концевая нейраминная кислота играет ключевую роль в процессах связывания HA, а под действием NA эти связи нарушаются, происходит последующее отделение вируса от мембраны клетки. При отсутствии функциональной NA потомство вирионов группируется на поверхности клетки за счет рецептор-связывающей активности HA и не может покинуть клеточную поверхность, ограничивая, таким образом, распространение вируса от одной клетки к другой (рисунок 1.2).



a – структурная организация вириона. *b* – ранняя фаза жизненного цикла ВГА. Связывание HA с рецепторами (остатками сиаловых кислот), эндоцитоз, слияние мембран вируса и эндосомы, освобождение РНП-комплексов в цитозоль и их ядерный импорт. *c* – фаза транскрипции вирусных мРНК. Кэп-снэтчинг, транскрипция мРНК ВГА вирусной RdRp. *d* – фаза трансляции вирусных белков. Экспорт вирусных мРНК в цитоплазму, трансляция белков. Импорт белков NP, M1, PA, PB1, PB2, NS1, NS2 в ядро. Процессинг и транспорт белков HA, NA и M2 к клеточной мембране. *e* – подавление синтеза хозяйских мРНК вирусным белком NS1. *f* – фаза репликации вирусных РНК. Репликация осуществляется вирусной RdRp без участия праймера по схеме (-)вРНК → (+)кРНК → (-)вРНК. Сборка РНП-комплексов. Экспорт РНП-комплексов из ядра с участием NS2 и их транспорт к клеточной мембране. *g* – фаза сборки и отпочкования дочерних вирионов вируса гриппа

Рисунок 1.2 – Схема жизненного цикла вируса гриппа А, взято из Das et al., 2010 [38].

1.1.2. Антигенная изменчивость вирусов гриппа

Грипп не имеет себе равных среди других инфекций по способности к эпидемическому распространению. В короткие сроки эпидемии гриппа

охватывают целые страны и континенты, а при смене подтипа возбудителя вызывают обширные пандемии с высокой летальностью.

Причиной повторяющихся эпидемий гриппа является уникальная изменчивость генома ВГА, приводящая к постоянному изменению антигенной структуры. Антигенные вариации преимущественно являются результатом изменений в поверхностных белках: HA и NA. При этом наиболее сильному давлению отбора подвергается HA. Внутренние белки, не участвующие в прикреплении вируса к клеткам хозяина, подвержены меньшему давлению отбора, вследствие чего они являются более консервативными.

Вариабельность HA и NA обусловлена двумя генетическими процессами – дрейфом и шифтом. Под генетическим дрейфом понимают незначительные изменения гена, обусловленные точечными мутациями, при которых антигенные свойства меняются незначительно. Известно, что RdRp не имеет механизмов коррекции, что приводит к возникновению во время транскрипции спонтанных точечных мутаций с большой скоростью. В результате таких ошибок при продолжительном периоде циркуляции вируса под влиянием коллективного иммунитета отбираются варианты, отличающиеся по антигенным свойствам от прототипного штамма. Таким образом, генетический дрейф является причиной продолжительного присутствия ВГА в человеческой популяции и возникновения ежегодных эпидемий [3].

Под генетическим шифтом понимают значительные изменения поверхностных антигенов, произошедшие в результате полной замены фрагментов генома в процессе реассортации при одновременной репликации в клетке ВГА двух разных подтипов. Результатом таких процессов является образование абсолютно новых подтипов, против которых хозяйский организм не имеет иммунитета. Преодоление ВГА нового подтипа межвидового барьера может привести к развитию пандемии. В качестве так называемых “резервуаров для смешивания” с успехом могут выступать птицы и свиньи.

От птиц были выделены ВГА всех существующих подтипов HA и NA, в то время как среди млекопитающих циркулирует лишь ограниченное число

подтипов ВГА [39]. В истории за прошедший двадцатый век известны пандемии, вызванные вирусами подтипов H1N1, H2N2 и H3N2. Эти пандемические штаммы были продуктами генной реассортации между ВГА человека и птиц [40].

1.1.3. Распространение, профилактика и терапевтические подходы для лечения ВГА.

ВГА является возбудителем одноименного заболевания. Грипп – это острая вирусная инфекция, поражающая в первую очередь эпителий верхних дыхательных путей, в том числе носовой полости и глотки, а также бронхи и легкие. Вирус передается от человека человеку воздушно-капельным путем. Грипп имеет тенденцию быстро распространяться, вызывая сезонные эпидемии. В Северном полушарии ежегодно осенью и зимой происходят эпидемии гриппа, в течение которых инфекция поражает примерно 5–15% населения [1].

Грипп характеризуется острым развитием таких симптомов, как резкое повышение температуры тела, кашель, головная боль, мышечные и суставные боли, недомогание, насморк, и длится от 2 до 7 дней [1,3]. Гриппозная инфекция может иногда вызывать тяжелое заболевание и приводить к смертельному исходу, особенно среди пожилых людей, беременных женщин, детей раннего возраста и лиц с определенными нарушениями здоровья (в том числе с хроническими заболеваниями сердца, легких, почек, печени, крови, с нарушениями обмена веществ, с ослабленной иммунной системой). Тяжелые формы гриппа отмечаются в 3–5 млн случаев в год, летальные исходы составляют от 250 000 до 500 000 случаев. Экономические потери, вызванные гриппом и другими острыми респираторными вирусными инфекциями (ОРВИ), составляют около 77% от ущерба, приходящегося на долю всех инфекционных болезней. Значительные убытки связаны как с прямыми расходами на лечение и реабилитацию, так и с косвенными потерями производственного характера, вызванными снижением производительности труда и сокращением прибыли предприятий [1,41].

Принимая во внимание опасные последствия распространения инфекции, с гриппом ведется постоянная борьба. Она включает в себя этиотропную терапию и профилактику.

Традиционным способом предупреждения заболевания гриппом, рекомендованным ВОЗ, является вакцинация. Для вакцинопрофилактики используют живые и инактивированные вакцины различных типов: вирионные, субъединичные, расщепленные и смешанные [1,42].

Многолетний опыт применения живых и инактивированных вакцин свидетельствует о том, что антигенное несоответствие вакцинных штаммов эпидемическим служит основной причиной низкой эффективности вакцинопрофилактики гриппа. Специфический иммунитет, вырабатываемый после вакцинации одним подтипом ВГА, слабо защищает от заражения другим подтипом [42].

Для лечения гриппа и других ОРВИ используются препараты, обладающие специфической противовирусной активностью [2], которые можно разделить на несколько групп:

1. блокаторы M2 ионного канала;
2. ингибиторы NA;
3. ингибиторы слияния;
4. интерфероны и их индукторы.

К первой группе препаратов относятся амантадин и римантадин. Они действуют на репликативный цикл вируса, блокируя его депротонизацию и исключая возможность выхода РНП из эндосомы. В настоящее время большинство циркулирующих ВГА являются устойчивыми к этим препаратам.

Ко второй группе относится препарат нового поколения озельтамивир, обладающий свойством ингибировать ферментативную активность NA. Озельтамивир блокирует способность фермента отщеплять остатки нейраминовой кислоты с поверхности инфицированной клетки, тем самым подавляя выход из нее новых вирионов. Лекарственное средство не влияет на репликацию вируса внутри клетки. К недостаткам ингибиторов NA относится их относительно высокая токсичность.

В России для лечения гриппа также применяют умифеновир, который предположительно способен взаимодействовать с NA, увеличивая его

стабильность к конформационным изменениям, индуцированным низким рН, и, как следствие, ингибировать процесс слияния липидной оболочки вируса с мембранами эндосом, приводящий к высвобождению вирусного нуклеокапсида и началу транскрипции вирусного генома [2,42].

Противовирусная активность вышеперечисленных препаратов обусловлена их взаимодействием с поверхностными белками ВГА. Учитывая индивидуальные особенности антигенной структуры каждого штамма вируса, можно утверждать, что эти лекарственные средства обладают выраженной специфичностью и направленностью действия. Обратной стороной высокой специфичности всех этиотропных химиопрепаратов является возможность формирования резистентности. Быстрое возникновение (через 1–2 пассажа) резистентных к амантадину и ремантадину штаммов было показано в многочисленных экспериментах на животных и в культуре клеток. Что касается ингибиторов NA, то к ним также вырабатывается устойчивость, ежегодно выделяют штаммы, у которых вследствие мутаций отсутствует чувствительность к ингибиторам NA [2].

Таким образом, развитие резистентности к противовирусным препаратам — одна из важнейших проблем противовирусной химиотерапии. Факты увеличения роста резистентных к какому-либо противовирусному препарату штаммов ставят под сомнение вопрос о целесообразности его применения для лечения и профилактики гриппа.

Помимо препаратов, обладающих специфической противовирусной активностью, в России в комплексное лечение гриппа включают иммуностропные лекарственные средства – интерфероны (ИФН) и их индукторы, обладающие комбинированным этиотропным и иммуномодулирующим эффектом. Универсальность антивирусного действия интерферонов объясняется подавлением репродукции вирусов на начальной фазе трансляции – синтезе вирус-специфических белков. Однако необходимо помнить о побочных эффектах ИФН и их индукторов. Наряду с противовирусной активностью ИФН обладает способностью подавлять пролиферацию клеток. Также часто назначаемые

препараты ИФН или их индукторов способствуют выработке провоспалительных цитокинов, провоцируя воспалительные процессы в организме. Это может привести к обострению хронических заболеваний или дебюту аутоиммунных процессов. С другой стороны, постоянная стимуляция иммунитета извне может привести к его снижению при отказе от индукторов ИФН [43].

В последнее время ведутся работы по разработке и изучению новых противогриппозных препаратов - ингибиторов более консервативных структурных белков ВГА. Например, наряду с белком NP вирусный полимеразный комплекс PA-PB1-PB2 рассматривается в качестве многообещающей мишени для новых противовирусных лекарственных средств. При этом на сегодня на рынке отсутствуют препараты, направленные на ингибирование полимеразы вируса гриппа [44]. Ингибитор вирусной полимеразы Т-705 (фавипиравир) [45] проходит в настоящее время 3 фазу клинических испытаний в ряде стран. Анализ устойчивости вирусов, выделенных от пациентов, показал, что развития устойчивости вируса гриппа к данному препарату пока не возникает [46]. Известны также низкомолекулярные ингибиторы полимеразы, действие которых направлено на разобщение взаимодействия в гетеротримере PA-PB1-PB2 [47,48].

Резюмируя, можно сказать, что существующие способы профилактики и лечения вирусной инфекции не всегда эффективны и безопасны. Это говорит о необходимости поиска новых средств лечения гриппа. Таким средством могут стать препараты, действующие по механизму РНК-интерференции.

1.2. РНК-интерференция

РНК-интерференция – это клеточный процесс посттранскрипционного подавления экспрессии генов при помощи малых двуцепочечных молекул РНК путём деградации целевой мРНК, ее деаденилирования, или блокировки трансляции соответствующего белка. Система РНК-интерференции очень консервативна у эукариот и играет важную роль в защите клеток от вирусов, паразитирующих генов (транспозонов), а также в регуляции развития, дифференцировки и экспрессии генов организма.

С момента относительно недавнего открытия этого явления [49] малые РНК использовались как посредники в экспериментальном сайленсинге генов без полного понимания тонкостей механизмов действия. За прошедшее время стало известно, что малые РНК бывают нескольких видов: miРНК, miРНК, piРНК и др. [50]. Общим для них является конечная биологически активная структура – двунитевые РНК (днРНК) длиной 21—25 нуклеотидов с двумя неспаренными выступающими нуклеотидами на 3'-концах. Такие днРНК обеспечивают поиск мРНК мишени в комплексе с белками семейства Argonaute (AGO) [51]. Основная функция miРНК состоит в регуляции экспрессии эндогенных генов и защите генома от экзогенных молекул нуклеиновых кислот.

Общая модель механизма РНК интерференции предполагает существование двух основных стадий: процессинга короткого дуплекса РНК из более длинных молекул предшественников (не предполагается для синтетических miРНК) и узнавание гомологичной мРНК в составе эффекторного комплекса RISC (от *англ.* RNA-induced silencing complex) (рисунок 1.3). Наличие РНК компонента необходимо для осуществления нуклеазной активности AGO, также входящего в состав RISC, который дополнительно инициирует расплетание нитей в РНК-дуплексе. Одна из нитей, называемая ведущей, остается ассоциированной с комплексом, другая нить - пассажирская, подвергается действию экзонуклеаз. RISC может влиять на экспрессию гена двумя способами, осуществляя деградацию мРНК или действуя на стадии блокировки трансляции. Полная деградация мРНК-мишени происходит при полной ее комплементарности к ведущей нити miРНК. При частичной комплементарности происходит репрессия трансляции за счет подавления присоединения фактора инициации трансляции (eIF) к 5'-кэпу, подавления присоединения рибосомной 60S-субъединицы, замедления элонгации и преждевременной терминации трансляции [52].

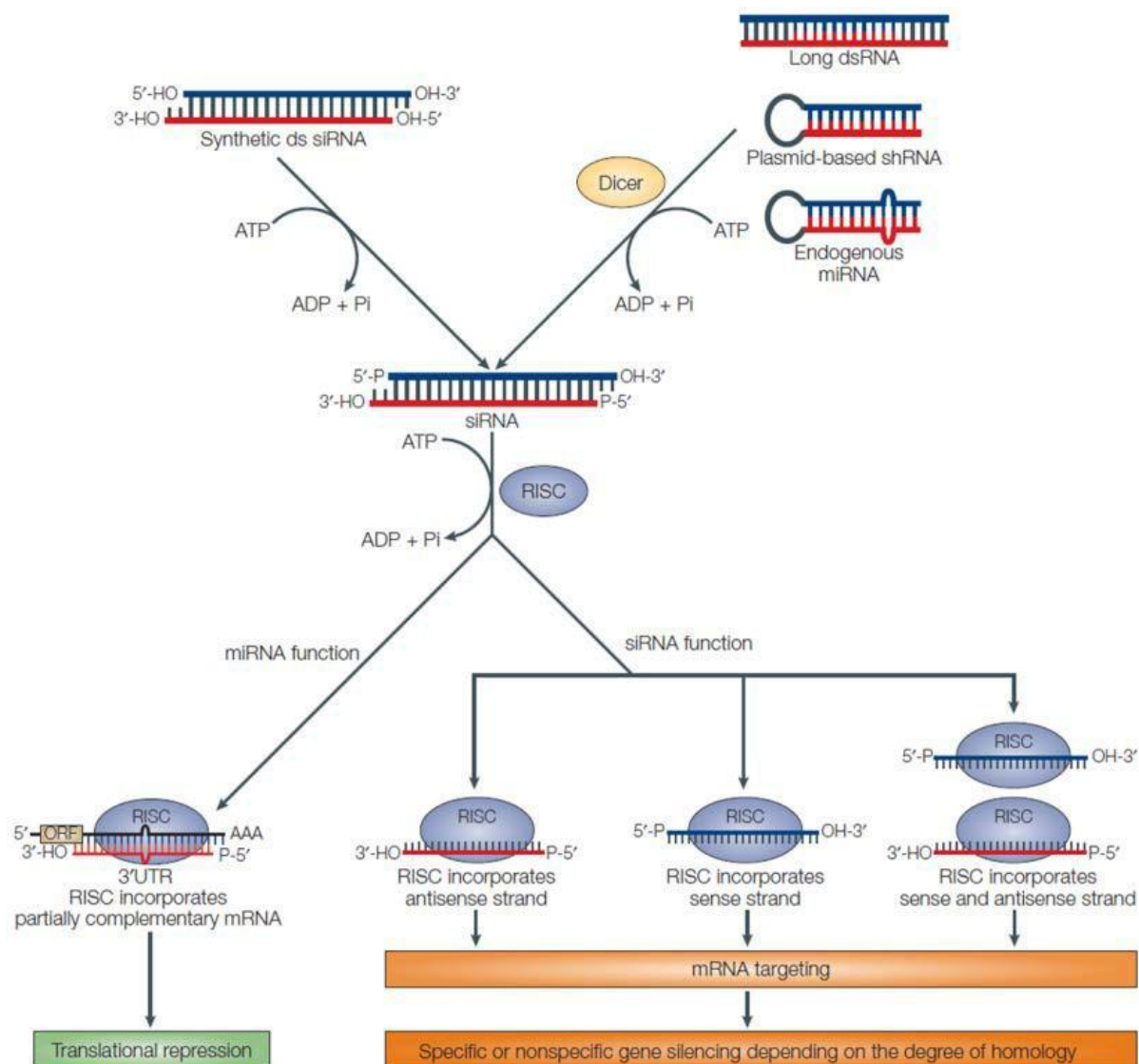


Рисунок 1.3 – Схема основных путей РНК-интерференции из Mittal (2004) [52].

1.2.1. Возможность применения РНК-интерференции в качестве противовирусной терапии.

1.2.1.1. Вирус-ингибирующая активность синтетических малых РНК.

Открытие явления РНК-интерференции подтолкнуло исследователей к идее использования этого механизма в целях контролируемого выключения экспрессии как эндогенных, так и экзогенных генов. В частности, представляется чрезвычайно перспективной идея создания противовирусных миРНК, блокирующих экспрессию вирусных генов, либо некоторых клеточных генов, участвующих в репликативном цикле вируса.

В 2001 году впервые было продемонстрировано, что химически синтезированные миРНК, будучи трансфецированными в культуру клеток млекопитающих, ведут себя как естественные клеточные миРНК и специфически разрушают комплементарные мРНК мишени [53]. Первые подтверждения того, что синтетические миРНК могут быть использованы в качестве противовирусных препаратов, появились также в 2001 году [8]. В этой работе было продемонстрировано ингибирование роста респираторно-синцитиального (РС) вируса при использовании миРНК, мишенями для которых являются вирусные мРНК, кодирующие вирусный фактор транскрипции, фосфопротеин Р и белок слияния F. В обоих случаях было продемонстрировано уменьшение содержания соответствующих мРНК и белков. Кроме того, было показано, что, в то время как мРНК РС-вируса были подвержены действию миРНК, вирусный геном оставался устойчив к ним. Это, вероятно, связано с тем, что вирусный геном, представленный (-)-РНК, покрыт нуклеопротеином NP и, таким образом, остается недоступным для связывания с миРНК [54]. В последующие годы подход, основанный на применении искусственно синтезированных миРНК, успешно применили на уровне научно-исследовательских работ против практически всех острых респираторных инфекций, включая грипп [10,55].

Противовирусные миРНК имеют ряд неоспоримых преимуществ перед традиционными препаратами:

- 1) Являются сильнодействующим противовирусным препаратом, обладающим как профилактическим, так и терапевтическим действием;
- 2) Обладают чрезвычайно высокой специфичностью;
- 3) В случае возникновения резистентности к препарату, новая модифицированная миРНК может быть подобрана и синтезирована в кратчайшие сроки (за несколько часов, что актуально при эпидемиях и пандемиях);
- 4) Могут быть использованы в комбинации с другими миРНК, что позволяет, например, предотвращать возможные варианты возникновения устойчивости к одной из миРНК, или использовать для «выключения» коинфицирующих вирусов или каких-либо клеточных мишеней;

5) При интраназальном способе введения миРНК не инвазивны и могут быть легко введены с помощью стандартных ручных ингаляторов;

б) Лиофилизированные препараты миРНК являются стабильными и могут транспортироваться без заморозки. При необходимости пациент просто добавляет воду (или соответствующий физиологический раствор), встряхивает и использует препарат как носовые капли или аэрозоль для ингалятора.

1.2.1.2. Применение миРНК для подавления вируса гриппа А.

На сегодняшний день созданы подходы к использованию терапии на основе РНК-интерференции против респираторных вирусных инфекций [22,55] вследствие того, что дыхательные пути и респираторные клетки являются быстрой и наиболее доступной мишенью как для вирусов, так и для противовирусных миРНК [56]. Исследования, направленные на изучение такого терапевтического подхода для блокирования репликации коронавируса, вируса гриппа, вируса парагриппа, РС-вируса, показали, что технология РНК-интерференции является эффективной и перспективной для борьбы с респираторными вирусами [57]. Однако, существует ряд препятствий для полноценного использования этой технологии *in vivo* и, в дальнейшем, в клинической практике [15,58]. Впервые успешное применение РНК-интерференции для подавления ВГА *in vitro* и *in vivo* было продемонстрировано Ge et al. в 2003 и 2004 годах [13,14]. Позже были подобраны и протестированы различные миРНК, направленные на подавление всех основных генов ВГА: *NP*, *PA*, *PB1*, *PB2*, *M*, *NS*, показавшие некоторый эффект в снижении репродукции вируса [10,57,59]. Подавление репликации ВГА с помощью миРНК, направленных на вирусные гены, неоднократно исследовалось экспериментально. Результаты основных исследований суммированы в таблице 1.2. Из приведённых в таблице данных очевидно, что эффективно функционирующие противогриппозные миРНК (или shРНК в несущих плазмидных конструкциях), как правило, направлены на консервативные вирусные гены, имеющие более низкую скорость мутаций, чем HA и NA. В результате такого выбора мишеней

для миРНК в ряде случаев удалось достичь ингибирования штаммов ВГА разных подтипов одними и теми же миРНК (см. таблицу 1.2).

В недавнем исследовании, используя миРНК против некодирующих областей генома ВГА, также удалось ингибировать репликацию нескольких штаммов различных подтипов ВГА. В этой и других работах было показано, что одна миРНК может обеспечить защиту от штаммов ВГА разных подтипов [37,38]. Относительно недавно компанией «siRNAomics» был разработан препарат STP702 многоцелевого действия, объединяющий в себе коктейль миРНК, направленных на различные консервативные области генома ВГА. Было показано, что STP702 эффективен против пандемических штаммов ВГА подтипов H5N1 и H1N1 [42].

Таблица 1.2 – Экспериментальное использование миРНК для подавления репликации вируса гриппа [10].

Экспериментальная модель	Ингибируемые штаммы ВГА	Система доставки миРНК	Мишени миРНК-интерференции	Ссылка
клетки 293Т, клетки ВНК	A/WSN/33 (H1N1) с нуклеотидной заменой валина на аланин в позиции 41 в ОРС М1	трансфекционный реагент Trans IT LT-1 + плазмидная ДНК, кодирующая shРНК	M2	[16]
клетки MDCK	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/WSN/33 (H1N1)	электропорация миРНК	NP, PA, PB1	[13]
клетки Vero	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)		NP	
куриные эмбрионы		трансфекционный реагент Oligofectamine + миРНК	NP, PA, PB1	
мышь	A/PuertoRico/8/34 (H1N1)	ПЭИ + миРНК (в.в. введение)	NP, PA	[14]
		ПЭИ+ плазмидная ДНК, кодирующая shРНК (в.в. введение)	NP	
		ПЭИ+ плазмидная ДНК, кодирующая shРНК (и.н. введение)	NP, PB1	
клетки Vero	лентивирусный вектор, кодирующий shРНК	NP		
мышь	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/Hong Kong/156/97 (H5N1), A/Netherlands/219/03 (H7N7), A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)	свободная миРНК (в.в. введение) с последующим и.н. введением трансфекционного реагента Oligofectamine + миРНК	NP, PA	[60]
клетки MDCK	A/WSN/33 (H1N1)	лентивирусный вектор, кодирующий shРНК	M1	[15]

Продолжение таблицы 1.2

мышь	A/PuertoRico/8/34 (H1N1)	деацетилованный ПЭИ+миРНК, (в.в. введение)	NP	[23]
клетки MDCK	A/chicken/Hubei/327/20 04 (H5N1), A/Duck/Hubei/W1/2004 (H9N2), A/Hubei/2003 (H1N1)	трансфекционный реагент Lipofectamine+ плазмидная ДНК, кодирующая shРНК	NP, M2	[61]
мышь		ПЭИ+ плазмидная ДНК, кодирующая shРНК (в.в. введение)		
клетки MDCK	A/chicken/Qinghaihu/72 6/2005 (H5N1)	трансфекционный реагент SuperFect + плазмидная ДНК, кодирующая shРНК	NP, PA, PB1	[62]
куриные эмбрионы		трансфекционный реагент Oligofectamine+ плазмидная ДНК, кодирующая shРНК		
мышь		плазмидная ДНК, кодирующая shРНК (в.в. введение)		
клетки CEF	A/Chicken/Henan/1/04 (H5N1)	трансфекционный реагент Lipofectamine + антисмысловые модифицированные 2'-О- метил с 3'-бутанол меткой РНК-олигонуклеотиды	NS1	[63]
цыплята		трансфекционный реагент Lipofectamine + антисмысловые модифицированные 2'-О- метил с 3'-бутанол меткой РНК-олигонуклеотиды (и.н. введение)		
клетки CH-SAN, клетки MDCK	A/turkey/Ontario/6118/6 8 (H8N4), A/turkey/Massachusetts/ 3740/65 (H6N2), A/duck/Czech/56 (H4N6), A/Quail/Italy/1117/65 (H10N8)	трансфекционный реагент Lipofectamine+ плазмидная ДНК, кодирующая кшРНК	NP, PA	[64]

Продолжение таблицы 1.2

клетки MDCK	A/New Caledonia/20/1999 (H1N1), A/Hong Kong/486/97 (H5N1)	трансфекционный реагент Lipofectamine + миРНК, лентивирусный вектор, кодирующий кшРНК	M2	[19]
клетки MDCK	A/ PuertoRico /8/34 (H1N1)	бакуловирусный вектор, кодирующий кшРНК	NP	[65]
клетки MDCK	A/Tiger/HarBin/01/2002 (H5N1)	трансфекционный реагент Lipofectamine+ плазмидная ДНК, кодирующая кшРНК	PA	[66]
мыши		ПЭИ+ плазмидная ДНК, кодирующая shРНК (в.в. введение)		
клетки MDCK	A/ PuertoRico /8/34 (H1N1)	трансфекционный реагент Lipofectamine+ плазмидная ДНК, кодирующая shРНК	PB1	[67]
куриные эмбрионы		трансфекционный реагент Lipofectamine+ плазмидная ДНК, кодирующая shРНК (в.в. введение)		
мыши		ПЭИ + миРНК (в.в. введение с последующим и.н. введением)		
мыши	A/ PuertoRico /8/34 (H1N1)	ПЭИ + миРНК (в.в. введение с последующим и.н. введением)	NS1	[68]
клетки MDCK	A/Chicken/Thailand/VSMU-3-BKK/2004 (H5N1), A/Openbillstork/Thailand/VSMU-5-NSN/2004 (H5N1)	Катионные ПЭГилированные иммунолипосомы + миРНК	NP	[69]
клетки HD11	A/ Puerto Rico/8/34 (H1N1)	трансфекционный реагент Lipofectamine + миРНК, АВА-21/117Q полимер + миРНК	PB1	[70]
куриные эмбрионы		АВА-21/117Q полимер + миРНК		

Продолжение таблицы 1.2

клетки MDCK	A/ PuertoRico /8/34 (H1N1)	трансфекционный реагент TransPass HeLa + плазмидная ДНК, кодирующая кшРНК	NS1, NS2	[18]
мышы		трансфекционный реагент TransPass HeLa + плазмидная ДНК, кодирующая shРНК (в.в. введение)		
клетки MDCK	A/turkey/Italy/2676/2000 (H7N1), A/swine/Italy/1521/1998 (H1N2), A/swine/Italy/1523/1998 (H3N2), A/swine/Italy/1513/1998 (H1N1), A/swine/Italy/437/1976 (H1N1)	трансфекционный реагент Effectene + плазмидная ДНК, кодирующая shРНК	NP	[71]
клетки MDCK	A/chicken/Navapur/7972/2006 (H5N1)	трансфекционный реагент Xtreme Gene Transfectant + миРНК	NP, PB2	[72]
клетки MDCK, клетки A549	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	pH-зависимые пептиды + миРНК	NP	[73]
клетки MDCK	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	лентивирусный вектор, кодирующий shРНК	NP, PB1	[74]
клетки MDCK	A/WS/33(H1N1)	трансфекционный реагент Lipofectamine + миРНК	M1, M2, NS1, NS2	[75]
клетки LMH	A/chicken/Texas/473-2/2010(H6N2), A/turkey/Colorado/235497/2003(H8N4)	плазмидная ДНК, кодирующая shРНК, трансформированная в <i>E. coli</i> бактериальный вектор tkRNAi	NP, PA	[76]
A549 клетки	A/WSN/33 (H1N1), A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	лентивирусный вектор, кодирующий shРНК	NA	[77]
Трансгенные мышы, экспрессирующее shРНК				

Основным препятствием, затрудняющим трансляцию миРНК-технологии в клиническую практику терапии гриппа, является отсутствие эффективных и безопасных систем доставки миРНК, которые одновременно соответствовали бы целому ряду необходимых требований: высокая эффективность доставки миРНК в клетки респираторного эпителия, защита миРНК от нуклеаз во внеклеточной среде, низкая токсичность, отсутствие иммуногенности, эффективная биodeградируемость и выведение из организма, в случае системного введения – способность преодолевать ряд тканевых барьеров (эндотелий, базальные мембраны, тканевые макрофаги), в случае эндоцитозного поглощения эпителиальными клетками – способность к выходу из эндосомы. В настоящее время предложено несколько экспериментальных платформ доставки миРНК, основными из которых являются липосомы, вирусные векторы, поликатионные носители, пептиды, микро- и наночастицы [78–80]. Все перечисленные выше подходы к доставке миРНК были использованы в экспериментах по исследованию миРНК как средства борьбы с вирусом гриппа (см. таблицу 1.2). Тем не менее, несмотря на ряд опубликованных положительных результатов, вопрос выбора оптимальной стратегии доставки миРНК для терапии гриппа не может считаться решённым на сегодняшний день.

1.2.1.3. Подбор и дизайн противогриппозных терапевтических миРНК

Эмпирически были определены некоторые факторы при дизайне миРНК, влияющие на финальную эффективность и специфичность РНК-интерференции как благоприятствуя ей, так и наоборот [53,81–83]. Кратко, к числу важнейших факторов при рациональном дизайне миРНК относятся:

- расположение области узнавания для миРНК в ингибируемой мРНК (предпочтительная локализация в открытой рамке считывания целевого гена между 50 и 100 нуклеотидами по направлению считывания от старт кодона),
- несовпадения нуклеотидных пар в последовательностях нитей миРНК (несовпадение нуклеотида в 5'-области или в центральной части миРНК приводит к большей утрате ее функциональности, чем несовпадение в 3'-области),

- присутствие определённых нуклеотидных мотивов, таких как UCU и ACGA (5'→3'),

- большая термодинамическая нестабильность 5'-конца антисмысловой нити, обеспечивающая ее вхождение в RISC.

К числу негативных факторов, ухудшающих функциональность миРНК, относятся высокое содержание GC пар в составе дуплекса; присутствие палиндромов в последовательности миРНК, повышающих вероятность формирования шпилечных структур; характерные вторичные шпилечные структуры целевой ингибируемой мРНК, затрудняющие ее ассоциацию с комплексом RISC; длина миРНК-дуплекса более 23 нуклеотидных пар и присутствие в последовательности миРНК мотива 5'-UGUGU-3', который может стимулировать ИФН ответ; ингибирование экспрессии нецелевых генов в случае комплементарности миРНК по механизмам, аналогичным действию miРНК. В дополнение к названным факторам, эффективность и специфичность действия миРНК существенно повышается при использовании одновременно нескольких миРНК к разным участкам целевого гена.

За последние годы были разработаны различные алгоритмы подбора целевых миРНК, учитывающие перечисленные выше требования к их дизайну [84]. Существует целый ряд интернет-ресурсов, предназначенных для подбора миРНК [85,86]. В настоящее время доступны коммерческие библиотеки валидированных миРНК, позволяющих проводить различные высокопроизводительные функциональные исследования на основе нокдаунов индивидуальных генов с их помощью. В частности, РНКi-скрининг был неоднократно использован для выявления клеточных белков, вовлечённых в репликацию вирусов [87,88]. В целом, как для клеточных, так и вирусных генов были сформулированы биоинформационные алгоритмы подбора наиболее эффективно действующих миРНК [81–83].

В силу небольшого размера генома ВГА практически все сегменты вРНК кодируют белки, играющие существенную роль в репликации. Теоретически, «выключение» каждого вирусного гена должно приводить к ингибированию

размножения ВГА. Однако в силу большой скорости мутаций в геноме ВГА, вызванной отсутствием корректорской активности у RdRp, а также возможностью реассортации геномных сегментов, при подборе противовирусных миРНК следует учитывать следующие особенности:

1) вРНК ВГА в цитоплазме покрыта белком NP, поэтому миРНК должна преимущественно иметь мишень в виде мРНК, но не геномной РНК;

2) Для того, чтобы снизить риск возникновения устойчивости к действию миРНК вследствие возникающих в вирусном геноме мутаций, необходимо выбирать наиболее консервативные мРНК ВГА, кодирующие такие белки как NP, М, NS1 или субъединицы PA, PB1 и PB2 вирусной полимеразы;

3) Механизм РНК-интерференции специфичен, однако абсолютная комплементарность ведущей нити миРНК и мРНК мишени не является обязательной. В связи с этим миРНК теоретически могут сохранять свою активность даже в случае возникновения единичных мутаций в мишенных областях вирусной мРНК.

Несмотря на наличие в жизненном цикле ВГА многих специфических компонентов и этапов, не имеющих клеточных аналогов, в настоящее время в качестве лекарственных мишеней используются лишь два белка – М2 и NA. Для ингибирования ВГА с использованием противовирусных миРНК наиболее эффективным видится использование мРНК, кодирующих NP и субъединицы RdRp, непосредственно образующие структуру вирусного РНП. Гены, кодирующие поверхностные гликопротеины NA и HA, обладают высокой степенью мутационной изменчивости и плохо подходят для использования в качестве мишеней.

NP является ключевым структурным компонентом упаковки вРНК, что делает его очевидной и первоочередной мишенью для подавления репродукции ВГА по механизму РНК-интерференции. Кроме того, NP связывается с RdRp и несколькими клеточными белками, включая актин и компоненты системы ядерного импорта и экспорта [89], что также является критическим для эффективной репликации ВГА. Наиболее критичные и специфические для

вирусного жизненного цикла процессы развиваются в ядре зараженной клетки с участием вирусного полимеразного комплекса, представляющего собой сложную тримерную структуру, состоящую из субъединиц PB2, PB1 и PA, и обладающую высокой конформационной лабильностью и способностью к регуляции в зависимости от связываемого лиганда. В клеточном ядре, в первую очередь, запускается процесс транскрипции для формирования мРНК и дальнейшей трансляции вирусных белков. По мере накопления вирусных белков полимеразы переключается с транскрипции вирусной РНК на репликацию, т.е. на синтез полноразмерных кРНК, которые служат интермедиатами для амплификации вирусного генома с образованием дочерних вирусных (-)-нитей РНК, которые экспортируются из ядра и упаковываются в почкующийся вирион. Отличительной особенностью всех мРНК является наличие 5'-кэпа, защищающего мРНК от 5'-экзорибонуклеаз, управляющего сплайсингом и ядерным транспортом мРНК, обеспечивающего эффективное распознавание фактором трансляции eIF4E. Кроме того, мРНК, не содержащие кэпа, могут распознаваться клеткой как чужеродные, что приводит к активации системы врожденного иммунитета и деградации подобных структур. ВГА использует кэп структуру клеточных мРНК как праймер для синтеза собственных транскриптов, при этом реализуется эндонуклеазная активность полимеразного комплекса, клеточные пре-мРНК гидролизуются с образованием коротких кэп-содержащих праймеров [90]. Исходя из всего вышеизложенного ясно, что эндонуклеазная активность является принципиально важной для вирусной репродукции. В ходе структурных исследований были получены убедительные доказательства ведущей роли в этом процессе субъединицы PA. Ингибирование экспрессии PA на уровне мРНК должно приводить к необратимому угнетению продукции вирусных мРНК и, как следствие, вирусных белков, а значит и всех дальнейших этапов вирусной репродукции. Таким образом, мРНК, кодирующие NP и PA, могут рассматриваться как наиболее перспективные мишени для подавления экспрессии с использованием механизма РНК-интерференции.

1.3. Доставка миРНК в клетку

Одним из главных факторов, ограничивающих терапевтическое применение миРНК, является её доставка в клетки. В силу физико-химических свойств (отрицательный заряд, большой молекулярный вес и размер) миРНК имеют трудности с преодолением биологических барьеров, которые необходимо пройти для проявления своей активности. Если говорить о местном применении (интраназально, интратрахеально, интравитреально), то такими барьерами являются межклеточный матрикс, клеточная мембрана и мембрана эндосом [91].

На первом этапе миРНК диффундируют в состоящий из полисахаридов и фибрильных белков межклеточный матрикс, выполняющий структурную функцию. Плотная структура матрикса препятствует диффузии больших молекул, может замедлить или остановить их доставку. Кроме того, на диффузию может влиять заряд доставляющих комплексов (нейтральные частицы диффундируют быстрее, чем заряженные). Из межклеточного матрикса миРНК транспортируется через клеточную мембрану, чтобы попасть в цитоплазму и проявить свою активность. «Голая» миРНК, несущая отрицательный заряд, не может просто пройти через отрицательно заряженную клеточную мембрану. Попадание комплексов миРНК в клетки осуществляется в основном эндоцитозом, в течение которого важным шагом является высвобождение миРНК из эндосом в цитоплазму. Если комплекс с миРНК не может покинуть эндосому, он будет подвергнут дальнейшему разрушению в лизосомах. Последним этапом внутриклеточной доставки миРНК является отсоединение миРНК от носителя.

Способы доставки можно поделить на две группы: невирусную доставку химически синтезированных миРНК и вирусную доставку shРНК («short hairpin» - шпилька предшественник, для дальнейшего процессинга миРНК, образующая при трансляции с экспрессионной плазмиды).

1.3.1. Доставка миРНК в клетку вирусными системами

Вирусная доставка предполагает включение короткой РНК, образующей shРНК шпильки, в клетку с помощью вирусного вектора [54]. shРНК – это короткие молекулы рибонуклеиновых кислот, образующие во вторичной

структуре плотные шпильки. shРНК вводят в клетки при помощи векторов, в которых кодирующие их последовательности (рисунок 1.4) находятся под контролем конститутивно активных (таких как U6) или индуцируемых промоторов. Такие векторы, как правило, содержат последовательности нуклеотидов, которые позволяют им интегрироваться в геном клетки и тем самым обеспечивать наследуемое подавление экспрессии целевого гена. shРНК транскрибируются РНК-полимеразой III. После завершения транскрипции малые РНК, образующие шпильки, разрезаются клеточными ферментами с образованием миРНК, которые запускают механизм РНК-интерференции.

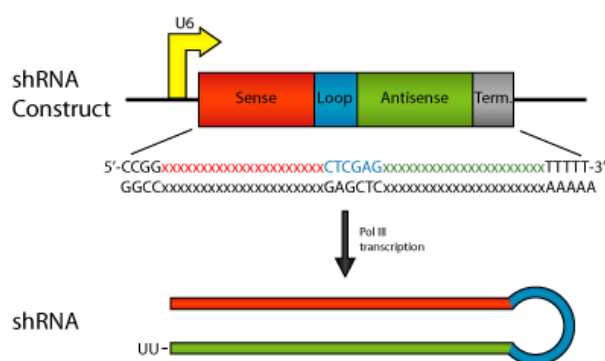


Рисунок 1.4 – Конструкция shRNA [54]

Использование вирусов в качестве векторов для доставки молекул нуклеиновых кислот является одной из основ генной терапии. Достоинства такой системы заключаются в длительной экспрессии трансгена и избирательностью доставки генетического материала в строго определенные ткани и клетки.

Однако вирусные векторы имеют ряд недостатков:

- Вирусные векторы часто индуцируют иммунный ответ, что может затруднить проведение повторных курсов лечения.
- Встраивание экспрессирующихся фрагментов в геном может привести к нарушению регуляторных элементов различных генов.
- Размер генетических конструкций, которые могут быть включены в геном вирусов, ограничен.

- Стоимость «сборки» некоторых вирусных векторов может быть очень высокой, что приведет к ограничениям в создании и применении лекарственных препаратов на их основе.

На данный момент широко используются в основном 3 вида вирусных векторов: ретровирусные вектора, аденовирусные вектора и вектора, основанные на аденоассоциированных вирусах (ААВ). В таблице 1.3 рассмотрены основные достоинства и недостатки всех трёх типов вирусных векторов.

Таблица 1.3 – Обзор основных характеристик вирусных векторов

	Ретро вирусные	- Аденовирусные	Адено ассоциированные
Трансдукция в непродифференцируемых клетках	Онко- ретровирусы – нет Лентивирусы - да	да	да
Геномная интеграция	да	нет	нет (или ограниченная)
Потенциальный риск	Инсерционный мутагенез	Иммунная реакция, цитотоксичность	Цитотоксичность

1.3.2. Невирусная доставка миРНК в клетку

Альтернативой переносу генетического материала в клетки с помощью вирусных векторов является использование невирусных носителей. Они обладают меньшей токсичностью, в большинстве случаев не вызывают специфического иммунного ответа, менее трудоемки в получении, удобны в хранении. Невирусные средства доставки миРНК представляют собой комплексы миРНК с положительно заряженным агентом доставки (катионные белки, катионные полимеры и дендримеры, катионные липиды), конъюгаты миРНК с малыми молекулами (холестерол, желчные кислоты и липиды), полимерами, антителами и

РНК, в микро- и наночастицы для упаковки миРНК. Выбор носителя зависит от свойств миРНК, типа целевых клеток, способа доставки в *in vivo* системах [92,93].

1.3.2.1. Липосомальная доставка миРНК

Липидные носители включают в себя липосомы, мицеллы, микроэмульсии и твердые липидные наночастицы. Липосомы – это глобулярные пузырьки, образованные одним или несколькими бислоями фосфолипидов (рисунок 1.5). Липосомы являются биосовместимыми и биоразлагаемыми, но могут проявлять токсичность как *in vivo* так и *in vitro*. Однако, благодаря относительной простоте и хорошо известным свойствам липосомы очень популярны как носители миРНК [91,92].

Нейтральные липосомы обладают меньшей цитотоксичностью и иммуногенностью, их получают из диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE), 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DSPC), фосфатидилхолина (PC) и других нейтральных липидов. Несмотря на нейтральный заряд, 1,2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DOPC) может инкапсулировать до 65% миРНК.

Комплексы на основе катионных липидов и нуклеиновых кислот называют липоплексами. Катионные липиды спонтанно формируют многослойные структуры с анионной миРНК при перемешивании. Формирование таких липоплексов защищает миРНК от деградации, способствует эндоцитозу, усиливает выход миРНК из эндосом и аккумулирует ее в цитозоле.

Катионные липиды состоят из 3 частей: катионная головка, липофильный хвост и соединяющий линкер. Катионная головка может включать четвертичные аммониевые соли липидов, липоамины, комбинацию липоаминов и четвертичных аминов, и амидные соли липидов. Липофильный хвост состоит из насыщенных или ненасыщенных алкильных цепей (12-18 углеродов) или холестериновых групп. Линкеры – это эфиры, сложные эфиры, амиды или карбаматы. Структура этих частей влияет на эффективность трансфекции и токсичность носителя.

Обычно липоплексы окружены полиэтиленгликолем для достижения длительной циркуляции в кровяном потоке и уменьшения токсичности. Также

добавляют липиды, сливающиеся с мембраной эндосом, для улучшения высвобождения миРНК из них.

Кроме того, миРНК инкапсулируют в стабильные частицы нуклеиновая кислота-липид (stable nucleic acid lipid particles – SNALP). SNALP – это полимерные наночастицы (100 нм), состоящие из ионизируемых катионных липидов, липидов с высокой температурой фазового перехода и ПЭГилированных липидов (рисунок 1.5). Сложноорганизованные SNALP характеризуются пролонгированным временем циркуляции в кровотоке и большими возможностями модификации, что позволяет решать различные задачи при доставке миРНК [94].

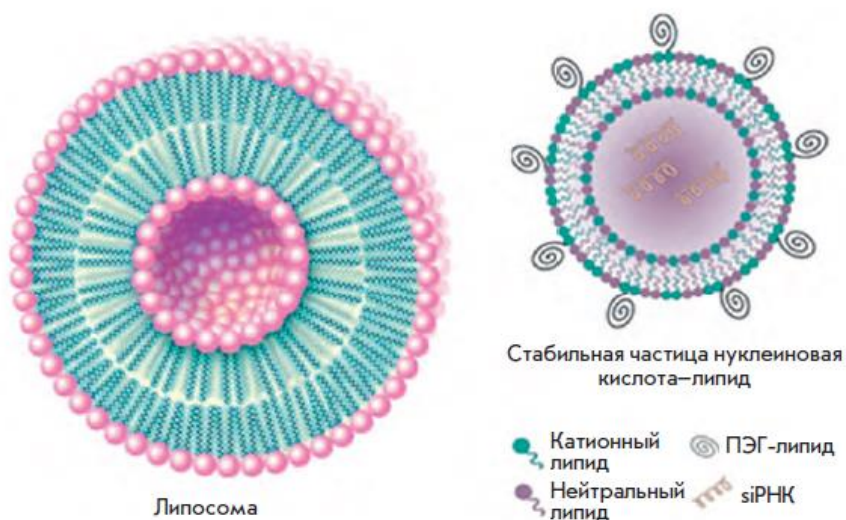


Рисунок 1.5 – Схематическое изображение липосом и SNALP [94]

Наиболее эффективным катионным липидным носителем считается липофектамин (Lipofectamine), который представляет собой катионные липиды с включениями нейтральных ко-липидов (липидов-хелперов), содействующих слиянию положительно заряженного липоплекса и отрицательно заряженной клеточной мембраны [95]. Он применяется для широкого спектра клеточных линий в качестве универсального трансфецирующего реагента miРНК, miРНК и плазмид в клетки млекопитающих. Препарат характеризуется высоким уровнем экспрессии рекомбинантного белка в трансфецированных плазмидой клетках, и

для некоторых клеточных линий эффективность трансфекции достигает 99% [91,96,97].

1.3.2.2. Полиплексная доставка миРНК

Полиплексы – это комплексы между положительно заряженными полимерами и отрицательно заряженными фосфатными группами нуклеиновой кислоты, образованные через электростатические взаимодействия. Основное преимущество полимеров – их структурная гибкость, которая позволяет легко изменять физико-химические характеристики системы доставки. Молекулярная масса, плотность заряда, растворимость и гидрофобность могут быть подобраны в соответствии с условиями исследования. Для обеспечения стабильности полиплекса и защиты миРНК от действия нуклеаз клетки поликатионы в его составе должны находиться в избытке, что и приведет к образованию положительно заряженных, растворимых в воде комплексов [93].

Катионные полимеры с высокой плотностью заряда содействуют высвобождению миРНК из эндосом. После проникновения в клетку молекулы миРНК обнаруживаются в составе ранних эндосом. Благодаря работе вакуолярной H^+ -АТФ-азы происходит закисление среды ранних эндосом (снижение рН до 5-6), в результате чего они преобразуются в поздние эндосомы. Затем происходит слияние поздних эндосом с лизосомами, которые имеют еще более низкие значения рН (около 4.5) и содержат нуклеазы, расщепляющие миРНК. Чтобы избежать деградации в лизосомах, молекулы миРНК должны выйти из эндосомы в цитозоль. Выход из эндосомы является лимитирующим этапом процесса РНК-интерференции. Эффективная доставка миРНК с помощью различных катионных полимеров обусловлена большой буферной емкостью этих соединений (за счет непротонированных вторичных и третичных аминов) в диапазоне рН от 5 до 7. Предполагают, что такие полимеры предотвращают закисление среды эндосомы, выступая в качестве протонных губок. При этом происходит увеличение притока протонов за счет активации вакуолярной H^+ -АТФ-азы, сопровождаемое накоплением анионов хлора Cl^- , а также повышение

осмотического давления. Это приводит к осмотическому набуханию и распаду эндосомы [93] (Рисунок 1.6).

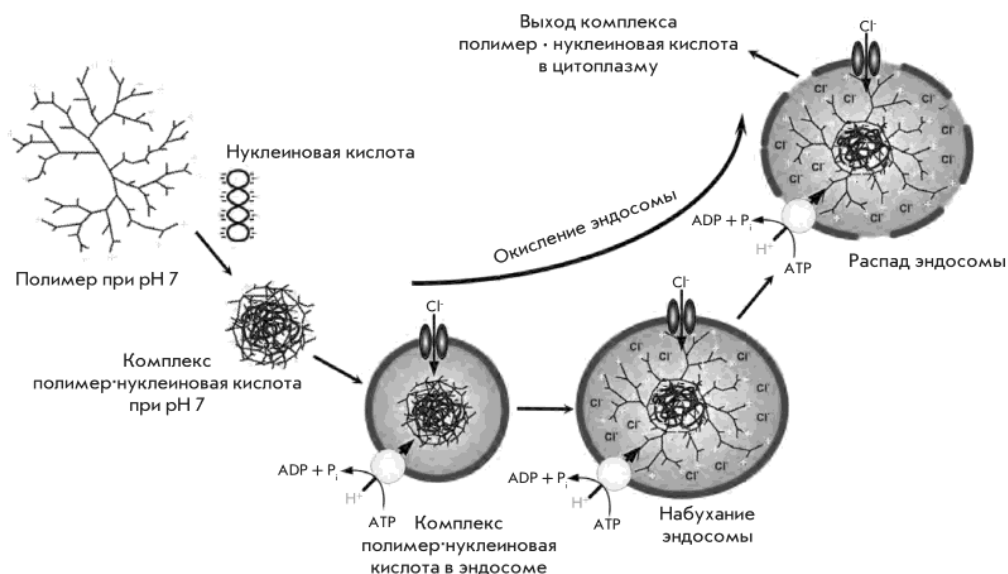


Рисунок 1.6 – Изображение, иллюстрирующее гипотезу протонной губки и эффекта зонтика [92].

Также предложена гипотеза об эффекте зонтика (Рисунок 1.6), которая описывает способность полимеров к объемному расширению при pH 5-6. Избыток протонов в эндосомах приводит к протонированию третичных аминов внутренней части полимера, электростатическому отталкиванию соседних заряженных аминогрупп и переходу комплекса из свернутого состояния в разветвленное [98].

В качестве трансфекционных агентов на данный момент используются как синтетические (полиэтиленимин, полиэтиленгликоль, полимер молочной и гликолевой кислот, полилизины, полиаргинины, дендримеры), так и природные полимеры (циклодекстрины, хитозан, ателоколлаген).

1.3.2.2.1. Полиэтиленимин

Полиэтиленимин широко используется для доставки олигонуклеотидов *in vitro* и *in vivo*. Получают полиэтиленимин полимеризацией этиленимина - азотсодержащего гетероциклического соединения, относящегося к циклическим аминам.

Для доставки миРНК чаще используют высокомолекулярный полиэтиленимин (25 кДа) [99]. Высокая плотность заряда полимера обуславливает прочную связь полиэтиленимина с миРНК и обеспечивает ее эффективную защиту от ферментативного расщепления. Однако высокая цитотоксичность и ограниченная биodeградация этого полимера создают препятствия для его использования в терапии [100]. Низкомолекулярный полиэтиленимин (<2 кДа) менее токсичен, но и эффективность доставки миРНК в клетки при этом ниже.

Другим фактором, влияющим на эффективность доставки и токсичность полиэтиленимина, является степень разветвленности структуры полимера. Разветвленный полиэтиленимин содержит первичные, вторичные и третичные амины в соотношении 1:2:1, тогда как линейный полиэтиленимин состоит только из вторичных аминов, за исключением концевых первичных аминов. Разветвленный полимер превосходит линейный по эффективности доставки нуклеиновых кислот [92].

По имеющимся данным, полиэтиленимин увеличивает проницаемость мембраны клетки путем создания в ней временных наноотверстий. Такое дестабилизирующее действие на мембраны может быть причиной цитотоксичности.

1.3.2.2. Хитозан

Хитозан — природный полисахарид, состоящий из случайно-связанных β-(1-4)-D-глюкозаминовых звеньев и N-ацетил-D-глюкозамина. Получают этот полисахарид путём частичного N-деацетилирования хитина концентрированным раствором щелочи. Хитин содержится в панцирях ракообразных, в наружном скелете зоопланктона, клеточных стенках дрожжей и грибов.

При низких значениях pH фосфатные группы нуклеиновой кислоты взаимодействуют с аминогруппами хитозана, в результате чего образуется полиплекс, где нуклеиновая кислота защищена от действия нуклеаз клетки.

Хитозан практически нетоксичен для млекопитающих. Размер комплексов хитозан-миРНК не превышает 200 нм, что является преимуществом при доставке

in vivo. Другими достоинствами хитозана являются мукоадгезивность, биосовместимость, биодegradация и низкая стоимость производства [93].

Использование хитозана в качестве невирусного вектора было запатентовано в 1997 году Murper и соавт [101].

Для доставки миРНК хитозан был впервые использован Katas и Alpar в 2006 году [102], после чего применялся в ряде исследований, проявив себя как эффективный трансфекционный агент [103,104], в том числе опубликованы материалы успешного применения хитозана при доставке миРНК в эпителиальные клетки бронхоиол EGFP-трансгенных мышей [105].

1.3.2.3. Доставка миРНК с помощью микро-/наноконтейнеров

В последние десятилетие микро- и наноконтейнеры на основе природных биосовместимых полиэлектролитов (пептидов, полимеров и полисахаридов), с их последующей модификацией различными неорганическими матрицами и наночастицами, также нашли широкое применение в качестве транспортных систем для доставки различных биологически активных соединений.

Хотя технология получения полиэлектролитных нано- и микрокапсул с использованием «layer-by-layer» метода известна уже достаточно давно, применение таких капсул для доставки биологически активных соединений до сих пор остается актуальным в виду ряда преимуществ капсул по сравнению с имеющимися аналогами: они обладают низкой токсичностью, высокой способностью к интернализации во многих клеточных популяциях, возможностью направленного изменения структуры поверхности капсулы при помощи присоединения молекул-лигандов к избранным биологическим мишеням (наночастицы магнитита, золота, силикатные наночастицы, другие биологические лиганды) [106].

Гибридные полиэлектролитные нано- и микрокапсулы позволяют эффективно транспортировать терапевтический агент и контролировать время и место его высвобождения в ответ на физические (ультразвук, свет) и химические воздействия. Кроме того, уникальность применения капсул связана с возможностью их функционализации путём присоединения дополнительных

наноструктур (неорганические наночастицы, антитела, флуорофоры и т.д.), а также с применением химических технологий «золь-гель» и «слой-за-слоем». Комбинация этих технологий позволяет создавать гибридные нано- и микроконтейнеры с новыми физико-химическими свойствами, передавая им мультифункциональность и способность инкапсулировать сразу несколько терапевтически релевантных соединений [107].

Функционализация нано- и микрокапсул приводит к созданию так называемых «интеллектуальных» систем, восприимчивых к ряду сигналов активации, увеличению степени биосовместимости с нормальными клетками и средами человека, а также использованию отдельных клеточных типов популяций в качестве переносчиков лекарственных форм [108,109]. Как показано в ряде работ [107,110,111], модификация полиэлектролитных капсул различными наноструктурными объектами и биоактивными лигандами делает их чувствительными к различным видам физических (лазерное излучение, ультразвук, температура) и химических воздействий (рН среда, ферментативное разложение). Воздействуя различными физическими и химическими «триггерами», мы можем контролировать скорость высвобождения биологически активных соединений из капсулы.

Среди российских научных групп можно выделить научную группу проф. Д.А. Горина (Саратовский Государственный Университет), в которой научный коллектив достиг наибольшего прогресса в области функционализации капсул. Международные научные группы во главе Frank Caruso, Gleb Sukhorukov, Wolfgang Parak и т.д. также достигли значительного прогресса в области функционализации нано- и микрокапсул. К примеру, синтезированы магнито-управляемые микрокапсулы, за счет модификации полиэлектролитных слоев магнитными наночастицами. Было опубликовано множество работ по созданию капсул, как универсальных носителей противоопухолевых препаратов и биологически активных белков [112–114]. Однако работ по доставке генетического материала, в частности мРНК, чрезвычайно мало или они отсутствуют вовсе.

Полиэлектролитные капсулы имеют один существенный недостаток, связанный с их высокой проницаемостью и неспособностью «удерживать» вещества с низкой молекулярной массой. Учитывая, что многие коммерчески доступные противоопухолевые и противобактериальные препараты имеют низкую молекулярную массу, их «хранение» в полиэлектролитных капсулах может быть весьма затруднительно [26].

Сравнительно недавно в 2015-2016 гг. была разработана уникальная методика функционализации полиэлектролитных капсул с использованием золь-гель метода. Было показано, что золь-гель функционализация полиэлектролитных капсул приводит к изменению их физико-химических характеристик, уменьшая их проницаемость с сохранением биологической активности инкапсулированных лекарственных препаратов [115,116]. Такая модификация дает большой потенциал для инкапсулирования относительно небольших молекул, таких как миРНК. На сегодняшний день установлено, что получение таких гибридных капсул позволяет эффективно инкапсулировать миРНК без потери их биологической активности [25]. Золь-гель модифицированные капсулы обладают рядом преимуществ по сравнению с липосомами. Важными преимуществами таких систем доставки являются транзитный характер трансфекции, возможность совмещения различных компонентов в одной капсуле, возможность дозирования различных компонентов, возможность визуализации и сортировки трансфицированных клеток (используя включения различных неорганических, например, магнитных частиц), биodeградируемость, возможность целевой доставки в интересующие ткани и органы для работ *in vivo*.

В заключении, можно сказать, что оптимальная платформа для доставки терапевтических миРНК должна отвечать следующим критериям:

- иметь низкую токсичность;
- не являться иммуногенной;
- осуществлять доставку с высокой эффективностью как *in vitro*, так и *in vivo*;

- с высокой степенью эффективности интернализироваться клетками-мишенями;
- иметь эффективный механизм высвобождения функционального содержимого в цитозоль клеток-мишеней;
- иметь механизмы предотвращения деградации биологически активных соединений эндосомальными факторами и/или нуклеазами и протеазами;
- иметь простую технологию синтеза, совместимую с упаковкой лиофилизированных или растворенных в водной среде миРНК в достаточно больших количествах.
- иметь высокую специфичность к клеткам-мишеням, что особенно важно для доставки *in vivo*,
- обладать широкими возможностями для различных модификаций без изменения ключевой технологии их синтеза, прежде всего для обеспечения возможности "переориентирования" системы доставки для разных потенциальных клеток-мишеней, тканей и органов.

В настоящий момент не существует систем доставки миРНК, отвечающих хотя бы большинству из перечисленных критериев. Все имеющиеся платформы обладают многочисленными недостатками. В тоже время, создание систем доставки на основе искусственно синтезируемых микро- и наноносителей является одним из наиболее перспективных направлений в связи с широкими возможностями по их дизайну, химическому составу, физико-химическим свойствам, возможностям масштабирования их синтеза и т.д. Подобные публикации стали появляться лишь в последние 1-2 года, и это направление является крайне актуальным.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы. В работе использовали штаммы вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1), A/Aichi/2/68 (H3N2), A/California/7/09 (H1N1)pdm09, A/mallard/Pensilvania/10218/84 (H5N2), A/Anhui/1/13 (H7N9), B/Malaysia/2506/2004, полученные из коллекции вирусов ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

Клеточные линии. Культуры клеток Мадин-Дарби почки собаки (MDCK) и эпителия легких человека (A549) получены из коллекции клеток ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

Системы доставки миРНК. В работе использовали полиэтиленимин (ПЭИ), метилгликоль хитозан (МГХ), олиголактат хитозана (ОЛХ), гидрохлорид хитозана (ГХХ) (все – Sigma Aldrich, кат. № 408727, M3150, 523682, Y0000104); липофектамин Lipofectamine®2000 (ЛФ) и LipofectamineRNAiMax® (ЛФ-RNAi) (все – Invitrogen, кат. № 11668-019, 13778150); кватернизованный хитозан (КХ), полученный в Институте Нефтехимического Синтеза им. А.В. Топчиева РАН [117].

Гибридные микрокапсулы, пустые и с упакованной миРНК были синтезированы и охарактеризованы по опубликованной методике [25], в лаборатории микрокапсулирования и управляемой доставки биологически активных соединений RASA-центра, (Политехнический Университет Петра Великого, Санкт-Петербург).

миРНК. Все РНК нуклеотиды были синтезированы “ДНК-синтез” (Москва, Россия), последовательности приведены в таблице 3.1. в пункте 3.1.; в РНК-олигонуклеотиды NP-1496-1/2(dTdT), 2'-гидроксильная группа была заменена на 2'-О-метильную группу в каждом нуклеотидном остатке, РНК-олигонуклеотид с флуоресцентной меткой RA-1630-FAM, содержащий карбоксифлуоресцеин (FAM) на 3'-конце. Олигонуклеотиды были растворены в $depcH_2O$ (100 мкМ), разаликвочены и хранились при температуре $-20^{\circ}C$. Для эксперимента необходимое количество одноцепочечных комплементарных олигонуклеотидов

смешивали и отжигали, нагревая при 95°C в течение 5 минут, затем гибридизовали, медленно понижая температуру на 1°C каждые 30 секунд до 35°C, затем на 1°C каждую 1 минуту до 5°C. Полученные РНК-дуплексы были проанализированы методом электрофореза в 15%-ном в полиакриламидном геле (ПААГ). Для создания полиакриламидного геля использовали 40% концентрированный водный раствор акриламида (АА) и метиленбисакриламида (БАА) в соотношении 19:1.

Приготовление комплексов с миРНК.

Комплексы на основе катионных полимеров получали путем смешивания эквивалентных объемов водных растворов нуклеиновых кислот и растворов поликатионов с различной концентрацией, чтобы достигалось соотношения N/P азотных групп полимера (N) к фосфатным группам РНК (P), в расчёте на один нуклеотид и одно мономерное звено, от 1/128 до 128/1 [118]. Готовые миксы интенсивно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 30 мин. Расчеты концентраций проводили по формуле 1, и для всех экспериментов определяли массовую концентрацию поликатиона необходимого для создания комплекса с 1 мкмоль миРНК согласно таблице 2.1.

$$(1) \quad N/P = \frac{Mn_{pol}/x_{pol}}{Mn_{РНК}/y_{миРНК}}$$

где $Mn_{пол}$ – молекулярная масса мономерного звена поликатиона, г/моль; $Mn_{РНК}$ – молекулярная масса нуклеотида РНК, равная 320 г/моль; $x_{пол}$ – концентрация поликатиона, г/мл; $y_{миРНК}$ – концентрация миРНК (в среднем $\approx 0,7$ мг/мл).

Таблица 2.1 – Соотношения концентраций поликатионов и миРНК в растворах для приготовления комплексов

	ПЭИ	МГХ	КХ
$Mn_{пол}$, г/моль	43	375	298
N/P=1 на $1 \cdot 10^{-6}$ моль миРНК $x_{пол}$, мг/мл	0,94	8,2	6,52

Конечная концентрация в добавляемом растворе в комплексе с миРНК для N/P=1, мкг/мл	0,48	4,1	3,8
--	------	-----	-----

Липоплексы были получены путём смешивания реагента Lipofectamine® и миРНК в соотношениях, указанных в протоколе производителя [96,97].

Электрофоретическое разделение комплексов миРНК

Для оценки эффективности связывания миРНК с производными хитозана использовали вертикальное электрофоретическое разделение в 40% полиакриламидном геле (ПААГ). Для создания полиакриламидного геля использовали 40% концентрированный водный раствор акриламида (АА) и метиленбисакриламида (БАА) в соотношении 19:1. После разделения гели окрашивали в растворе EtBr (0,5 мкг/мл).

Для оценки эффективности связывания РНК с поликатионными полимерами и микрокапсулами использовали горизонтальное электрофоретическое разделение в 1% агарозном геле, с добавлением EtBr (0,5 мкг/мл) В качестве электрофоретического буфера использовался 1xTBE буфер.

Изображения получали и обрабатывали с помощью системы ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad).

Электронная микроскопия препаратов SiO₂-МК

Морфологию SiO₂-МК оценивали на сканирующем электронном микроскопе SUPRA 55VP (SEM ZEISS, Германия) при ускоряющем напряжении 15 кВ. Для анализа SEM разбавленную суспензию этанола с покрытыми SiO₂ капсулами отбрасывали на стеклянную горловину, сушили на воздухе и покрывали золотом (Au) перед наблюдением.

Кроме того, морфология и толщина оболочки изучались с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ТЭМ). Суспензия микрокапсул наносилась на медные сетки для электронной микроскопии, покрытые коллодиевой плёнкой-подложкой. После адсорбции микрокапсул к подложке в течение 1 мин сетки были промыты дистиллированной водой. Далее сетки высушивались и исследовались в просвечивающем электронном микроскопе

JEOL JEM 1011. Электронные микрофотографии были получены с помощью цифровой камеры Morada (Olympus Inc.).

Культивирование клеточных линий.

Клетки культивировались в культуральных флаконах, используя среду Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM) (Биолот, Россия) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) (Biowest, Франция). После достижения 80% монослоя клетки инкубировались с раствором трипсин/ ЭДТА (Invitrogen, США) в течение 10 минут, отмывались, а затем рассеивались на культуральные планшеты в концентрации 5×10^3 клеток на см^2 и инкубировали при 37°C при концентрации CO_2 5% до образования клеточного монослоя.

Трансфекция миРНК в комплексах с различными системами доставки.

Перед внесением препаратов, включая миРНК с любым носителем, клетки отмывали PBS и вносили среду без сыворотки. Комплексы миРНК с поликатионами в различных соотношениях, вносили в лунки планшета в объеме не более 1/50 от объема среды. миРНК с Lipofectamine2000 вносили согласно стандартному протоколу Invitrogene. Микрокапсулы в водном растворе добавляли в среду, доводя до нужной концентрации по миРНК, не более 1/5 объема, в соотношении приблизительно 2-5 микрокапсулы на клетку.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия клеток после трансфекции миРНК.

Интернализацию и внутриклеточное распределение ROX-миРНК отслеживали с использованием лазерного конфокального сканирующего микроскопа (Leica TCS SP8, Германия). Клетки A549 были засеяны на 13 мм круглых покровных стеклах, помещенных в лунку 24-луночного планшета и инкубировались в течение 24 часов. Затем культуральную среду заменяли на 1 мл свежей, содержащей свободный ROX-миРНК (250 пмоль), в комплексе с полиэтиленимином (N / P = 16:1, или 3,75 мкг / 250 пмоль), липофектамином (1,5 мкл / 250 пмоль) и SiO_2 -МК (250 пмоль или 25×10^5 капсул). После указанного периода инкубации клетки трижды промывали PBS и фиксировали 4% раствором

параформальдегида на PBS. Клетки пермеабилizировали 0,1% раствором Triton X100 на PBS в течение 5 мин и окрашивали Alexa Flour 488 Phalloidin (AF488 PL) и 4', 6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI). Затем клетки на покровных стеклах промывали PBS и заключали в среду Fluoroshield (Sigma Inc.).

Для получения изображений на конфокальном микроскопе флуоресцентные сигналы DAPI, AF488 PL и ROX-миРНК получали при возбуждении на лазерных линиях 405 нм, 488 нм и 561 нм соответственно. Для пространственной 3D модели клеток с интернализированной ROX-миРНК были выполнены серии конфокальный срезов по оси Z (Z-stack).

По описанной выше методике также была проведена оценка динамики интернализации и распределения в клетках MDCK, с использованием FAM-миРНК (с возбуждением флуоресцентной метки на 488 лазерной линии).

Просвечивающая электронная микроскопия клеток после трансфекции миРНК в микрокапсулах.

Клетки A549 культивировали в лунках 6-луночного планшета в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (5x10⁵ клеток на лунку). Микрокапсулы были добавлены к клеткам их расчёта 10 микрокапсул на клетку. После 24 ч инкубации с микрокапсулами, клетки были дважды промыты фосфатно-буферным раствором (PBS) и переведены в суспензию раствором трипсина/ЭДТА. Далее, клеточная суспензия была центрифугирована при 1000g в течение 10 мин и фиксирована в 2,5%-м растворе глутарового альдегида на PBS в течение 1ч при комнатной температуре, после чего образцы были промыты в 3х сменах фосфатного буфера. Далее была выполнена пост-фиксация образцов в 1%-м растворе тетроксидом осмия на том же буфере, при той же температуре в течение 1ч. После фиксации объекты были дегидратированы в серии растворов этанола возрастающей концентрации (30%, 50%, 70%, 96%, 100%), пропитаны ацетоном и заключены в эпоксидную смолу Эпон. На ультрамикротоме Leica UC7 были получены ультратонкие срезы толщиной 50-70 нм. Срезы были собраны на медные сетки для электронной микроскопии. Сетки со срезами были отконтрастированы в спиртовом растворе уранил-ацетата и водном растворе

цитрата свинца. Электронно-микроскопическое исследование срезов было выполнено в микроскопе JEOL JEM 1011. Электронные микрофотографии были получены с использованием камеры Morada (Digital Imaging Solutions Inc.).

Проточная цитофлуориметрия

Эффективность трансфекции миРНК оценивали с использованием проточной цитометрии. Для определения динамики накопления миРНК в комплексах с хитозаном и липофектаминол использовали FAM-миРНК. Суточный монослой A549 в шестилуночных планшетах трансфецировали свободной миРНК, и в комплексах с носителем. Затем после инкубации в течение 5,10,20,40 и 60 мин клетки отмывали трижды промывали PBS и раствором отделяли трипсин/ЭДТА. Для определения количественного соотношения жизнеспособных и мертвых клеток, перед анализом снятые клетки окрашивали 7-AAD (Invitrogen). Полученную суспензию (не менее 10^6 клеток) анализировали на проточном цитометре Navios™ (Beckman Coulter, США).

Для оценки эффективности накопления миРНК-ROX доставляемой микрокапсулами количественно определяли интенсивность флуоресценции клеток на проточном цитометре FACS Aria (BD, США). Суточный монослой A549 в двенадцатилуночных планшетах трансфецировали SiO₂-МК с миРНК-ROX в различных соотношениях между клетками и капсулами (1: 1, 1: 5, 1:10 и 1:50). Затем после инкубации в течение 5,10,20,40 и 60 мин клетки промывали трижды PBS и отделяли раствором трипсин/ЭДТА. Суспензию клеток собирали для проведения проточной цитометрии. Результаты были выражены как среднее и стандартное отклонение, полученные по трем образцам.

Анализ стабильности миРНК в комплексах под действием РНКаз

Свободную миРНК PA-1630-ROX и в составе микрокапсул в количестве 1 мкг инкубировали с ростовой клеточной DMEM, содержащей 10% сыворотки и РНКазу - RNase A Solution (Promega) в концентрации 1 мкг/мл при 37°C в течение 0, 15, 30, 45 и 60 минут.

Для оценки эффективности связывания РНК защитного действия микрокапсул использовали горизонтальное электрофоретическое разделение в

2,5% агарозном геле, с добавлением EtBr (0,5 мкг/мл). В качестве электрофоретического буфера использовался 1xTBE буфер. Изображения получали и обрабатывали с помощью системы ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad).

Исследование токсичности препаратов

Все препараты тестировали на цитотоксичность в культурах MDCK и A549. Готовили серии разведений каждого из препаратов на среде MEM. Клетки инкубировали в течение 24 часов при 37°C при концентрации CO₂ 5% в присутствии растворенных препаратов, после чего оценивали степень деструкции клеточного монослоя. Жизнеспособность клеток оценивали при помощи микротетразолиевого теста (МТТ, 3-(4,5-диметилазолил-2) 2,5-дифенилтетразолия бромид на PBS), согласно методике, приведенной в [118]. Оптическую плотность измеряли на планшетном ридере CLARIOstar (BMG Labtech, Германия), в режиме снятия тотального поглощения с лунки на длине волны 570 нм.

Определение эффективности внутриклеточной доставки миРНК.

Для оценки эффективности проникновения миРНК в клетки была использована FAM-меченая миРНК. миРНК с липофектаминол, а также микрокапсулы с FAM-меченой миРНК, вносили в лунки 96-луночного планшета в трех повторах (концентрация миРНК в лунке 1 мкМ). Через 24 ч клетки отмывали PBS, чтобы избавиться от не вошедших в клетку комплексов, фиксировали ацетоном и окрашивали DAPI. Изображения, качественно подтверждающие наличие FAM-меченой миРНК в цитоплазме клеток, а также полуколичественный расчет эффективности доставки миРНК с учетом отрицательного контроля (сигнал фона) и нормировки на количество клеток были получены с помощью системы формирования изображений Cytell Cell Imaging System (“GE Healthcare”, США) (настраиваемое приложение MyBioApp); для регистрации ядерного сигнала использовался синий канал (возб. 380 нм. 420), для регистрации сигнала флуоресцентной метки миРНК – зелёный (возб. 480 нм. 520).

Определение эффективности внутриклеточной доставки миРНК методом ПЦР.

Фракцию низкомолекулярных молекул РНК длиной менее 100 нуклеотидов выделяли из клеток с помощью набора miRNeasy Mini Kit (QIAGEN, Германия) согласно протоколу производителя. Далее использовали по 500 нг РНК для проведения полиаденилирования РНК, синтеза первой цепи кДНК и ПЦР-амплификации использованием набора mirVana™ qRT-PCR miRNA Detection Kit (Invitrogen, США) согласно протоколу производителя. В качестве эндогенного контроля использовали микроРНК miR-200a. Полученные ампликоны анализировали методом электрофоретического разделения в 2,5 % агарозном геле на 1xTBE буфере с добавлением EtBr (0,5 мкг/мл). Изображения получали и обрабатывали с помощью системы ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad, 0000).

Определение титра вируса

Вирус гриппа подтипа H1N1 A/PR/8/34 (PR8) из коллекции НИИ гриппа (Санкт-Петербург, Россия) культивировался в аллантоисной полости 10-дневных куриных эмбрионов при температуре 37°C. Аллантоисная жидкость извлекалась через 48 часов после заражения и хранилась при температуре -80°C. Титр вируса равный $2,69 \cdot 10^6$ /мл был определён методом реакции гемагглютинации, используя 50%-ную тканевую цитопатическую дозу (ТЦИД₅₀). Было произведено серийное 10-кратное разведение аллантоисной жидкости на монослоях клеток линий MDCK в 96-луночной планшете с последующей инкубацией в 72 часа. Расчет титра вируса для каждой лунки был выполнен по методу Рида и Менча [119]. Для оценки титра вируса реакция гемагглютинации (РГА) проводилась в круглодонных 96-луночных планшетах (Медполимер, Санкт-Петербург). Серийные двукратные разведения супернатанта были смешаны с таким же объёмом 0.5% (V/V) суспензии куриных эритроцитов с последующей 30-минутной инкубацией на льду. Титром вируса в РГА считают последнее разведение, в котором наблюдается агглютинация эритроцитов [120].

Определение противовирусной активности миРНК.

Противовирусную активность препаратов миРНК оценивали на клеточной культуре A549. Препараты миРНК добавляли к монослою клеток, инкубировали 24 ч (37°C, 5% CO₂), отмывали PBS и заражали вирусом в разведениях на

поддерживающей среде DMEM с глутамином, 1 мкг/мл трипсина и 0,1 мг/мл стрептомицина. Через 30 мин инкубации (8°C) сменяли среду на поддерживающую. Клетки инкубировали 24 и 72 ч (37°C, 5% CO₂), после чего оценивали вирусную репродукцию в клетках и вирус-содержащей культуральной жидкости (ВКЖ), полученной от них. Препараты миРНК (50 пмоль/10⁵ клеток) вносили за 1 ч до заражения вирусом при значении множественности инфекции (МОИ) 0,1, выбранной в соответствии с данными в работе Ge et al., 2003 [13]. Репродукцию вируса в ВКЖ оценивали методом реакции гемагглютинации (РГА) с 0,5% куриными эритроцитами для двукратно раститрованных ВКЖ, полученных от клеток через 24 и 72 ч после заражения. Титр вируса выражали в единицах ГА, обратных максимальному разведению вызывающих агглютинацию эритроцитов. Накопление вирусного белка NP в инфицированных клетках и ВКЖ, полученных от них, определяли методом прямого иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием антител 6D11-HRP. 6D11- моноклональные антитела, специфичные к NP-белку вирус гриппа типа А (получены в НИИ гриппа).

Определение уровня вирусного белка методом ИФА. Для определения уровня накопления вирусного белка в клетках, клетки фиксировали 80% холодным ацетоном в течение 30 минут при 4°C, затем трижды отмывали раствором PBS с добавлением 0,05% Tween 20 (PBST). После этого клетки инкубировали в 5% растворе молока на PBST. Конъюгированные с HRP антитела мыши 6D11 добавляли в концентрации 1 мкг/мкл, инкубацию проводили 1 час при температуре 37°C. Специфическую реакцию связывания антитела с антигеном детектировали путём добавления в каждую лунку реагентов из набора TMB Peroxidase EIA Substrate Kit (Bio-Rad, США) согласно протоколу производителя. Оптическую плотность измеряли на планшетном ридере CLARIOstar (BMG Labtech, Германия) при длине волны 450 нм (за вычетом значения при 655 нм для учёта фонового сигнала). Для определения уровня накопления вирусного белка в ВКЖ, последнюю переносили в 96-луночных планшетов Microlon High Binding (Greiner Bio-One, Германия) по 50мкл в лунку, и

сорбировали белки в течение 12 и более часов при 4°C, затем работали по описанной выше методике.

Анализ Western Blotting клеточных лизатов

Через 72 часа после инфицирования клетки ресуспендировали в PBS, содержащем 0,5% NP-40, и инкубировали в течение 1 часа при 37°C для мягкого лизиса. Концентрацию белка измеряли, как описано в [30] с использованием RC DC™ Protein Assay (Bio-Rad, США), выполненного в трех повторностях. Далее проводили анализ с использованием первичных мышинных моноклональных антител к альфа-тубулину (T6074, Sigma) и NP (IA-108, Bialexa) по методике описанной в [75]; изображения анализировали на ChemiDoc XRS + System (Bio-Rad, США).

Выделение РНК, обратная транскрипция и количественная ПЦР в режиме реального времени (ОТ-qПЦР)

Тотальную РНК выделяли с помощью наборов RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Германия) согласно протоколу производителя. Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher, США). Для проведения обратной транскрипции с проб тотальной РНК брали 700 нг РНК и использовали стандартный протокол для обратной транскрипции с помощью набора M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, США). ОТ-qПЦР анализ экспрессии гена M1 ВГА проводили с использованием набора Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies, USA) и системы праймеров Taqman® CDC по протоколу, опубликованному на сайте ВОЗ [121]. Для нормализации экспрессии согласно протоколу использовали праймеры Taqman® для детекции гена RP, кодирующего РНКазу Р. Для количественного определения уровня экспрессии использовали метод $2^{-\Delta\Delta CT}$, принимая за единицу нормализованный уровень экспрессии M1 в образцах инфекционного контроля, и рассчитывая относительные изменения для образцов после терапевтической обработки миРНК. Для постановки анализа ПЦР использовали три биологические реплики, по два технических повтора.

Различия по уровню экспрессии генов визуализировали, разделяя продукты ПЦР (в разведении 1/10) с помощью электрофоретического разделения в 1% агарозном геле, с добавлением EtBr (0,5 мкг/мл). В качестве электрофоретического буфера использовался 1xTBE буфер. Изображения получали и обрабатывали с помощью системы ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad).

Статистика

Статистическую обработку данных проводили с помощью параметрического теста Стьюдента, или непараметрических критериев Манна-Уитни (для двух малых независимых выборок) с использованием программного обеспечения MS Office Excel 2010 и Statistica 6.0. Различия считали статистически значимыми для значений $p < 0,05$. Для представления полученных данных использовали такие показатели описательной статистики, как среднеарифметическое значение и стандартное отклонение.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Дизайн миРНК, направленных на выключение экспрессии генов *PA* и *NP* вируса гриппа *A*

Выбор мишеней является ключевым при разработке противовирусных препаратов, механизм действия которых основан на РНК-интерференции. При выборе мишени для миРНК в геноме ВГА необходимо учитывать несколько факторов. Во-первых, «выключаемый» ген должен вносить существенный вклад в жизненный цикл вируса. Во вторых, скорость возникновения мутаций в выбранном гене должна быть низка относительно других генов вируса, так как быстрое накопление мутаций вследствие отсутствия корректорской активности RdRp может привести к возникновению устойчивости к действию миРНК. В-третьих, ген должен быть эволюционно консервативен среди штаммов, относящихся к разным подтипам ВГА человека. В-четвертых, наличие нескольких открытых рамок считывания в гене будет иметь преимущество, так как позволит заблокировать трансляцию сразу нескольких белков, что может существенно повысить противовирусную активность миРНК.

Исходя из вышеперечисленных критериев, в качестве мишеней для миРНК мы выбрали гены *PA* и *NP*, являющиеся одними из наиболее консервативных в геноме ВГА [122]. Белок *NP* представляет собой функционально важный элемент вирусного РНП, он связывается с RdRp и несколькими клеточными белками, включая актин и компоненты системы ядерного импорта и экспорта [89]. Эти взаимодействия необходимы для эффективной репликации ВГА. *PA* является частью гетеротримерного комплекса RdRp, в составе которого участвует в инициации транскрипции и обладает эндонуклеазной активностью. Помимо белка *PA* ген *PA* кодирует еще три минорных белка: *PA-N155*, *PA-N182* и *PA-X*. *PA-N155* и *PA-N182* представляют собой укороченные изоформы *PA*, они предположительно участвуют в модуляции клеточного ответа на инфекционный процесс и могут быть связаны с вирулентностью ВГА [32]. Белок *PA-X* является неструктурным, присутствующим только в инфицированных клетках,

компонентом ВГА, отвечающим за регуляцию взаимодействий между вирусом и клеткой. Известно, что минорные вирусные белки могут являться существенными факторами вирулентности, и блокирование их экспрессии в дополнение к мажорным белкам может вносить большой вклад в противовирусную активность миРНК [32].

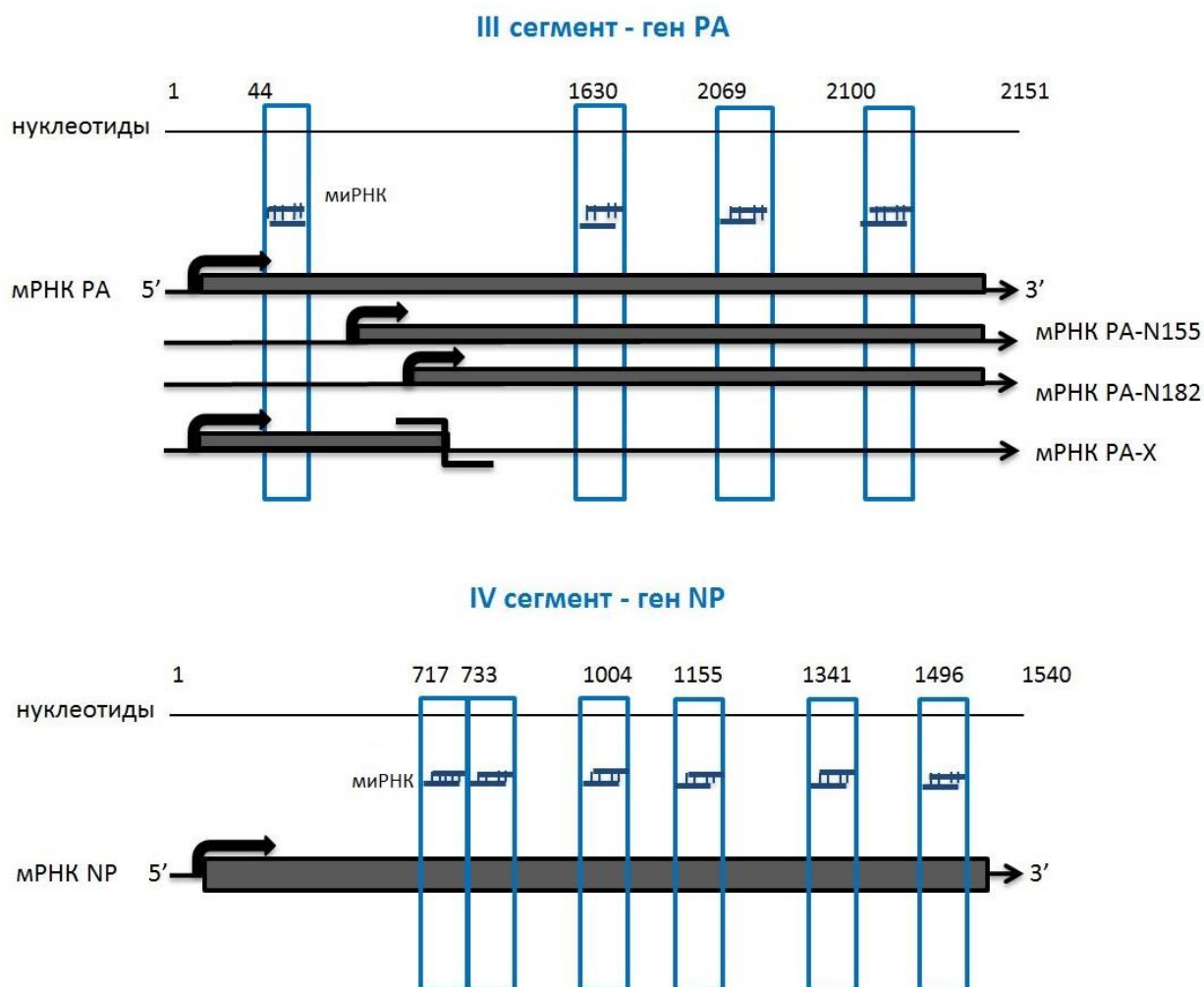
В соответствии с общепринятыми правилами дизайна миРНК, подробно описанными в работах [53,81], были подобраны уникальные миРНК, специфически узнающие консервативные области мРНК PA и NP. С этой целью из базы данных *Genbank* [123] были взяты все депонированные нуклеотидные последовательности генов PA и NP штаммов ВГА, выделенных от человека. Последовательности были выравнены с помощью онлайн сервиса MAFFT [124], после чего дополнительно обработаны в программе ClustalX 8500. В результате получены консенсусные нуклеотидные последовательности двух выбранных генов ВГА с вероятностью встречаемости нуклеотидов более 75%. Используя эти консенсусные последовательности, в соответствии с известными эмпирическими правилами дизайна миРНК мы подобрали 11 ранее не описанных в литературе миРНК, направленных на гены PA (анти-PA) и NP (анти-NP). Последовательности миРНК были дополнительно проверены на отсутствие гомологии в геномах человека и ВГА (кроме целевых последовательностей) с целью исключения возможности их влияния на экспрессию нецелевых генов.

Кроме того были выбраны несколько миРНК, противовирусная активность которых в отношении ВГА была ранее описана в литературе [10]. Эти миРНК использовали в качестве положительного контроля РНК-интерференции. Также подобрали случайную миРНК, не имеющую мишеней среди генов человека и ВГА. Данную миРНК использовали в качестве отрицательного контроля РНК-интерференции. Последовательности РНК-олигонуклеотидов, синтезированных для создания миРНК дуплексов, приведены в таблице 3.1. Процесс получения миРНК из пар комплементарных олигонуклеотидов подробно представлен в разделе «Материалы и методы».

Таблица 3.1. Нуклеотидные последовательности комплементарных олигонуклеотидов, составляющих РНК дуплексы синтетических миРНК, направленных на гены *PA*, *NP*, *NS*. ВГА

миРНК	Последовательность		Ссылка
	(+)-нить (5'→3')	(-)-нить (5'→3')	
PA-44	UgCUUCAAUCCgAUgAUUg(dTdT)	CAAUCAUCggAUUgAAgCA(dTdT)	[13]
PA-1630	UgAgCCACACAAAUgggAA	UCCCAUUUgUgUggCUCgU	-
PA-2069	gCAAUUGAggAgUgCCUgA(dTdT)	UCAggCACUCCUCAAUUgC(dTdT)	-
PA-2100	gAggAgUgCCUgAUUAAUgA	AUUAUCAggCACUCCUCgA	-
NP-717	UUAUgAgAgAAUgUgCAACAU	gUUgCACAUUCUCUCAUAAGC	
NP-733	AACAUCUCAAAggAAAAUUU	CgUUgUAAgAgUUUCCUUUUA	-
NP-1004	AUUCUgCUgCAUUUgAAgAUAA(dTdT)	AUCUUUAAAUGCagCAgAAUAU(dTdT)	-
NP-1155	AAUUGCUUCAAAUgAgAACAU	gUUUAACgAAgUUUACUCUUG	
NP-1341	gAAUgAUggAAAgUgCAAAAC	UUUgCACUUCCAUCAUUCUU	-
NP-1496	ggAUCUUAUUUCUUCggAg(dTdT)	CUCCgAAgAAAUAAGAUCC(dTdT)	[13][64]
NS-777	CUUgCUCCACUUCAAgCAgUA	CUgCUUgAAgUggAgCAAgAg	
Neg миРНК	CAUgACCAACAAGAUgAAgAg	CUUCUgCUUgUUggUCAUgCg	-

Схема расположения участков узнавания противовирусными анти-PA и анти-NP миРНК в мРНК, кодируемых генами *PA* и *NP* ВГА, представлена на рисунке 3.1. Важно отметить, что некоторые из подобранных миРНК способны одновременно распознавать несколько известных транскриптов гена *PA*: PA, PA-N155, PA-N182 и PA-X.



Стрелками (5'→3') на рисунке изображены мРНК, транскрибируемые с генов, серыми прямоугольниками – транслируемые белки, толстыми стрелками показана точка инициации трансляции

Рисунок 3.1 – Схематическое изображение местоположения сайтов мишеней для РНК-интерференции на генах *PA* и *NP*

3.2. Скрининг противовирусной активности анти-PA и анти-NP миРНК, доставляемых в клетки с помощью липофектамина, in vitro

Для первичного скрининга противовирусной активности выбранных миРНК использовали традиционно применяемый для доставки молекул нуклеиновых кислот в клетки реагент – липофектамин (ЛФ и ЛФ-RNAi). Были определены предельно допустимые разведения для ЛФ и ЛФ-RNAi. Как видно из данных, представленных на рисунке 3.2, максимально допустимое количество липофектамина, не вызывающее гибель монослоя клеток MDCK, составило 0,6

мкл/мкл на 50 000 клеток (разведение 1/160 в мкл). Также было продемонстрировано, что внесение негативной миРНК в диапазоне конечных концентраций 0,1-10 мкМ в комплексе с ЛФ вызывает не более 20% гибели клеточного монослоя (таблица 3.2).

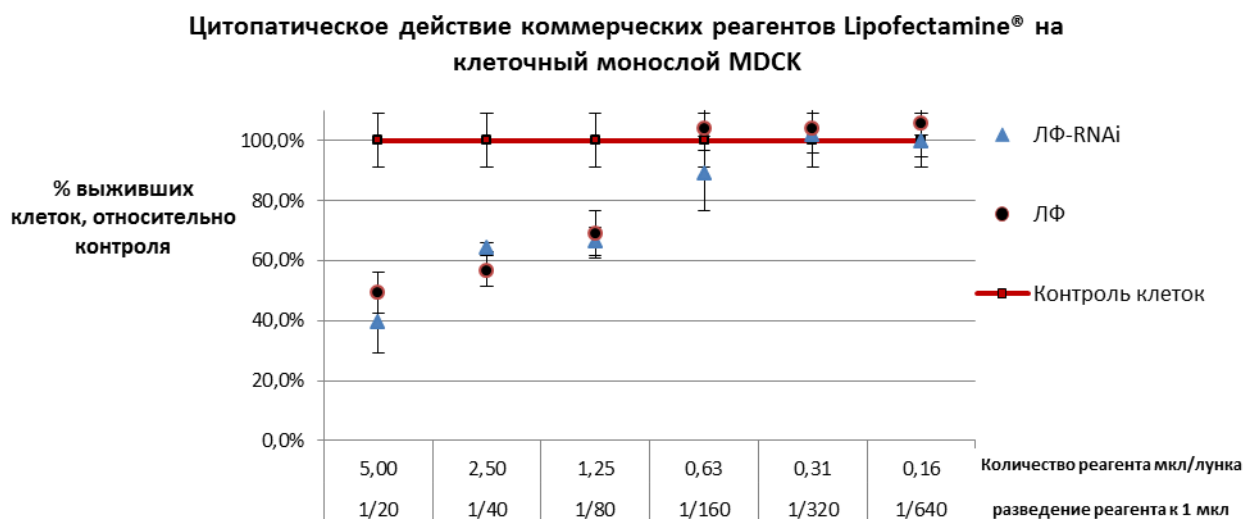


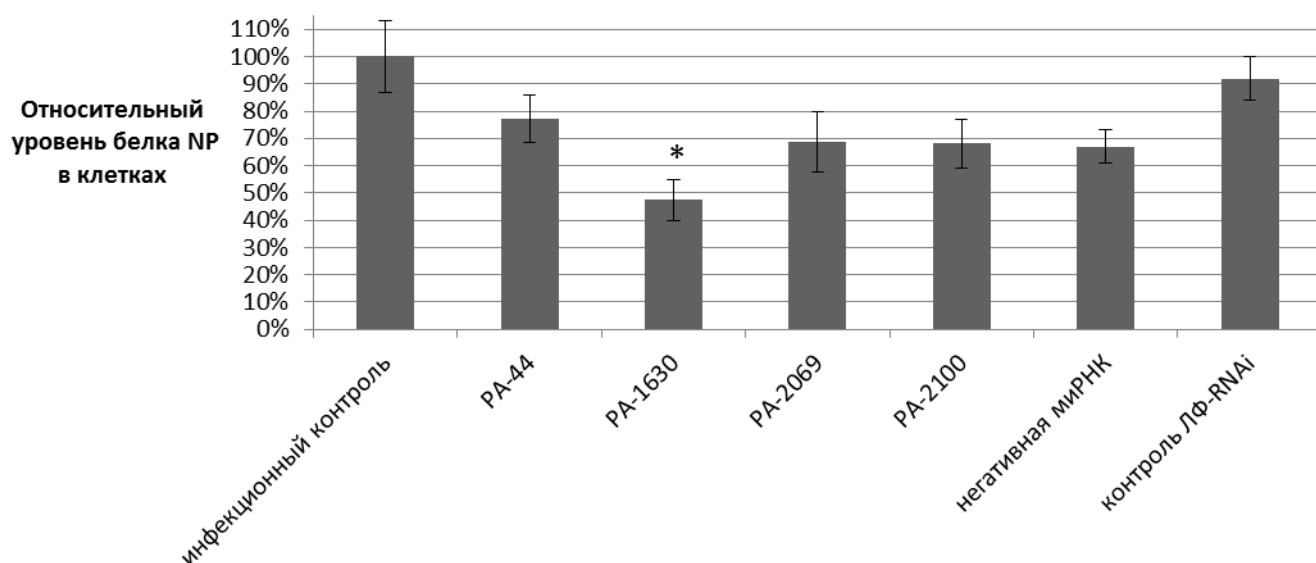
Рисунок 3.2 – Токсическое действие липофектамина на монослой клеток MDCK (50 000 клеток)

Таблица 3.2 – Токсическое действие препаратов миРНК-ЛФ на монослой клеток MDCK (50 000 клеток)

Образец	контроль клеток	ЛФ без миРНК	негативная миРНК + ЛФ			
			концентрация миРНК, мкМ			
			10	5	0,5	0,1
Выживаемость клеток	100 ± 5 %	92 ± 5 %	80 ± 5%	85 ± 8 %	88 ± 12%	87 ± 9%

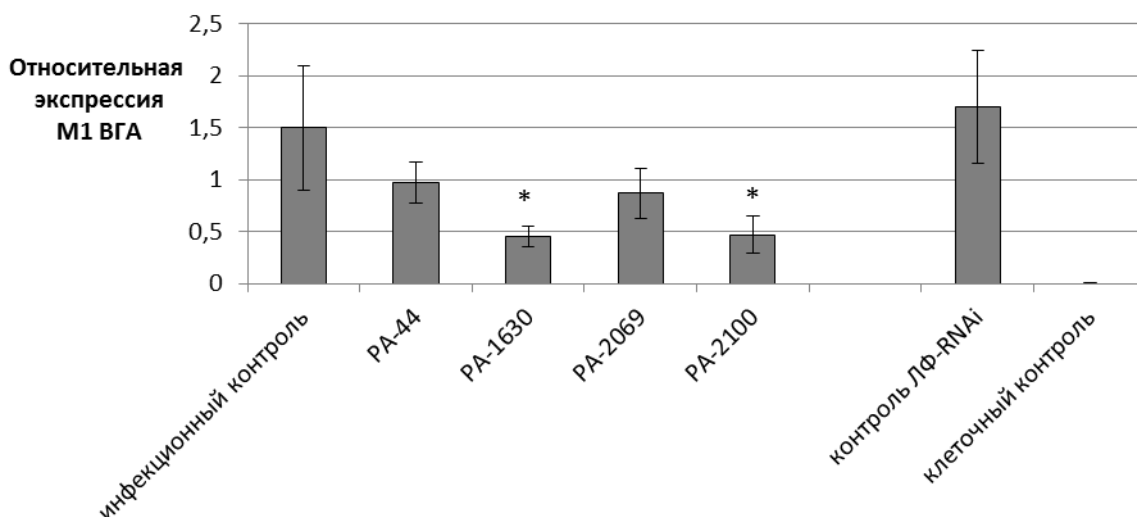
Далее эпителиальные клетки A549 заражали вирусом A/PR/8/34 (H1N1) при множественности заражения 0,01 MOI. Заражение проводили с использованием трипсина (в конечной концентрации 0,5 мкг/мл) для обеспечения многоциклового репродукции вируса. Каждый из исследуемых препаратов миРНК в конечной концентрации 0,25 мкМ в комплексе с ЛФ-RNAi вводили в клетки за 4 часа до заражения. В качестве контролей в этих экспериментах использовали

неспецифическую миРНК и чистый препарат ЛФ-RNAi. Через 24 часа после инфицирования оценили уровень накопления вирусного белка NP в клетках методом ИФА с моноклональными антителами 6D11 к NP (рисунок 3.3). Результаты скрининга противовирусной активности исследуемых миРНК, направленных на подавление экспрессии генов PA и NP ВГА, представлены на рисунках 3.4-3.6. В случае анти-PA миРНК дополнительно определили относительные уровни экспрессии мРНК M1 методом ОТ-qПЦР (рисунок 3.4).



На диаграмме за 100% принят уровень NP в контрольных инфицированных клетках, показаны стандартные отклонения по 8 повторам (* $p < 0,01$)

Рисунок 3.3 – Противовирусная активность анти-PA миРНК в комплексе с ЛФ-RNAi, введенных за 4 часа до заражения клеток A549 вирусом A/PR/8/34 (0,01 MOI). Относительный уровень белка NP ВГА, определенный методом ИФА в фиксированных инфицированных клетках.



Значения относительной экспрессии получены при обсчете данных ОТ-*q*ПЦР (нормирование проведено по гену *RP* с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Cq}$). На диаграмме показаны стандартные отклонения по 3 повторам (* $p < 0,01$)

Рисунок 3.4 – Противовирусная активность анти-РА миРНК в комплексе с ЛФ-RNAi, введенных за 4 часа до заражения клеток A549 вирусом A/PR/8/34 (0,01 MOI). Относительная экспрессия мРНК белка М1 в клеточных лизатах.

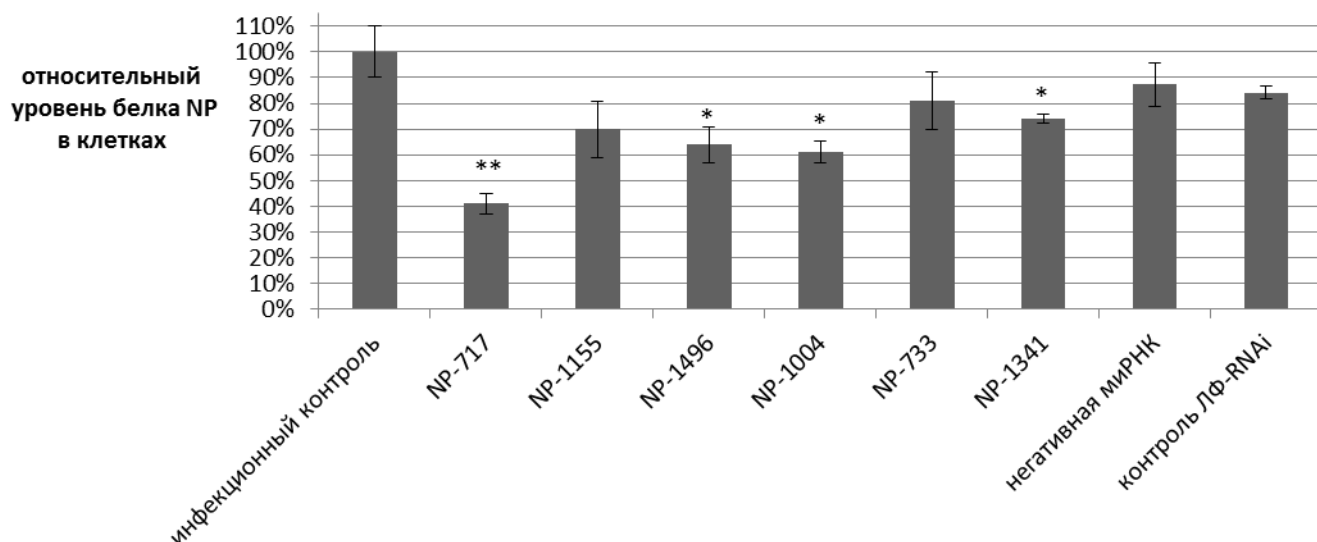
Среди всех исследованных анти-РА миРНК наибольшее снижение уровня NP в инфицированных клетках по результатам ИФА было продемонстрировано для РА-1630. Для нее же, наравне с РА-2100, было показано и максимальное снижение уровня экспрессии мРНК М1. Определение титра вирусного потомства в культуральной среде инфицированных клеток MDCK через 24 часа после заражения по данным РГА также подтвердило способность миРНК РА-1630 ингибировать репродукцию ВГА.

Поскольку все три примененных метода (определение титра вируса по РГА, ОТ-*q*ПЦР и ИФА) давали сопоставимые результаты, в дальнейших экспериментах по скринингу противовирусной активности анти-NP миРНК преимущественно применяли только метод ИФА для определения уровня белка NP в инфицированных клетках. Это метод является общепринятым и надежным для полуколичественной оценки инфекционного титра ВГА [125].

Далее методом ИФА было показано, что среди всех тестируемых анти-NP миРНК наиболее эффективной в ингибировании вируса оказалась NP-717. В клетках после профилактического применения NP-717 за 4 часа до заражения было зарегистрировано снижение уровня NP на более чем 60% по сравнению с инфекционным контролем и действием контрольной неспецифической миРНК (рисунок 3.5). Методом РГА было также подтверждено, что миРНК NP-717 (таблица 3.3) является наиболее сильным ингибитором образования вирусного потомства. Во всех проведенных экспериментах ЛФ и неспецифическая миРНК не оказали влияния на репродукцию ВГА *in vitro*, оцениваемую любым из используемых методов.

Таблица 3.3 – Противовирусная активность анти-NP миРНК в комплексе с ЛФ-RNAi, введенных за 4 часа до заражения клеток MDCK вирусом A/PR/8/34 (0,01 MOI). Результаты РГА ВКЖ, полученных от инфицированных клеток.

	РГА ед.
Контроль заражения	1/64
NP-717	1/16
NP-733	1/64
NP-1004	1/64
NP-1155	1/16
NP-1341	1/32
NP-1496	1/32
Негативная миРНК	1/32
Контроль ЛФ без миРНК	1/64



На диаграмме за 100% принят уровень NP в контрольных инфицированных клетках, показаны стандартные отклонения по 8 повторам (* $p < 0,05$; ** $p < 0,0001$).

Рисунок 3.5 – Противовирусная активность анти-NP миРНК в комплексе с ЛФ-RNAi, введенных за 4 часа до заражения клеток A549 вирусом A/PR/8/34 (0,01 MOI). Относительный уровень белка NP ВГА, определенный методом ИФА в фиксированных инфицированных клетках.

Вместе эти результаты показывают, что миРНК, направленные на вирусные гены *PA* и *NP*, могут ингибировать продукцию ВГА *in vitro*. В случае анти-PA миРНК наибольшее подавление размножения вируса было достигнуто для миРНК, узнающей не только основной продукт гена, но и открытые рамки считывания PA-N155 и PA-N182. Полученные различными методами данные ясно свидетельствуют о том, что миРНК PA-1630 и NP-717 обладают наиболее выраженной среди всех исследованных нами миРНК способностью к подавлению репликации ВГА *in vitro*. Эти результаты позволили выбрать эти две миРНК для последующей работы. Однако прежде чем приступить к дальнейшему изучению их противовирусной активности, необходимо было решить чрезвычайно важную задачу – выбрать носитель для внутриклеточной доставки.

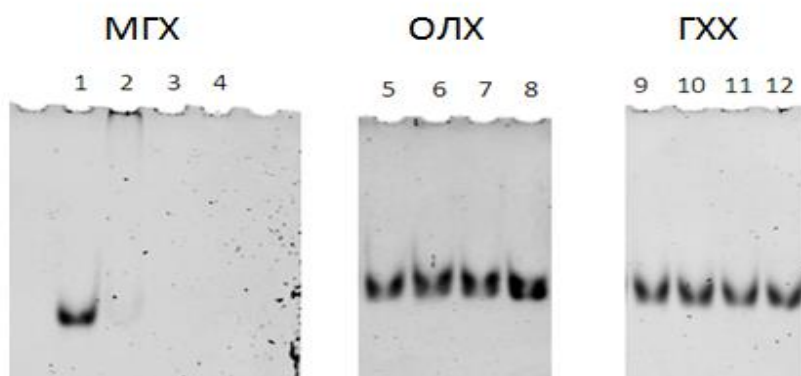
3.3. Выбор носителей противовирусных миРНК на основе полиэтиленимина, производных хитозана и гибридных микрокапсул

Эффективность доставки в клетки миРНК, обладающих противовирусной активностью в отношении ВГА, оценивали с использованием поликатионных молекул полиэтиленимина (ПЭИ) и производных хитозана (метилгликоль хитозан (МГХ), олиголактат хитозана (ОЛХ), гидрохлорид хитозана (ГХХ), кватернизованный хитозан (КХ)), а также гибридных микрокапсул на основе полиаргинина с модифицированной SiO_2 оболочкой (SiO_2 -МК). Липоплексные реагенты Lipofectamine 2000 и Lipofectamine RNAiMax использовали в качестве препаратов сравнения. Характеристика носителей и источники их получения описаны в разделе «Материалы и методы».

В предварительных экспериментах по определению комплексообразующей способности хитозана мы рассматривали различные количественные соотношения хитозана к миРНК по массе, так как нам была неизвестна молекулярная масса одного звена для МГХ, ОЛХ и ГХХ. Для этого использовали метод электрофоретического разделения комплексов миРНК с носителями в агарозном геле с детекцией нуклеиновых кислот бромистым этидием. Показали, что за 1 час инкубации при комнатной температуре МГХ образует комплекс с 1 нг миРНК в соотношениях 10000:1, 1000:1 и 100:1; при этом ОЛХ и ГХХ в тех же соотношениях комплексов с миРНК не образуют (рисунок 3.6). Таким образом, в последующем из всех производных хитозана в работе использовали только МГХ и КХ.

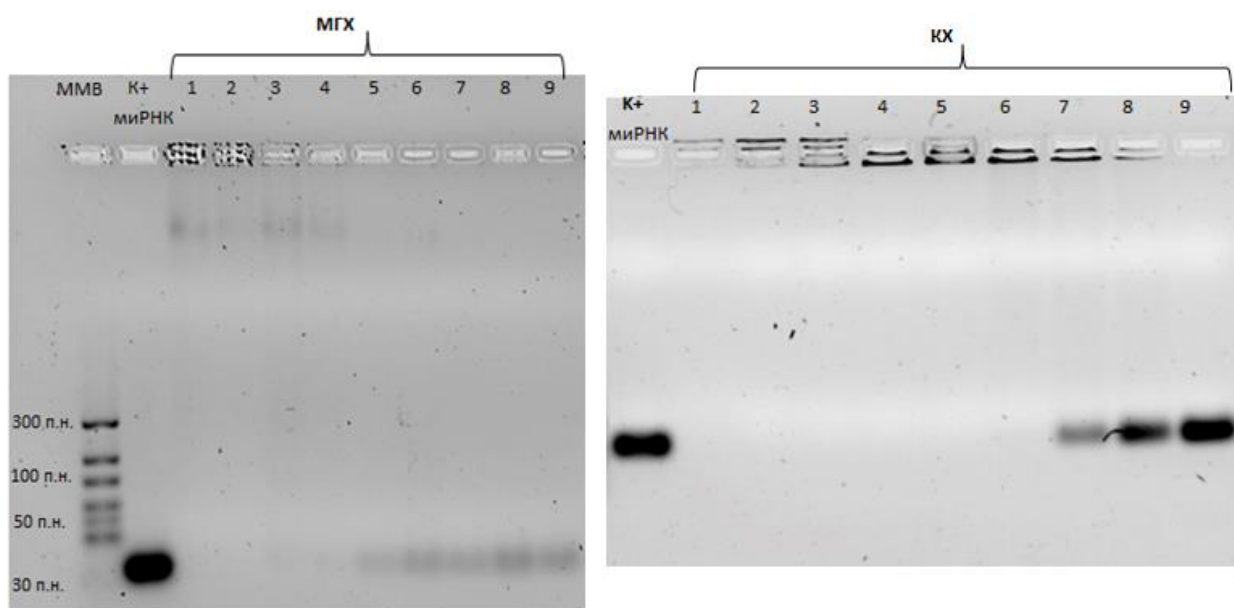
Далее определили минимальные соотношения N/P, необходимые для полного связывания миРНК с поликатионными носителями. Для этого использовали метод электрофоретического разделения комплексов миРНК с носителями в агарозном геле с детекцией нуклеиновых кислот бромистым этидием. В случае ПЭИ использовали разделение в полиакриламидном геле. Для МГХ комплексы приобретают положительный заряд и экранируют миРНК при

значениях N/P свыше 1/2, для КХ – при N/P свыше 2, для ПЭИ – при N/P свыше 10 (рисунок 3.7).



1, 8, 12 – контрольная миРНК; 2,3,4 – комплексы МГХ с миРНК с массовыми соотношениями в нг 100:1, 1000:1, 10000:1, соответственно; 5, 6, 7 - комплексы ОЛХ с миРНК с массовыми соотношениями в нг 10000:1, 1000:1, 100:1, соответственно; 9,10,11 - комплексы ГХХ с миРНК с массовыми соотношениями в нг 10000:1, 1000:1, 100:1, соответственно

Рисунок 3.6 – Связывание миРНК с производными хитозана: МГХ, ОЛХ, ГХХ



ММВ-маркер молекулярного веса(GeneRuler ULR DNA Ladder); K+ миРНК – свободная миРНК;1-9 – комплексы хитозан/миРНК в соотношениями N/P, соответственно, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39

Рисунок 3.7 – Электрофоретическое разделение в 4% агарозном геле (с добавлением 0,02% EtBr) комплексов МГХ и КХ с миРНК в различных соотношениях N/P

Определили максимально допустимые дозы препаратов, образованных поликатионами и миРНК в соотношениях N/P>1, которые вызывают гибель 50% клеток *in vitro*. Они составили 6,5 мкг/мл для ПЭИ, 60 мкг/мл для МГХ и 24,5 мкг/мл для КХ (рисунок 3.8).

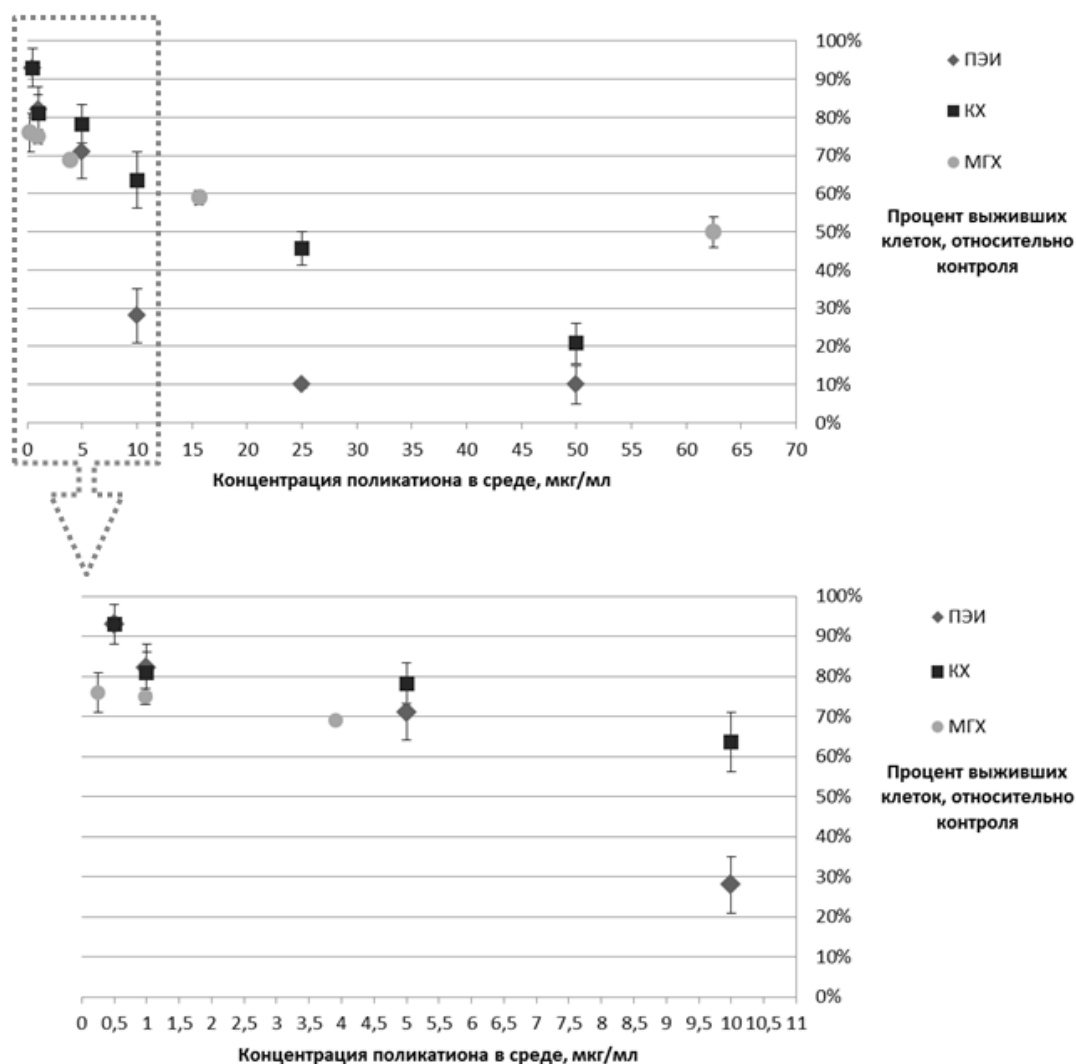


Рисунок 3.8 – Токсическое действие комплексов поликатионов ПЭИ, МГХ и КХ с миРНК (1 μM), с различными концентрациями по поликатиону, на клеточный монослой A549 (50 000 клеток) [126]

В дальнейших экспериментах в качестве модельной миРНК для решения задач визуализации внутриклеточного транспорта использовали миРНК,

содержащую флуоресцентную метку на 3'-конце. В зависимости от задач использовали карбоксифлуоресцеин (FAM) или родамин (ROX).

Методом флуоресцентной микроскопии зафиксировали наличие миРНК-ROX в цитоплазме клеток через 24 часа после внесения в культуральную среду к клеткам комплексов миРНК-ROX с МГХ и КХ (для комплексов $N/P > 2$) и с ПЭИ ($N/P > 10$). миРНК, добавляемую в среду без носителя, не детектировали в клетках. Важным вопросом является динамика накопления миРНК внутри клетки. Проникновение комплекса хитозана с миРНК в клетки MDCK оценивали по данным флуоресцентной микроскопии фиксированных клеток с окраской актина в различные временные интервалы после внесения комплекса в среду от 1 минуты до 24 часов. Было показано наличие и накопление комплексов в цитоплазме, начиная с первой минуты эксперимента и до 20 минут. При помощи лазерной проточной цитофлуориметрии («BD FACS Canto2», США) было показано, что $93,5 \pm 1,5$ % клеток содержат комплекс с флуоресцентной меткой после 60 минут инкубации клеток с комплексами (рисунок 3.9). Было показано, что скорость накопления комплексов в клетках не зависит от дозы миРНК в комплексах. Также было подтверждено накопление комплексов хитозан-РНК с флуоресцентной меткой, начиная с первой минуты после внесения, данными микроскопии в режиме реального времени на конфокальном микроскопе (Carl Zeiss, Германия) на клеточных моделях MDCK.

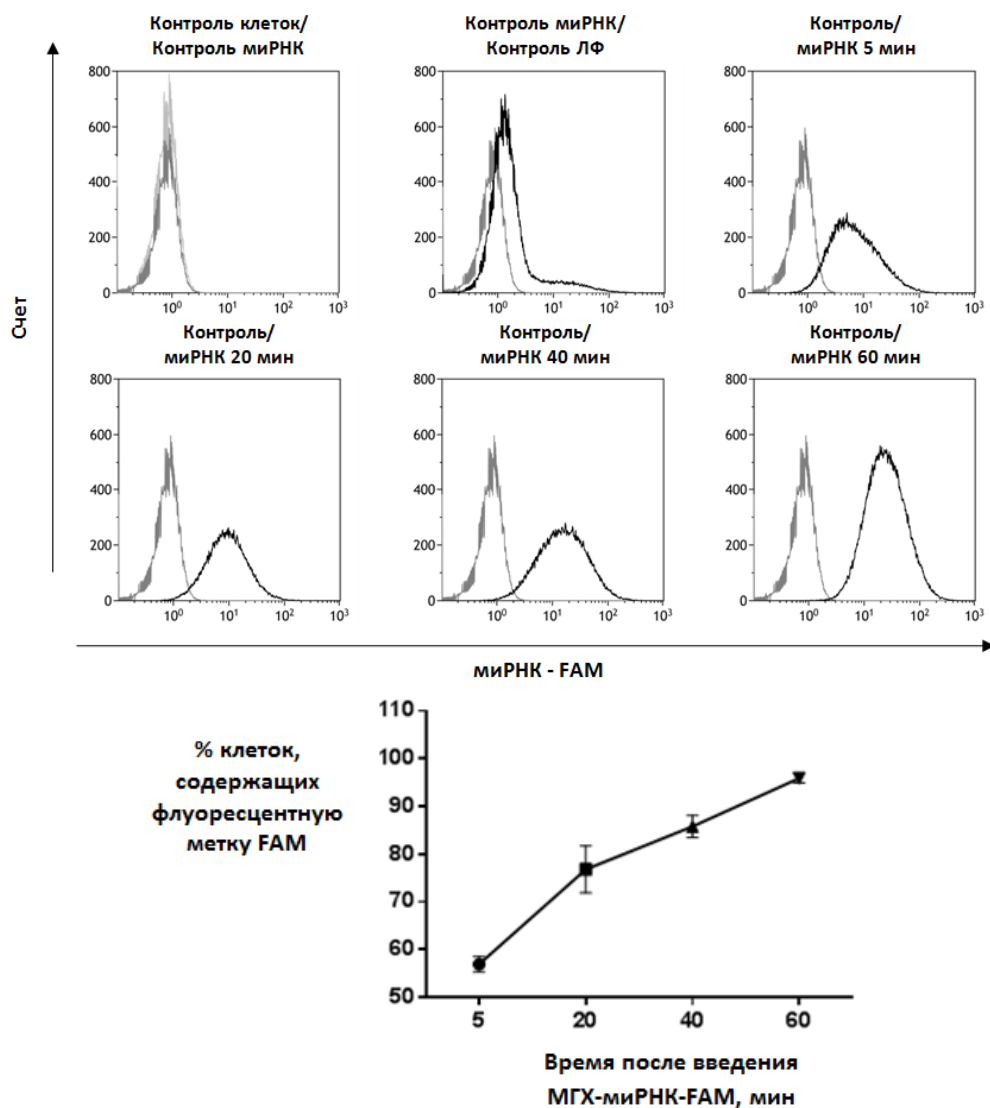
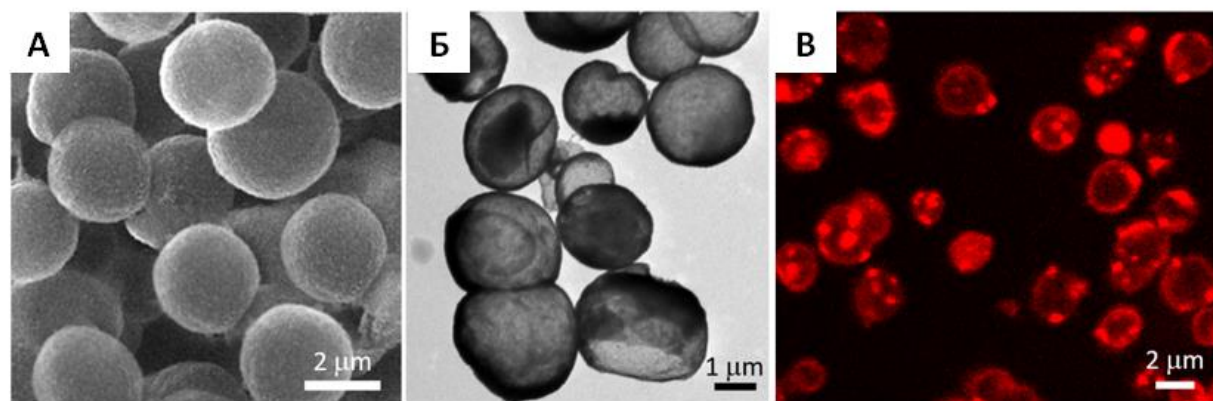


Рисунок 3.9 – Данные по накоплению флуоресцентной метки в клетках MDCK за 60 минут инкубации с комплексами хитозан-РНК, в сравнении со свободным эндосомальным поглощением РНК и доставкой коммерческим реагентом Lipofectmin 2000

Помимо поликатионов для доставки миРНК использовали гибридные полиэлектролитные микрокапсулы (SiO₂-МК), созданные по методике «layer-by-layer» и технологии золь-гель, разработанные научной группой Г.Б Сухорукова в 2016 году [25,113,115].

Установлено, что SiO₂-МК, синтезированные методом послойного синтеза и состоящие из четырех чередующихся слоёв полиаргинина и декстрана с последним слоем полиаргинина, с поверхностной неорганической

наноструктурой (SiO_2 – оболочкой), являются полыми, имеют округлую форму и диаметр около 2 мкм (рисунок 3.10).

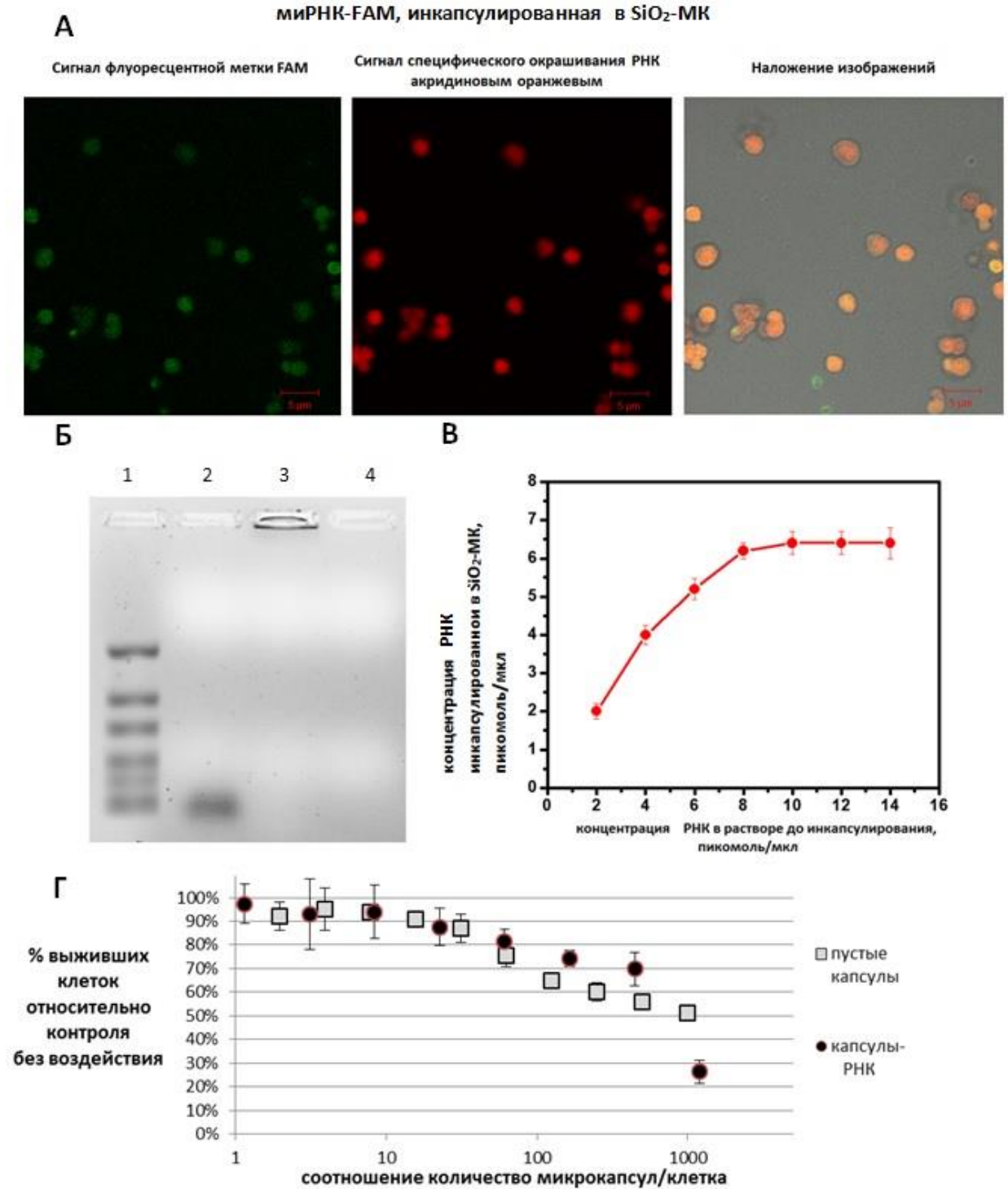


А- изображение, полученное методом сканирующей электронной микроскопии. Б- изображение, полученное методом просвечивающей электронной микроскопии. В- изображение полученной методом лазерной конфокальной микроскопии (регистрация сигнала флуоресцентной метки ROX на длине волны 600 нм)

Рисунок 3.10 – Общий вид и структура гибридных микрокапсул из полиаргинина с модификацией поверхности SiO_2 с инкапсулированной миРНК-Rox.

При загрузке в SiO_2 -МК модельной миРНК с флуоресцентной меткой ROX (ROX-миРНК) миРНК локализуется и эффективно удерживается внутри капсул (рисунок 3.11 А, В). Эксперименты по определению максимальной ёмкости загрузки миРНК в SiO_2 -МК с использованием спектрофотометра Nanodrop 2000 показали, что она составляет 6.4 пмоль/мкл миРНК (рисунок 3.11 С). Такая высокая концентрация миРНК в растворе препарата микрокапсул позволяет доставлять в клетку большее количество миРНК, чем в комплексе с ПЭИ и хитозаном, что особенно важно по причине усиления токсического действия поликатионов по мере увеличения количества миРНК. Стоит заметить, что для системы микрокапсул невозможно определить токсическое действие на клеточный монослой в зависимости от концентрации вещества носителя (как в случае поликатионной доставки), однако можно охарактеризовать токсическое действие препарата микрокапсул в зависимости от соотношения количества капсул на одну клетку. Как видно из представленных на рисунке 3.11 D данных,

внесение пустых и содержащих миРНК микрокапсул в соотношении до 50 капсул на 1 клетку (конечная концентрация капсул 3×10^6 капсул/мл) приводит к гибели не более 15% клеточного монослоя. При этом показано, что оптимальное соотношение по захвату клеткой микрокапсул и наиболее эффективной трансфекцией лежит в диапазоне от 5 до 20 капсул на клетку (рис 3.13). Таким образом, для оптимальной трансфекции клеток миРНК в предельно допустимой конечной концентрации 5 мкМ, достаточно внесения к клеткам микрокапсул в соотношении 15 капсул на клетку, которое, в свою очередь, не вызывает значительного токсического эффекта.



А-изображение SiO₂-МК с инкапсулированной миРНК-FAM с окрашиванием акридиновым оранжевым, полученное методом лазерной конфокальной микроскопии. Б-электрофоретическое разделение в 2,5 % агарозном геле с окрашиванием EtBr; цифрами обозначено 1- маркер молекулярного веса (GeneRuler ULR DNA Ladder), 2- свободная миРНК, 3- инкапсулированная миРНК в SiO₂-МК, 4- пустые SiO₂-МК. В- График инкапсулирующей способности SiO₂-МК. Г- Токсическое действие пустых SiO₂-МК и с инкапсулированной миРНК-FAM на клеточный монослой MDCK (50 000 клеток)

Рисунок 3.11 – Охарактеризация инкапсулирующей способности SiO₂-МК

Обработка препарата инкапсулированной миРНК РНКазой с последующим электрофоретическим разделением в агарозном геле позволили установить, что SiO₂-МК эффективно защищают миРНК от деградации под действием РНКазы (рисунок 3.12). Это крайне важно для использования SiO₂-МК в качестве средств доставки миРНК в клетки.

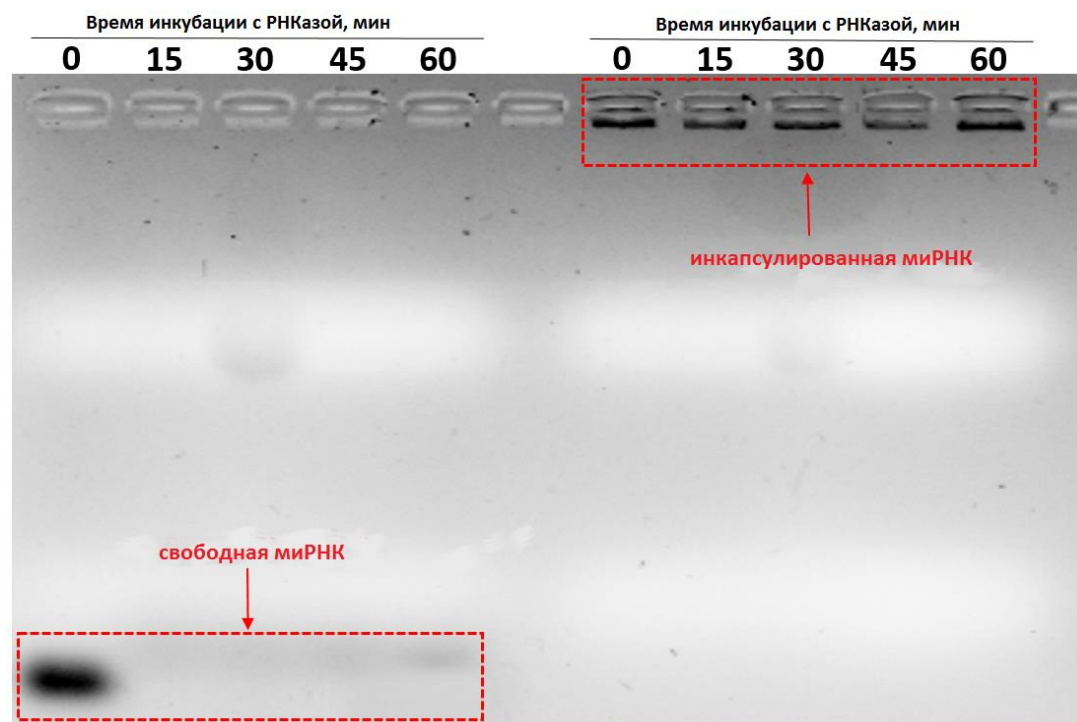
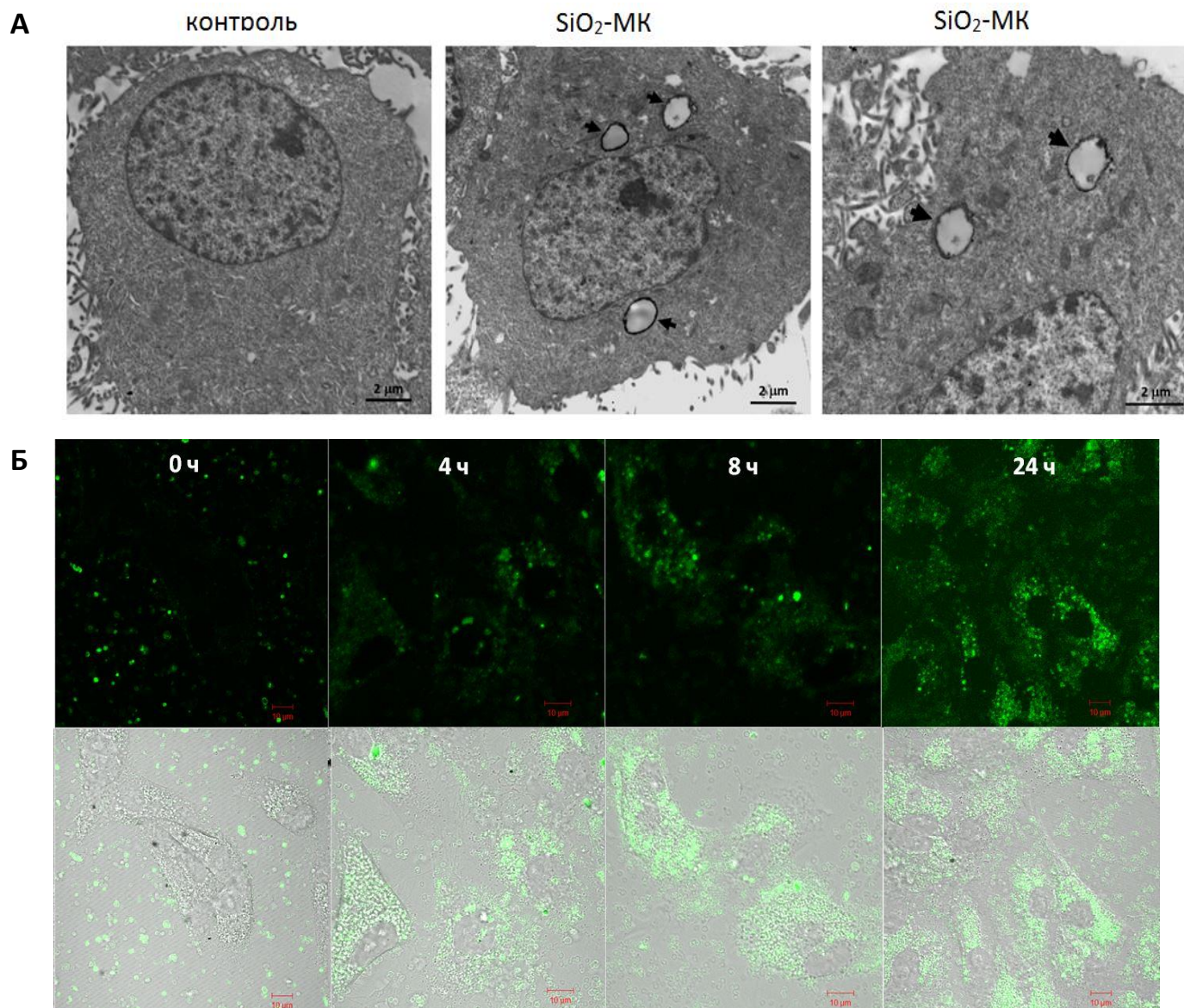


Рисунок 3.12 – Электрофоретическое разделение в 2,5 % агарозном геле миРНК-ROX неинкапсулированной и инкапсулированной в SiO₂-МК (выровненных по количеству вещества миРНК) после обработки РНКазой с различными временными интервалами.

Изучение эффективности захвата SiO₂-МК клетками A549 с использованием конфокальной и электронной микроскопии (рисунок 3.13), а также проточной цитометрии позволило установить, что капсулы локализуются в цитоплазме абсолютного большинства (до 92%) клеток в исследованный интервал времени (4-24ч) (рисунок 3.14). При этом через 24 ч после введения наблюдается частичное освобождение ROX-миРНК из капсул и их диффузное перераспределение по

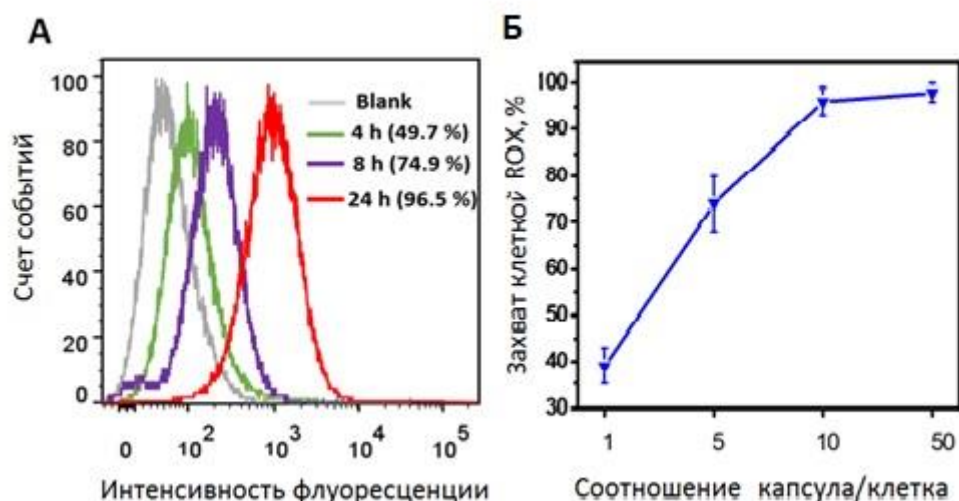
цитоплазме. SiO_2 -МК не обнаруживают цитотоксического действия при концентрации до 10 капсул на клетку (рисунок 3.15).

Таким образом, мы охарактеризовали комплексы миРНК с МГХ, КХ, ПЭИ и SiO_2 -МК. По результатам этих экспериментов, SiO_2 -МК были выбраны для дальнейших экспериментов по доставке миРНК внутрь клетки.



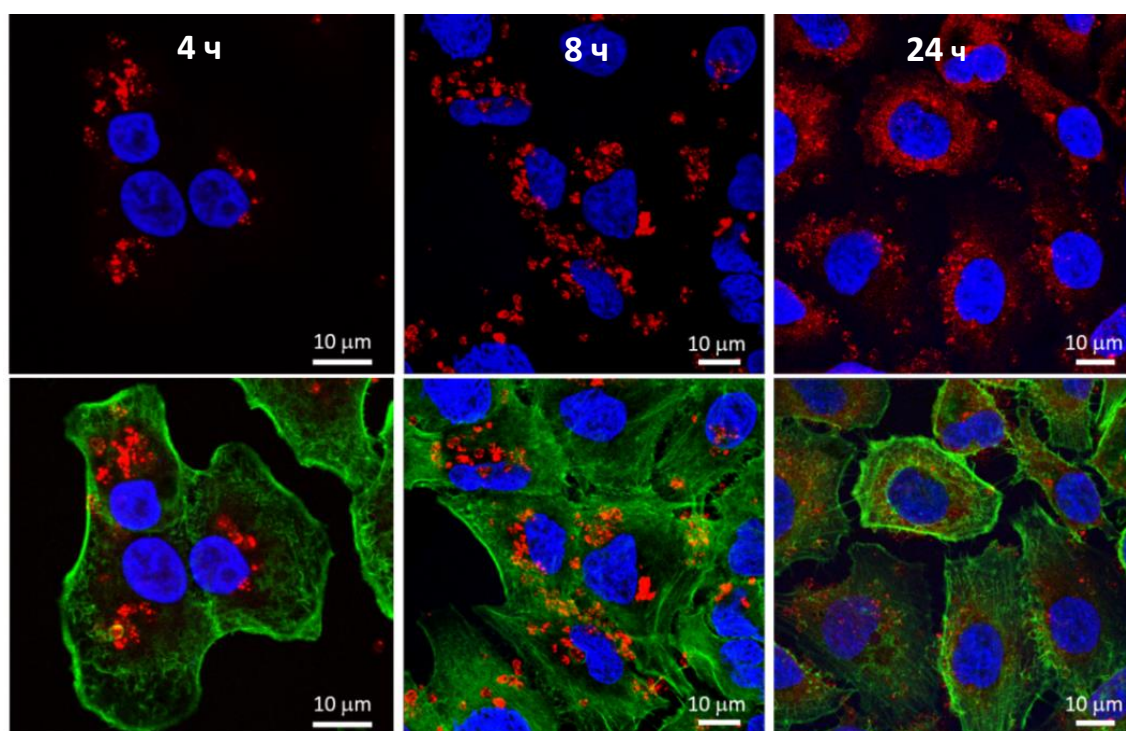
А- Изображение, полученное с помощью просвечивающей электронной микроскопии, подтверждающее интернализацию SiO_2 -МК. Б- Изображение, полученное с помощью конфокальной лазерной микроскопии, подтверждающие интернализацию SiO_2 -МК, содержащих миРНК-FAM, с различными временными интервалами от 0 до 24 часов

Рисунок 3.13 – Интернализация капсул в клетках А549 и внутриклеточное распределение миРНК-FAM



А- Оценка клеточного поглощения (захвата) $\text{SiO}_2\text{-МК}$, содержащих миРНК-ROX, для клеток A549 в различные интервалы времени 4-24 часа. Б- Влияние соотношения капсула/клетка на клеточное поглощение миРНК-ROX

Рисунок 3.14 – Данные проточной цитометрии по захвату $\text{SiO}_2\text{-МК}$ клетками



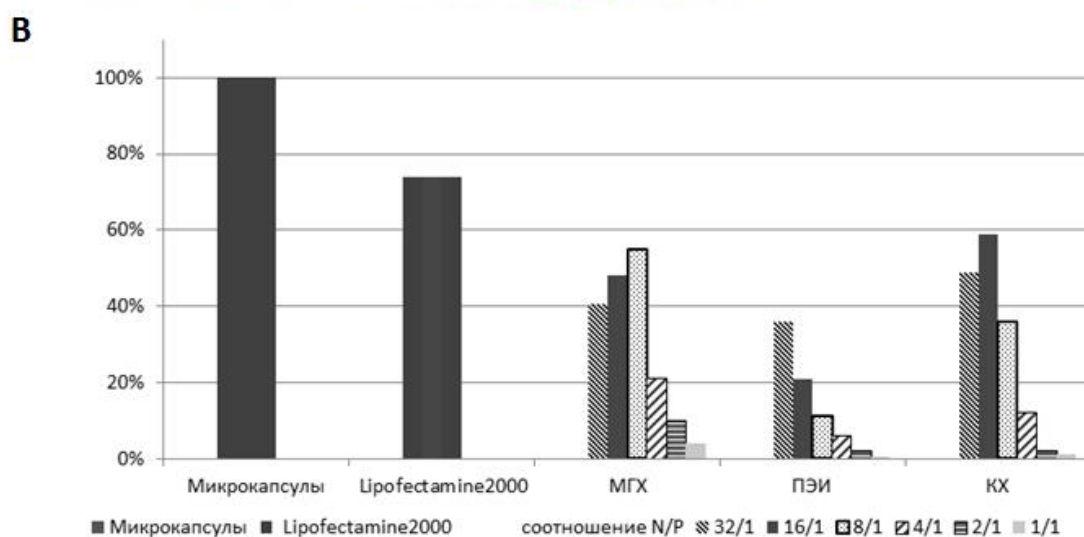
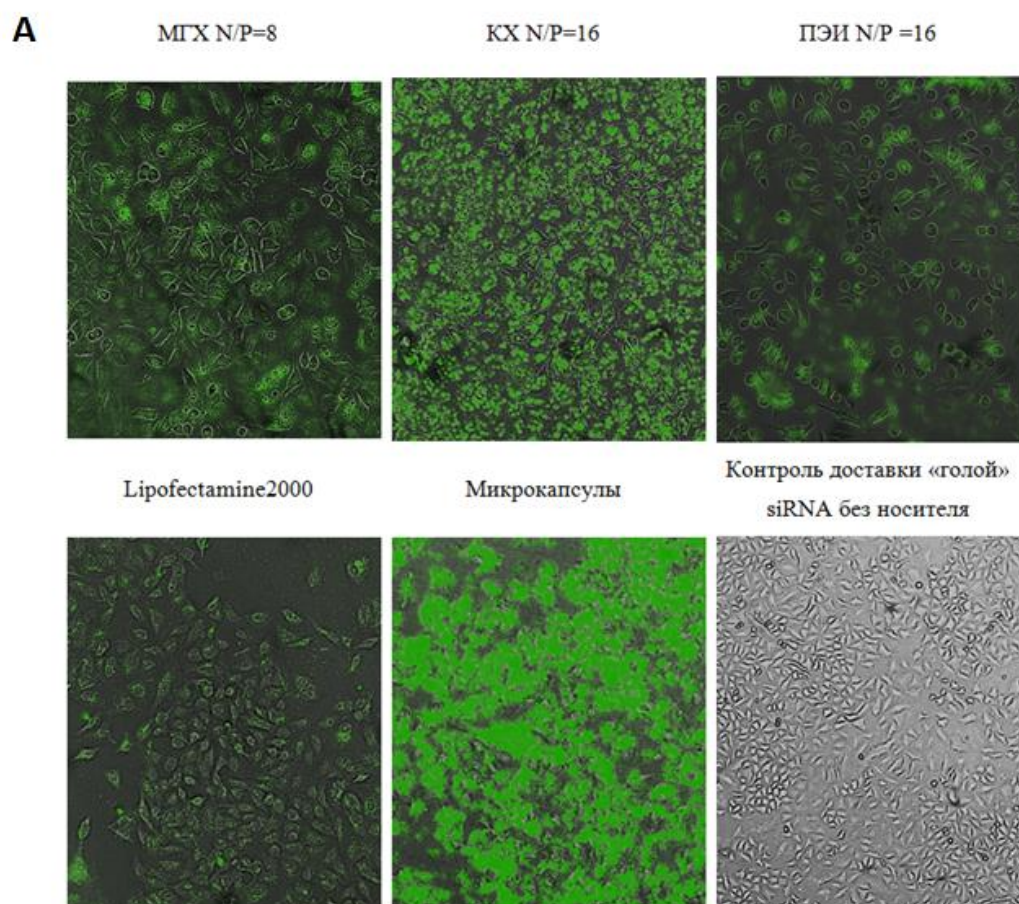
Ядра клеток окрашены DAPI (синий). F-актин окрашен AF-488 PL (зеленый) миРНК-ROX (красный).

Рисунок 3.15 – Интернализация $\text{SiO}_2\text{-МК}$ + миРНК-ROX в клетках A549 и внутриклеточное распределение миРНК-FAM с различными временными интервалами от 4 до 24 часов, по данным конфокальной лазерной микроскопии

3.4. Сравнение эффективности внутриклеточной доставки миРНК в комплексе с производными хитозана, ПЭИ и SiO₂-МК

Ранее было показано, что доставка миРНК, находящихся в комплексах с поликатионами МГХ, КХ и ПЭИ при N/P больше или равным 2, внутрь клетки начинается уже через 5 минут инкубации [126]. Согласно протоколу по использованию ЛФ, являющемуся контролем внутриклеточной доставки нуклеиновых кислот, рекомендуемое время экспозиции миРНК составляет не менее 4 часов. При использовании системы доставки на основе микрокапсул показано, что их захват эндосомами происходит в течение первых 15 минут после введения, начало высвобождения миРНК в клетке в процессе разрушения капсул начинается через 4 часа и полностью завершается через 24 часа [126,127].

Учитывая отличающиеся данные по времени доставки миРНК для разных носителей, провели их сравнительное исследование с использованием флуоресцентно меченой миРНК, содержащей FAM на 3'-конце (FAM-PA-1630). В случае исследуемых поликатионов подготовили несколько вариантов комплексов с FAM-PA-1630 с соотношениями N/P, равными 16, 8, 4, 2 и 1, которые находятся в диапазоне концентраций, вызывающих менее 30% гибели клеток в монослое. Помимо поликатионов для доставки FAM-PA-1630 в клетки использовали SiO₂-МК, а также ЛФ. Через 24 часа после внесения препаратов максимально эффективную доставку FAM-PA-1630 наблюдали для микрокапсул. В случае использования поликатионов МГХ, КХ и ПЭИ наблюдали прямую зависимость интенсивности флуоресценции в клетках от соотношения N/P (рисунок 3.16).



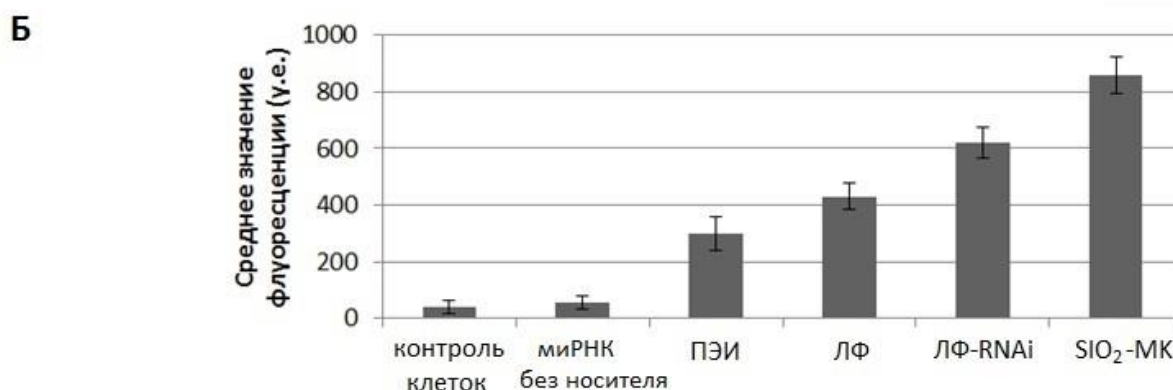
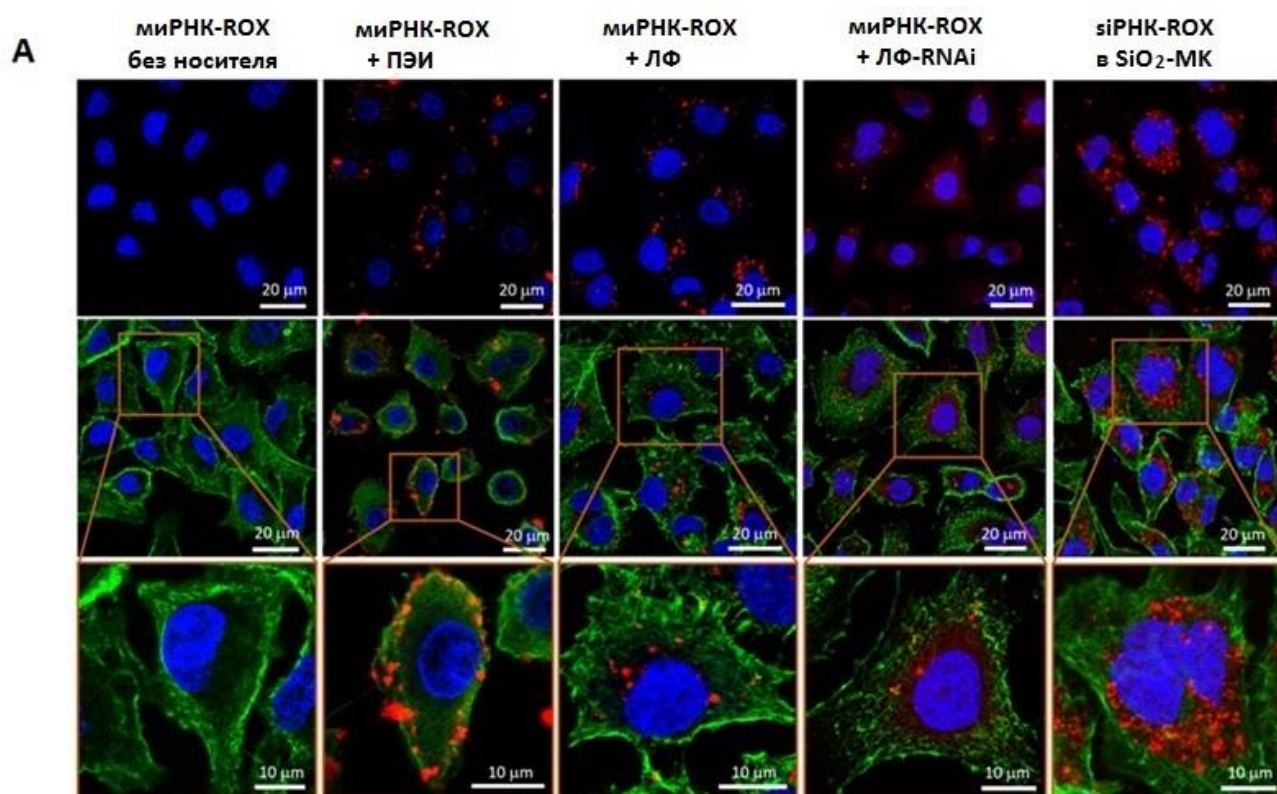
A- Визуальное сравнение поликатионной доставки FAM-PA-1630 для наиболее эффективных и наименее токсичных соотношений N/P, ЛФ и SiO₂-МК. B- Относительная эффективность (по оси ординат) доставки FAM-PA-1630 различными системами, нормированная на количество клеток.

Рисунок 3.16 – Сравнение эффективности внутриклеточной доставки миРНК в комплексах с ПЭИ, МГХ, КХ, ЛФ и SiO₂-МК. Изображения получены с помощью системы формирования изображений Cytell Cell Imaging System [126].

Для более корректного и полуколичественного анализа сравнения эффективности систем доставки миРНК использовали конфокальную микроскопию фиксированных препаратов клеток A549 с доставкой ROX-миРНК в комплексе с ЛФ-RNAi, ЛФ, ПЭИ (N/P=8) и SiO₂-МК (в соотношении 5 капсул на клетку).

После 24 ч инкубации клеток A549 с миРНК методом конфокальной микроскопии установили, что эффективность внутриклеточной доставки ROX-миРНК в клетки A549 с помощью SiO₂-МК значительно превосходит эффективность доставки с помощью ПЭИ (на 70%), ЛФ (на 45%), ЛФ-RNAi (на 30%). Средняя интенсивность флуоресценции поглощения ROX-миРНК наблюдалась в следующем порядке: SiO₂-МК > ЛФ-RNAi > ЛФ > ПЭИ > свободная ROX-миРНК без носителя (рисунок 3.17). Кроме того, был проведен анализ методом ОТ-qПЦР с использованием набора для амплификации miРНК, а затем гель-электрофорез продуктов ПЦР, чтобы подтвердить присутствие миРНК в клетках после 24-часовой инкубации с различными системами доставки (рисунок 3.18).

Сравнительная оценка токсичности исследуемых систем доставки, обнаруживает максимально низкую токсичность для системы SiO₂-МК, при нормировании на максимально возможно доставляемое количество миРНК через 24 часа после трансфекции (рисунок 3.19). Примечательно, что максимальную токсичность и снижение процента выживших клеток, до 55%, после трансфекции показал ПЭИ



А- Изображения, полученные методом конфокальной микроскопии клеток A549, с предварительной 24 ч. инкубацией комплексов миРНК—ROX с поликатионом, липофектамино, микрокапсулами, а также свободной миРНК (без носителя). Ядра клеток окрашены DAPI (синий), F-актин окрашен AF-488 PL (зеленый), миРНК-ROX (красный). Б- Средняя интенсивность флуоресценции метки ROX в фиксированных клетках A549 через 24 часа после внесения комплексов миРНК—ROX с различными носителями, определяемая при анализе изображений конфокальной микроскопии

Рисунок 3.17 – Сравнение эффективности доставки миРНК-ROX для различных систем доставки в клетки.

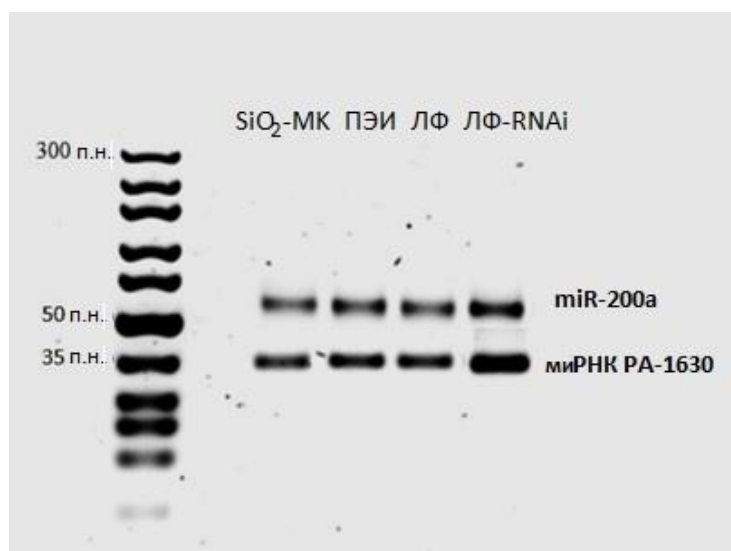


Рисунок 3.18 – Электрофоретическое разделение в 1% агарозном геле продуктов ПЦР, полученных при амплификации целевой миРНК (РА-1630-ROX) и клеточной микроРНК (miR-200a), из пула малых РНК выделенного из клеток А549 через 24 часа после внесения в них миРНК—ROX с различными носителями.

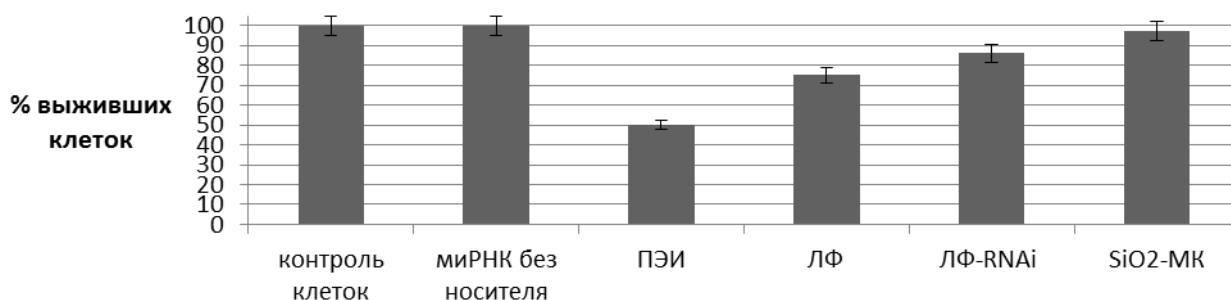


Рисунок 3.19 – Сравнение цитотоксического действия миРНК-ROX в комплексе с ПЭИ, ЛФ, SiO₂-МК и без носителя после их инкубации с клетками А549 в течение 24 ч.

Таким образом, показали, что SiO₂-МК наиболее эффективно по сравнению с МГХ, КХ, ПЭИ и ЛФ доставляют миРНК в клетки, при этом обладая самой низкой цитотоксичностью

3.5. Сравнение противовирусной активности миРНК в комплексе с производными хитозана, ПЭИ и SiO₂-МК

Для сравнения противовирусной активности миРНК, доставляемых в клетку изучаемыми носителями, провели оценку ингибирования вирусной репликации

ВГА методами РГА и ИФА. Для этого использовали две миРНК: NP-1496 и PA-1630. Противовирусная активность NP-1496 была показана в ряде работ как максимально эффективная при доставке методом электропорации [13], а также при образовании с предшественника в процессе экспрессии плазмидной ДНК [64], то есть без учета вклада системы носителя. PA-1630 была нами подобрана в процессе выполнения работы (см. п. 3.2). Вирус ингибирующее действие препаратов миРНК с носителями исследовали для штамма A/PR/8/34 на клетках A549 и MDCK. Доза миРНК во всех случаях была постоянной и составляла 0,125 мкМ.

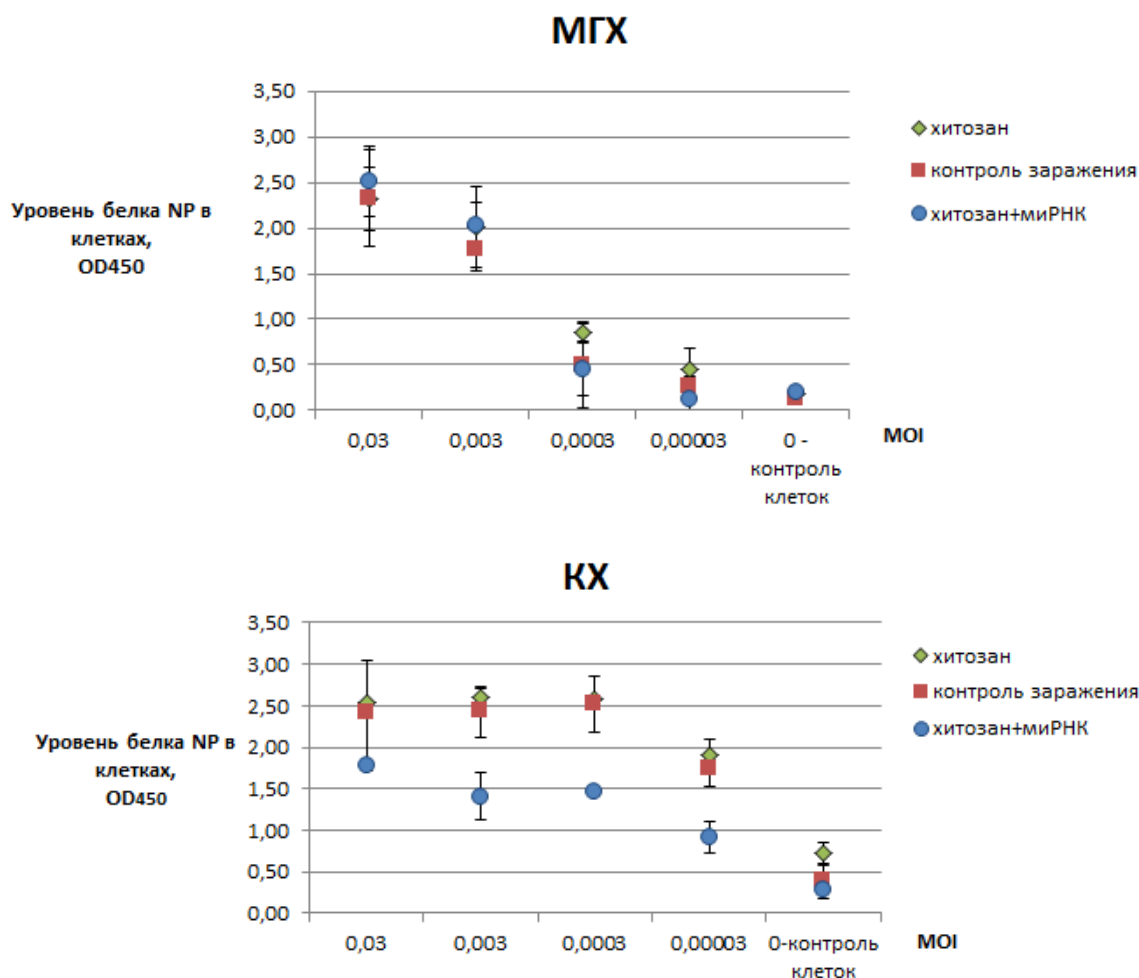
Для оценки противовирусной активности препаратов миРНК, доставляемых поликатионами (КХ, МГХ и ПЭИ), в сравнении с ЛФ использовали профилактическую схему введения за 24 часа до заражения. Непосредственно перед заражением клетки отмывали от не вошедших внутрь препаратов миРНК и заражали вирусом в множественности заражения 0,1 MOI. Затем проводили оценку противовирусной активности методом РГА (таблица 3.4).

Анализируя полученные результаты, пришли к выводу, что метод РГА не может быть использован для оценки противовирусной активности препаратов, содержащих МГХ и КХ. Причиной, вероятно, является способность хитозана связываться с НА ВГА за счет наличия большого количества активных положительно заряженных аминогрупп. При этом для исследуемых комплексов миРНК с хитозанами было возможно наблюдать цитопатическое действие вируса и определять вирусные белки методом ИФА (рисунок 3.20). Независимо от дозы заражения не было выявлено ингибирующего действия миРНК в комплексе с МГХ. В то же время, наблюдалось достоверное снижение уровня вирусного белка NP в клетках при воздействии миРНК в комплексе с КХ для малых доз заражения (<0.03 MOI). В случае ПЭИ и ЛФ методом РГА продемонстрировано снижение вирусной репродукции с помощью миРНК, однако оно было показано, в том числе, и для неспецифической миРНК.

Таблица 3.4 – Противовирусная активность миРНК в комплексе с ЛФ, ПЭИ, МГХ и КХ, введенных за 24 часа до заражения клеток MDCK вирусом A/PR/8/34 (0,01 MOI). Результаты РГА ВКЖ, полученных от инфицированных клеток.

	ЛФ	ПЭИ	МГХ	КХ
Контроль заражения	1/256			
Носитель без миРНК	1/256	1/128	н/о	н/о
NP-1496	1/128	1/8	н/о	н/о
РА-1630	1/128	1/8	н/о	н/о
Негативная миРНК	1/128	1/16	н/о	н/о

В таблице представлены единицы РГА для титрования ВКЖ, полученных от клеток через 72 часа после заражения.

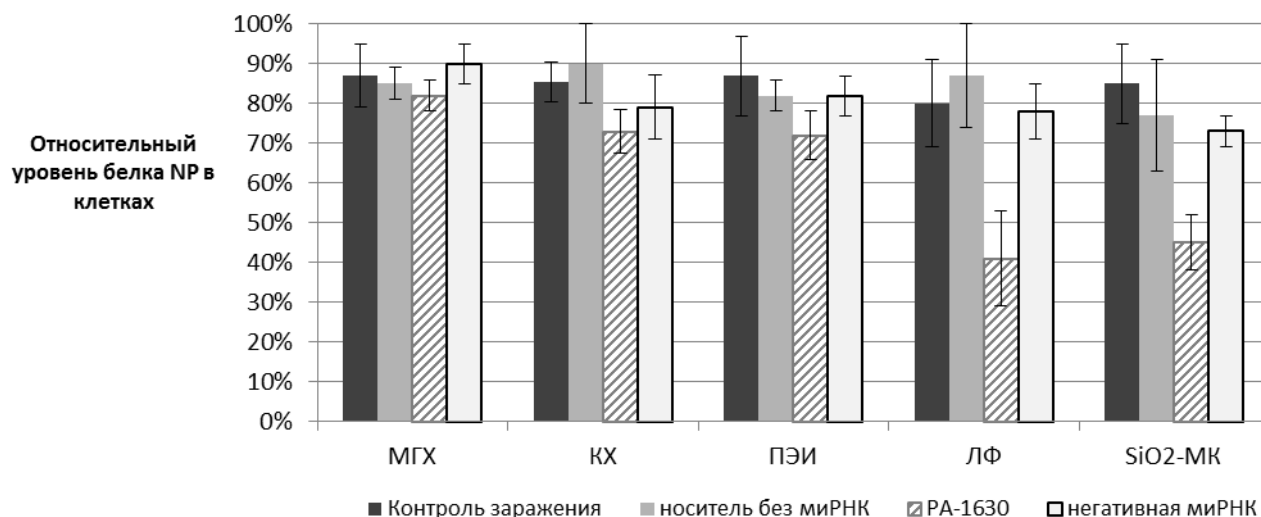


На диаграммах показаны стандартные отклонения по 8 повторам ($p < 0,05$)

Рисунок 3.20 – Противовирусная активность анти-NP миРНК в комплексе с хитозанами МГХ и КХ, введенных за 24 часа до заражения клеток MDCK вирусом A/PR/8/34 (0,03 - 0,00003 MOI). Уровень белка NP ВГА определен методом ИФА в фиксированных инфицированных клетках.

Далее провели сравнительное исследование противовирусной активности препаратов миРНК с различными носителями на клеточной культуре A549. Для определения вирусной нагрузки также использовали методы РГА и ИФА с моноклональными антителами 6D11 к NP ВГА (рисунок 3.21). В случае постановки ИФА для заражения клеток A549 использовали меньшую дозу вируса (0,01 MOI). При сравнении вирус-ингибирующего действия миРНК анти-РА (РА-1630) в комплексе с различными носителями, оцененного методом ИФА через 72

часа после заражения, достоверное снижение уровня вирусного белка NP в клетках наблюдали только для ЛФ и микрокапсул. Для обоих поликатионов снижение вирусного белка было незначительным и сопоставимым с эффектом, оказываемым неспецифической миРНК или самой системой доставки.



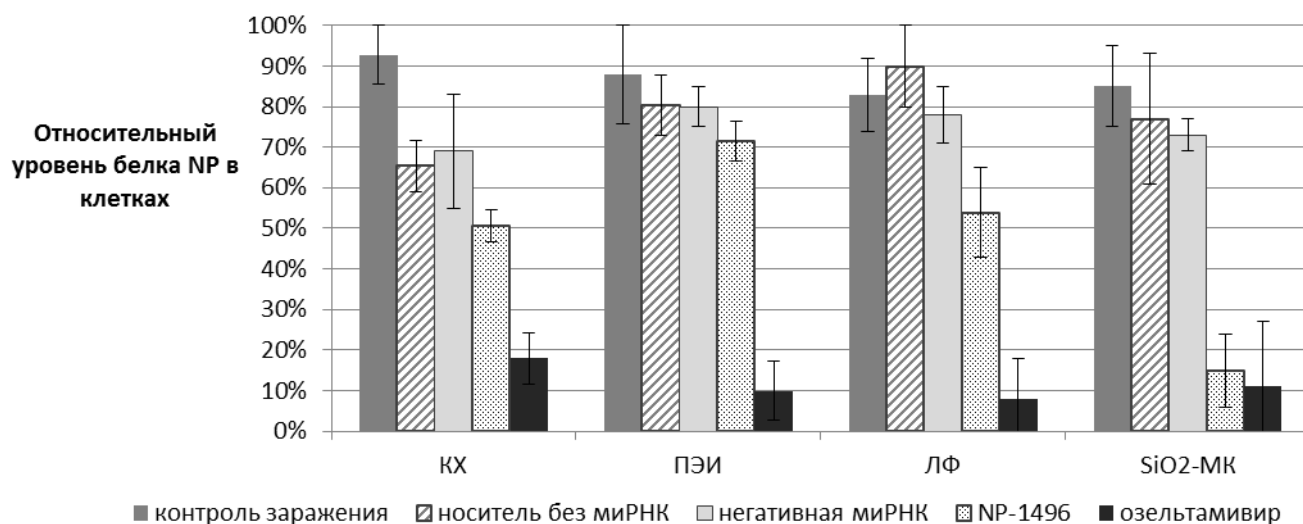
На диаграмме за 100% принят уровень максимального значения среди всех групп; показаны стандартные отклонения по 8 повторам ($p < 0,05$)

Рисунок 3.21 – Противовирусная активность миРНК РА-1630 в комплексе с МГХ, КХ, ПЭИ, ЛФ-RNAi и SiO₂-МК, введенной за 24 часа до заражения клеток A549 вирусом A/PR/8/34 (0,01 MOI). Относительный уровень белка NP ВГА, определенный методом ИФА в фиксированных инфицированных клетках.

Также при тестировании препаратов миРНК на клеточной культуре A549 (при использовании большей дозы заражения, равной 1 MOI) было показано снижение вирусной репродукции по РГА (в 2-4 раза по сравнению с контролем заражения) для комплексов миРНК с ПЭИ и ЛФ, однако также снижение вирусной репродукции в 2 раза наблюдалось и для негативной миРНК. Тем не менее, для системы микрокапсул было продемонстрировано снижение вирусной репродукции по РГА в 2-8 раз по сравнению с негативной миРНК.

На рисунке 3.22 представлена объединенная диаграмма по результатам ИФА различных независимых экспериментов на клеточной культуре A549 для

сравнения эффективности ингибирования сегмента NP с помощью миРНК NP-1496 в комплексе с ПЭИ, КХ, ЛФ и SiO₂-МК по относительному уровню NP в клетках по сравнению с контролем заражения, отрицательным контролем пустой системы доставки, негативной миРНК, а также действием референсного препарата озельтамивира. Уровень вирусного белка в клетках после воздействия препарата микрокапсул с целевой миРНК NP-1496 значительно снижается по сравнению с контролем заражения, однако не превышает уровень белка, после воздействия вирус-специфическим ингибитором NA. Влияние пустых микрокапсул на повышение или понижение уровня инфекции в клетках и культуральной жидкости не выявлено. Относительное вирус-ингибирующее действие препарата инкапсулированной миРНК превосходит эффект препаратов миРНК с поликатионами и ЛФ. Полученные результаты свидетельствуют, что микрокапсулы являются наиболее оптимальным и эффективным из всех исследуемых способом доставки противовирусных миРНК. Поэтому для проведения дальнейших экспериментов по разработке противовирусного препарата на основе синтетических миРНК было принято решение использовать именно их.



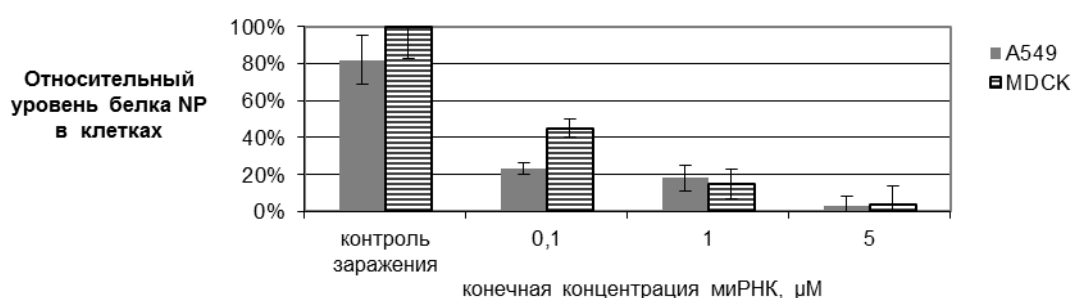
*На диаграмме за 100% принят уровень максимального значения среди всех групп;
показаны стандартные отклонения по 8 повторам ($p < 0,05$)*

Рисунок 3.22 – Противовирусная активность миРНК NP-1496 в комплексе с КХ, ПЭИ, ЛФ-RNAi и SiO₂-МК, введенной за 24 часа до заражения клеток A549

вирусом A/PR/8/34 (0,01 MOI). Относительный уровень белка NP ВГА, определенный методом ИФА в фиксированных инфицированных клетках.

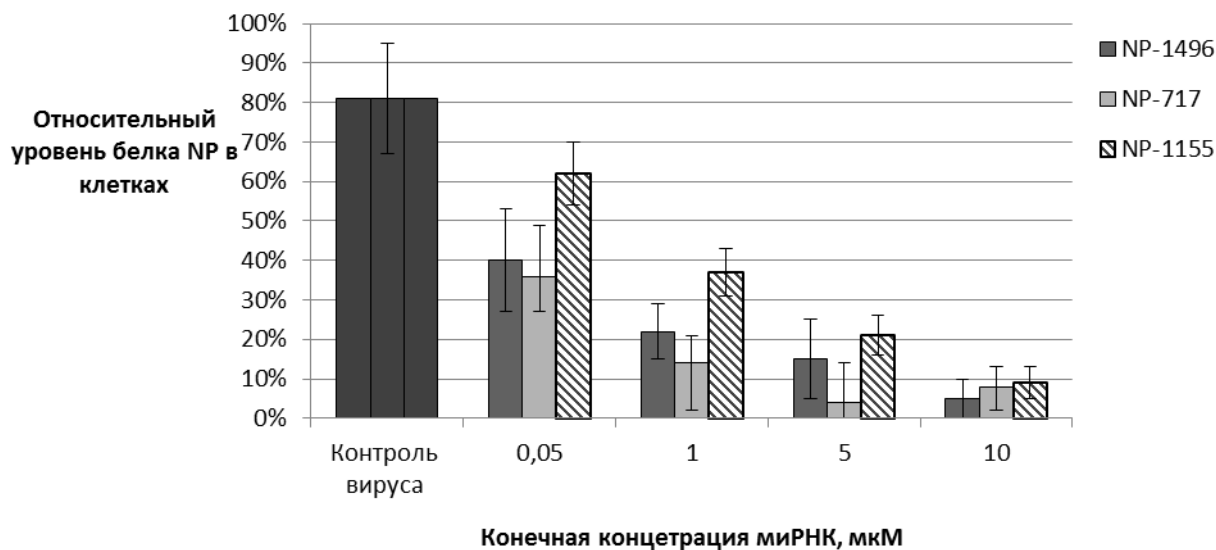
3.6. Оценка противовирусного действия композиции миРНК, инкапсулированных в SiO₂-МК.

В пункте 3.5 было продемонстрировано, что микрокапсулы являются наиболее эффективной системой доставки по сравнению с другими изучаемыми нами в данном исследовании. Далее было проведено исследование дозовой зависимости эффективностей подавления экспрессии гена *NP* и вирус-ингибирующей способности препаратами инкапсулированной миРНК на клеточных культурах MDCK и A549. Клетки трансфецировали микрокапсулами, содержащими миРНК NP-1496 (0,1 мкмоль - 5 мкмоль), за 24 часа до заражения штаммом A/PR/8/34 в дозе 0,01 MOI. Через 24 и 72 часов после инфицирования клеток было обнаружена тенденция к снижению титра вторичного потомства вируса по реакции гемагглютинации. Через 72 часа после для обеих клеточных линий, было обнаружено снижение уровня NP в клетках под воздействием инкапсулированной миРНК (рисунок 3.23). Также был продемонстрирован дозозависимый эффект снижения уровня экспрессии NP в клетках под действием миРНК подобранными в п. 3.1 NP-717 и NP-1155 в диапазоне концентраций 0,1–10 мкмоль (рисунок 3.24).



На диаграмме за 100% принят уровень белка в клетках инфекционного контроля; показаны стандартные отклонения по 4 повторам ($p < 0,05$)

Рисунок 3.23. Противовирусная активность миРНК NP-1496, инкапсулированной в SiO₂-МК, введенных за 24 часа до заражения клеток A549 и MDCK вирусом A/PR/8/34 (0,01 MOI). Относительный уровень белка NP ВГА, определенная методом ИФА в фиксированных инфицированных клетках.

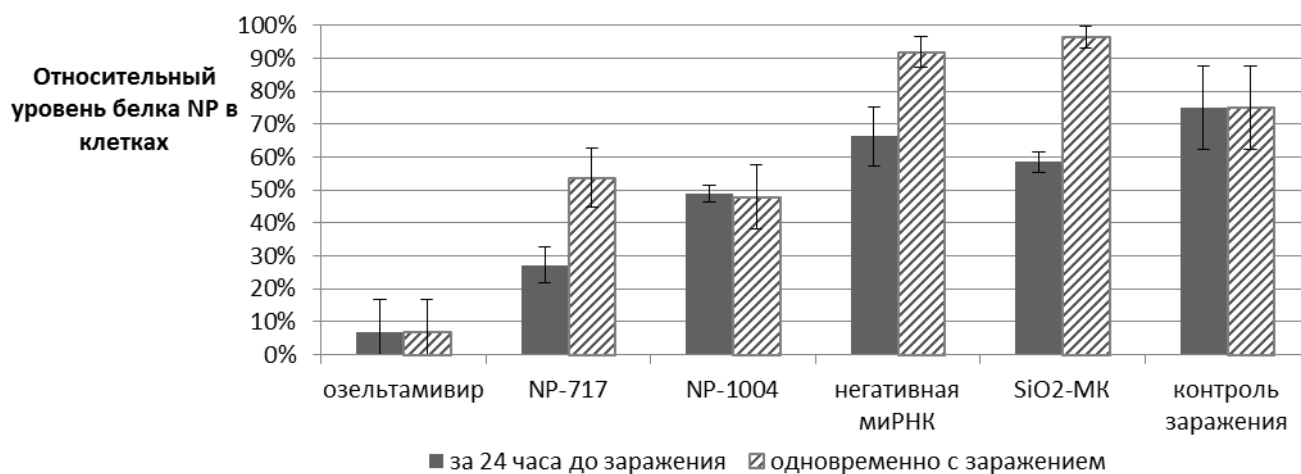


На диаграмме за 100% принят уровень белка в клетках инфекционного контроля; показаны стандартные отклонения по 8 повторам ($p < 0,001$)

Рисунок 3.24 – Противовирусная активность анти-NP (NP-1496, NP-717 и NP-1155) миРНК инкапсулированных в SiO₂-МК, введенных за 24 часа до заражения клеток A549 вирусом A/PR/8/34 (0,01 MOI). Относительный уровень белка NP ВГА, определенный методом ИФА в фиксированных инфицированных клетках.

Также было исследовано наличие вирус-ингибирующего действия препарата SiO₂-МК-миРНК при введении микрокапсул одновременно с заражением клеток вирусом. Было изучено вирус-ингибирующее действие инкапсулированных миРНК при их введении одновременно с заражением клеток. (т.е. при смене среды, содержащей вирус, на поддерживающую см. п. 2. Материалы и методы). На суточный клеточный монослой A549 вносили среду с вирусом, оставляли на контакт 30 минут, затем среду отбирали и вносили препараты SiO₂-МК-миРНК (NP-1496, NP-717, NP-1004), разведенные на поддерживающей среде без сыворотки с трипсином. В этом случае для пустых SiO₂-МК наблюдалось повышение уровня белка NP в инфицированных клетках по сравнению с контрольными. Под воздействием SiO₂-МК, содержащих миРНК, через 72 часа после заражения наблюдалось снижение уровня NP в клетках по

сравнению с пустыми SiO₂-МК, однако этого было недостаточно, чтобы говорить о противовирусном действии (рисунок 3.25).



На диаграмме за 100% принят уровень белка в клетках инфекционного контроля; показаны стандартные отклонения по 8 повторам ($p < 0,05$)

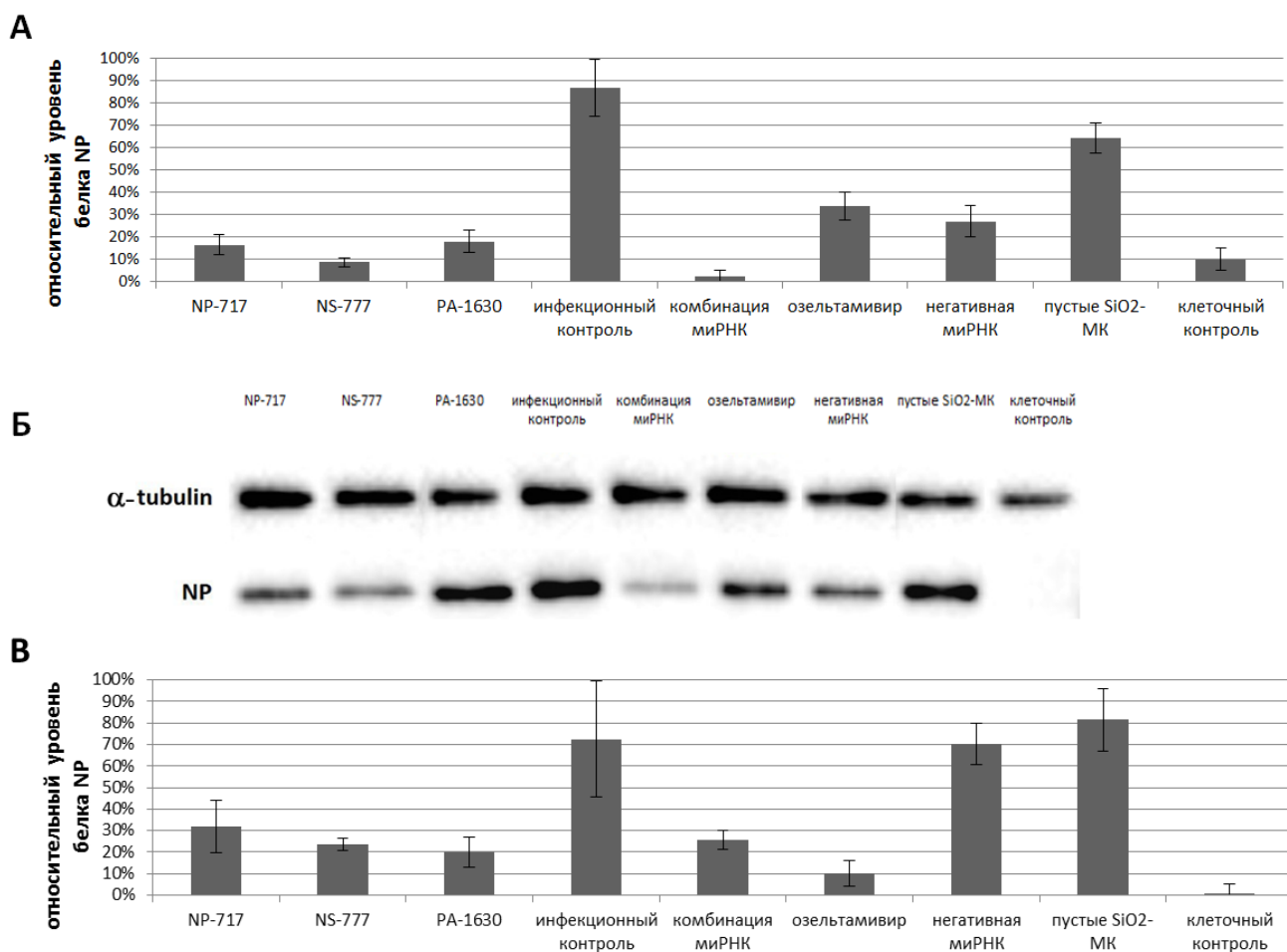
Рисунок 3.25 – Противовирусная активность анти-NP миРНК

инкапсулированных в SiO₂-МК, введенных за 24 часа и одновременно с заражением клеток A549 вирусом A/PR/8/34 (0,01 MOI). Относительный уровень белка NP ВГА, определенный методом ИФА в фиксированных инфицированных клетках.

Высокая ёмкость загрузки SiO₂ – МК позволяет проводить инкапсуляцию *in situ* одновременно нескольких миРНК. Эта возможность была использована нами в экспериментах по одновременной загрузке в SiO₂-МК смеси из наиболее эффективных противовирусных миРНК, отобранных на этапе скрининга антивирусной активности: PA-1630 и NP-717. Было проведено сравнение ингибирования репликации вируса A/PR/8/34 (H1N1) в клетках A549 при инкубации клеток в течение 24ч с SiO₂-МК, содержащими коктейль из противовирусных миРНК, и при воздействии каждой из данных миРНК, инкапсулированных в SiO₂-МК, по отдельности. В состав коктейля вошли три миРНК, направленных на подавление генов PA, NP и NS ВГА. NS-777 была подобрана и охарактеризована в результате выполнения сопутствующих работ, проводимых в Отделе молекулярной биологии вирусов ФГБУ «НИИ гриппа»

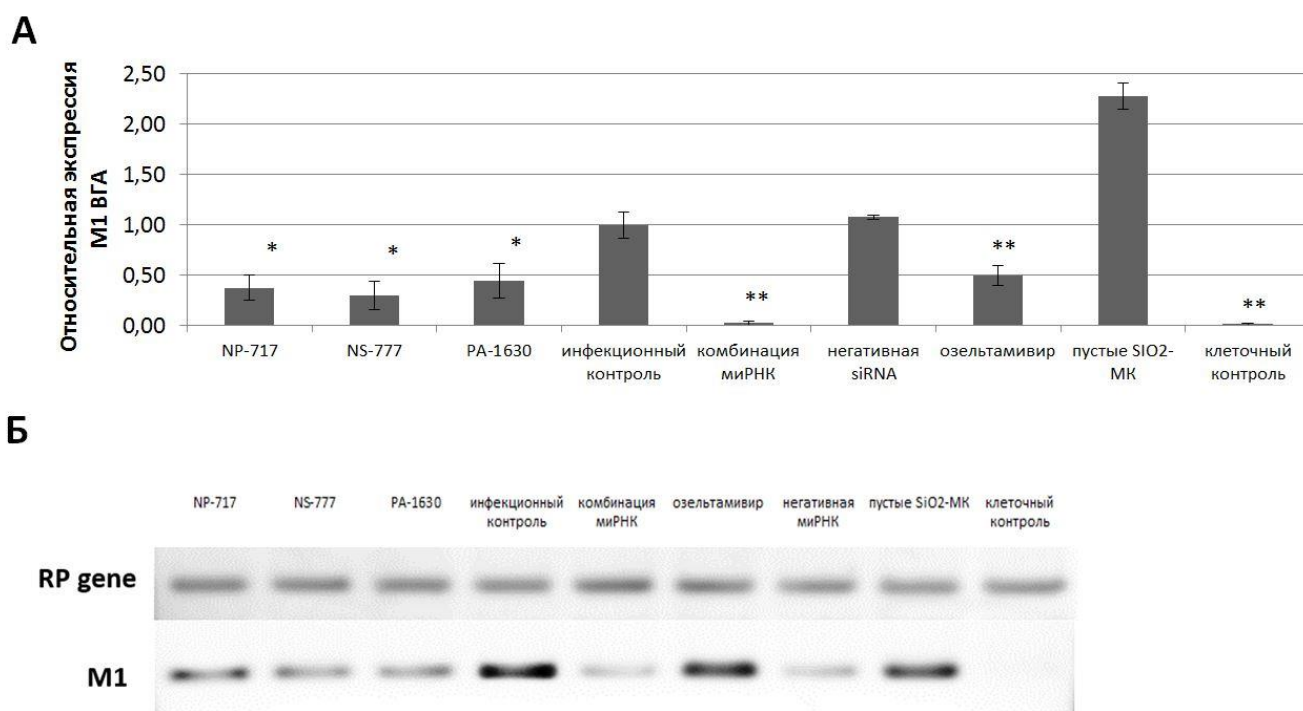
Минздрава России, по изучению роли гена *NS* в развитии вирусной инфекции. Концентрация по миРНК для всех препаратов была выровнена и составила 1 мкМ, для синтеза микрокапсул с комбинацией трех миРНК был использован раствор, содержащий эквимольное количество каждой миРНК и имеющий конечную концентрацию для смеси миРНК 6 пмоль/мкл (такую же концентрацию использовали для приготовления микрокапсул с одиночными миРНК). В качестве препарата сравнения был использован озельтамивир в концентрации 15 мкг/мкл. Установлено, что через 72 ч после инфицирования клеток уровень вирусного белка NP (по данным ИФА) достоверно снижался по сравнению с контролем в случае воздействия каждой из использованных противовирусных миРНК, однако комбинированный сайленсинг трёх вирусных генов обладал существенно большей эффективностью (рисунок 3.26 А). Вестерн-блот анализ клеточных лизатов также подтвердил сильное ингибирование целевого белка NP вируса гриппа в клетках после обработки препаратом SiO₂-МС с комбинацией трех миРНК (рисунок 3.26 В). Значительное снижение уровня белка NP в отличие от стабильного уровня α -тубулина (для образцов с выровненной концентрацией по общему белку) для образцов, с введением комбинации миРНК, превышает снижение уровня NP в образцах, с введением одиночных миРНК. Также уровень NP, определяемый этими двумя методами, снижен по сравнению с уровнем в образцах после введения озельтамивира. Однако данное наблюдение не может служить фактом, подтверждающим большую противовирусную активность препарата миРНК в микрокапсулах, т.к. озельтамивир является препаратом ингибирующим выход зрелого вируса из клетки, не препятствуя транскрипции вирусных мРНК и накоплению вирусных белков. Тем не менее на малых дозах заражения общий эффект от снижения репродукции вируса на снижение экспрессии вирусных генов наблюдается и для озельтамивира, что подтверждается ИФА в фиксированных клетках и вирус-содержащей культуральной жидкости (Рисунок 3.26 С). Аналогичные результаты были получены при использовании другого метода оценки – ПЦР в режиме реального времени для анализа уровня мРНК M1 (рисунок 3.27). Этот факт ясно

свидетельствует о действительном снижении уровня вирусной репликации при воздействии инкапсулированных миРНК, поскольку мРНК М1 не была прямой мишенью РНК-интерференции в наших экспериментах. Нужно подчеркнуть, что эффективность ингибирования вирусной репликации в случае комбинированной миРНК-терапии тремя инкапсулированными антивирусными миРНК оказалась выше, чем эффективность препарата сравнения озельтамивира (в действующей концентрации 15 мкг/мл). Это делает разрабатываемую нами систему действенным и высоко конкурентным потенциальным противовирусным средством.



А- Относительный уровень белка NP ВГА, определенный методом ИФА в фиксированных инфицированных клетках. На диаграмме за 100% принят уровень NP в контрольных инфицированных клетках, показаны стандартные отклонения по 8 повторам ($p < 0,01$). Б- Вестерн-блот клеточных лизатов, нормированный на белок альфа-тубулин. В- Относительный уровень белка NP ВГА, определенный методом ИФА в ВКЖ от инфицированных клеток. На диаграмме за 100% принят уровень NP в ВКЖ контроля заражения, показаны стандартные отклонения по 8 повторам ($p < 0,001$)

Рисунок 3.26 – Сравнение противовирусной активности комбинации из трех и одиночных миРНК, инкапсулированных в SiO₂-МК, при введении в клетки A549 за 24 часа до заражения вирусом A/PR/8/34 (0,01 MOI).



А- Относительная экспрессия мРНК M1 в лизатах инфицированных клеток. На диаграмме показаны стандартные отклонения по 3 повторам (* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$). В- Электрофоретическое разделение в 1% агарозном геле, с окрашиванием EtBr ПЦР продуктов амплификации генов M1 и RP, для наглядной демонстрации снижения уровня экспрессии гена M1

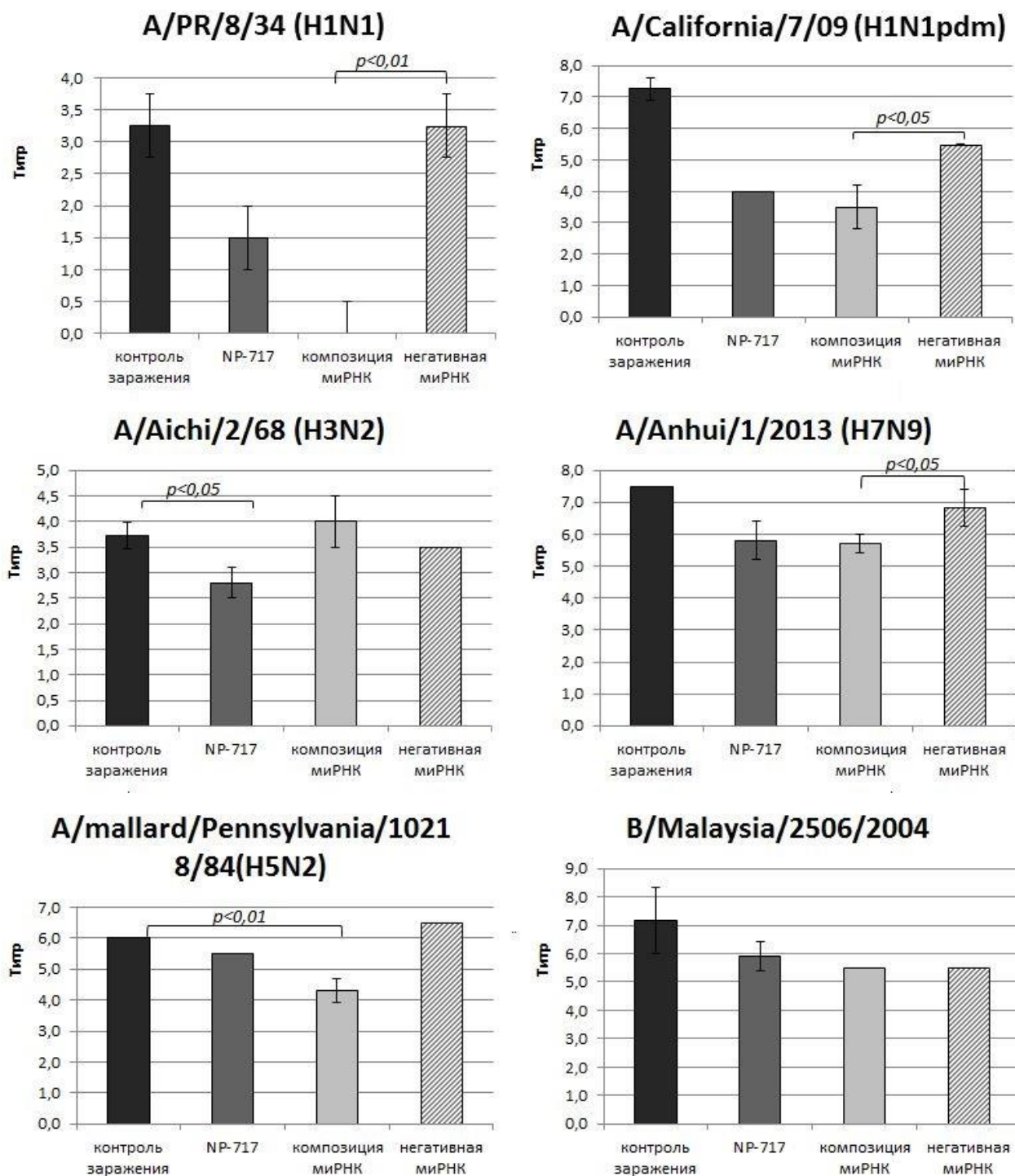
Рисунок 3.27 – Рисунок 11 – Сравнение противовирусной активности комбинации из трех и одиночных миРНК, инкапсулированных в SiO₂-МК, при введении в клетки A549 за 24 часа до заражения вирусом A/PR/8/34 (0,01 MOI).

Поскольку подобранные нами миРНК направлены на наиболее консервативные участки генов, предположительно они должны вызывать сайленсинг вирусных генов при инфицировании клеток различными штаммами ВГА. Мы исследовали эффективность ингибирования репликации ВГА, относящихся к нескольким подтипам: A/PR/8/34 (H1N1); A/California/7/09 (H1N1_{pdm09}); A/Aichi/2/68 (H3N2), A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2); A/Anhui/1/13 (H7N9), а также вируса гриппа B/Malaysia/2506/2004 с помощью комбинации из трёх миРНК, инкапсулированных в SiO₂-МК. Для оценки подавления вирусной репликации мы использовали методику титрования вирусного потомства. Оказалось, что обработка клеток A549 комбинацией

инкапсулированных миРНК вызывает сильный и специфический противовирусный эффект для ВГА нескольких подтипов (H1N1, H5N2, H7N9), приводя к снижению титра вирусного потомства на 2-4 lgТЦД₅₀/мл (рисунок 3.28).

Снижение вирусной репродукции при титровании на культуре MDCK наблюдалось для всех образцов ВГА в случае профилактического введения инкапсулированных миРНК. Отсутствие ингибирования репродукции вируса гриппа В/Malaysia/2506/2004 объясняется тем, что он относится к типу В и имеет множество мутаций в целевых генах миРНК (рисунок 3.29).

Таким образом, предлагаемая нами система для миРНК-опосредованного ингибирования репродукции вируса гриппа *in vitro*, основанная на гибридных микроносителях, содержащих коктейль из миРНК к консервативным областям трёх вирусных генов, является действенным и универсальным противовирусным инструментом, обладающим низкой токсичностью и высокой эффективностью доставки миРНК в целевые клетки.



Результаты титрования вирусного потомства для образцов инфекционного контроля, комбинации из трех миРНК (PA-1630, NP-717 и NS-777) и одиночной миРНК NP-717, выраженные как I_8 TCD₅₀/мл. На диаграммах показаны стандартные отклонения для 3 повторов и значения p для достоверно отличающихся групп, Критерий Манна-Уитни

Рисунок 3.28 – Противовирусное действие инкапсулированных миРНК с микрокапсулами при заражении вирусами гриппа А разных подтипов и вирусом гриппа В на клеточной культуре MDCK

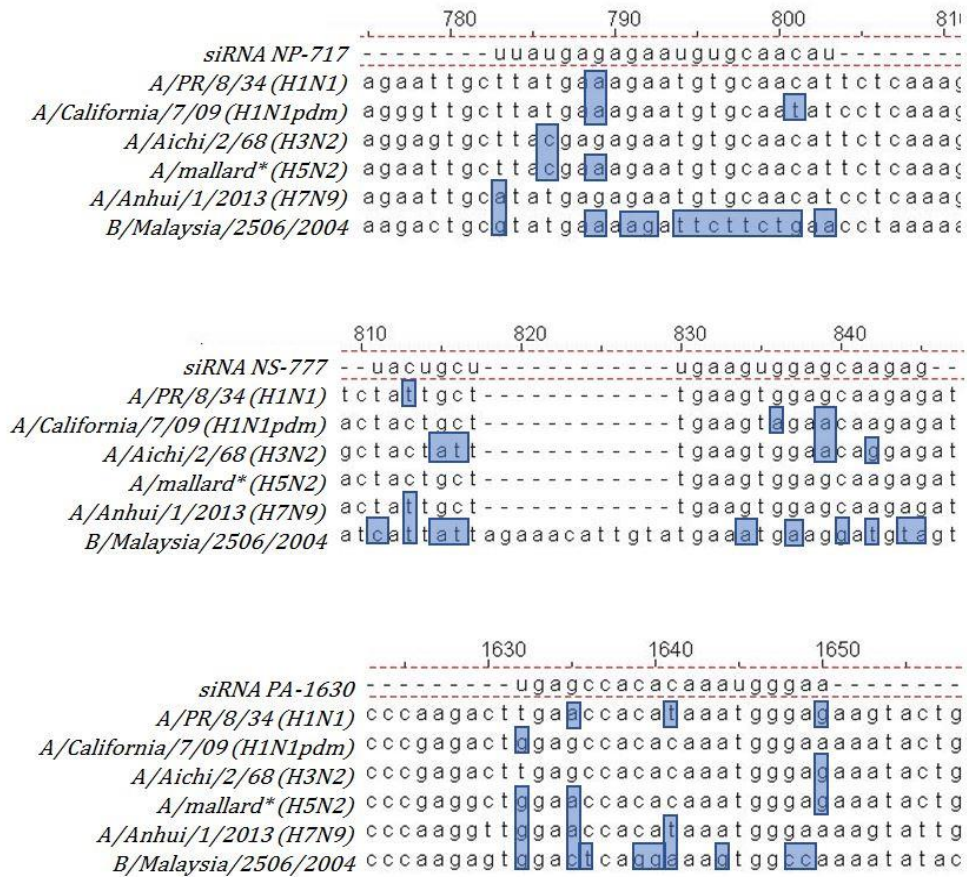


Рисунок 3.29 – Выравнивание участков генов NP, PA и NS штаммов вируса гриппа А и В, мишенных для инкапсулированных миРНК, синим выделены олигонуклеотидные замены, относительно последовательности консенсусных миРНК

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведено исследование противовирусного действия препаратов миРНК, направленных на подавление экспрессии генов ВГА, с использованием различных систем невирусной доставки *in vitro*.

Подобраны уникальные миРНК, направленные на консервативные области генов PA и NP ВГА человека, кодирующих ключевые компоненты вирусного РНП комплекса, абсолютно необходимого для развития вирусной инфекции. Проведен первичный *in vitro* скрининг противовирусной активности этих миРНК, доставляемых внутрь клетки с помощью ЛФ, в результате которого выбрали миРНК PA-1630 и NP-717, как наиболее перспективные для терапевтического применения. Их ингибирующая вирусную репликацию активность была на уровне или превышала таковую для некоторых миРНК, ранее описанных в литературе.

Проведено сравнительное исследование эффективности внутриклеточной доставки миРНК и проявляемой ею противовирусной активности *in vitro* в комплексе с поликатионами ПЭИ и производными хитозана, а также ЛФ и SiO₂-МК. Продемонстрировано что эффективность внутриклеточной доставки ROX-миРНК в клетки A549 с помощью SiO₂-МК значительно превосходит эффективность доставки с помощью ПЭИ (на 70%), ЛФ (на 45%), ЛФ-RNAi (на 30%).

Был продемонстрирован противовирусный потенциал миРНК инкапсулированной в SiO₂-МК в качестве прототипа препарата на основе РНК-интерференции, представляющего собой одиночные миРНК (PA-1630, NP-717 и NS-777) и комбинацию из них. Показано что комбинированный сайленсинг трёх вирусных генов обладает существенно большей эффективностью, превосходя, в том числе, действие озельтамивира.

Также было проведено исследование противовирусного действия разработанного препарата миРНК *in vitro* в отношении различных штаммов ВГА нескольких подтипов и вируса гриппа В. Комбинационная терапия миРНК инкапсулированной в SiO₂-МК из трёх инкапсулированных миРНК вызывает противовирусный эффект для вирусов гриппа А нескольких субтипов: A/PR/8/34

(H1N1), A/California/7/09 (H1N1pdm); A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2); A/Anhui/1/13 (H7N9) (H1N1, H5N2, H7N9), приводя к снижению титра вирусного потомства на 2-4 lg ТЦД₅₀/мл (рисунок 3.28). Отсутствие ингибирования репродукции вируса гриппа В/Malaysia/2506/2004 объясняется его природой и наличием большого количества мутаций в целевых генах миРНК (рисунок 3.29). Установлено, что посттранскрипционный сайленсинг мРНК посредством РНК-интерференции достигается по нескольким возможным механизмам. Одним из них является разрезание целевой мРНК в результате эндонуклеазной активности Ago2 [51]. Необходимым условием для реализации этого процесса является полная комплементарность центральной области миРНК (между 9м и 10м нуклеотидами с 5'-конца миРНК, где локализован сайт расщепления) и мишенной мРНК [128,129]. С другой стороны, комплекс RISC, с загруженной мРНК и миРНК, может инициировать деаденилирование целевой мРНК путём рекрутирования адапторного белка GW182 и CCR4–NOT деаденилазного комплекса. GW182 связывает также белок PABP. Предположительно, взаимодействие GW182 с PABP делает невозможной циркуляризацию мРНК [130]. Кроме того имеется ряд других взаимодополняющих молекулярных механизмов RISC-опосредованного сайленсинга генов [131]. В нашем эксперименте однозначно можно утверждать, что для штамма вируса гриппа В/Malaysia/2506/2004 на всех сегментах в центральной части миРНК присутствует антикомплементарность. Для всех остальных штаммов наблюдается строгая комплементарность в центральной части миРНК (с 5 по 12 нуклеотид с 5'-конца) и мишенной последовательности на гене NP, что коррелирует с ингибирующим действием одиночной инкапсулированной миРНК NP-717. В то же время, наличие нуклеотидных несоответствий в концевой части миРНК NS-777 и последовательностей генов NS вирусных штаммов A/California/7/09, A/Aichi/2/68, A/Anhui/1/13 может быть причиной незначительной разницы в противовирусном действии комбинационной и одиночной миРНК терапии для этих штаммов. Тем не менее, эти рассуждения носят скорее предположительный характер, т.к. детали молекулярного взаимодействия генного сайленсинга при РНК-интерференции, их

временная последовательность и причинно-следственные связи остаются не до конца выясненными в настоящее время [130].

Таким образом, разработан не имеющий прямых аналогов препарат, основанный на применении РНК интерференции для подавления экспрессии генов геномных сегментов PA, NP и NS, представляющий собой комбинацию из трех миРНК, инкапсулированных в гибридные полиэлектролитные микрокапсулы, с поверхностью модифицированной частицами SiO₂.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны уникальные миРНК PA-1630 и NP-717, направленные на подавление экспрессии генов PA и NP ВГА, обладающие противовирусной активностью в отношении вируса A/PuertoRico/8/34 (H1N1).
2. Гибридные SiO₂-микрокапсулы обеспечивают наиболее эффективную внутриклеточную доставку миРНК и их противовирусную активность в отношении вируса A/PuertoRico/8/34 (H1N1) по сравнению с полиэтиленгликолем, производными хитозана и липофектамином.
3. Гибридные SiO₂-микрокапсулы обеспечивают защиту миРНК от действия РНКаз и их высвобождение в цитоплазму клеток через 24 часа инкубации, обладая минимальным цитотоксическим действием.
4. Препарат инкапсулированных в гибридные SiO₂-микрокапсулы миРНК NP-717 обеспечивает снижение экспрессии гена NP и общее подавление репродукции ВГА. Для препарата наблюдается дозозависимый эффект, ингибирование вируса происходит при профилактическом и лечебном применении.
5. Профилактическое введение (за 24 часа до заражения) в клетки комбинации из трёх инкапсулированных в гибридные SiO₂-микрокапсулы миРНК, направленных на подавление экспрессии генов NP, PA и NS, вызывает специфический противовирусный эффект и приводит к снижению титра вирусного потомства на 2-4 lg TCID₅₀/мл для ВГА H1N1, H1N1_{pdm09}, H5N2 и H7N9, превышающий действие отдельных миРНК и озельтамивира.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВГА - вирус гриппа типа А

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

миРНК – малая интерферирующая РНК (англ. вар. siRNA)

микроРНК - малые некодирующие РНК (анг. вар. miRNA)

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

дцРНК - двухцепочечная РНК

кДНК – ДНК, комплементарная мРНК

ПЭИ – полиэтиленимин

ЛФ – липофектамин

МГХ – метилгликоль хитозан

КХ - кватернизованный хитозан

ТЭМ - просвечивающая электронная микроскопия

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

RdRp «RNA depended RNA-polymerase» – РНК-зависимая РНК полимераз

RISC «RNA-induced silencing complex» – РНК индуцируемый комплекс осуществляющий РНК интерференцию

МОИ «multiplicity of infection» множественность инфекции

ИФА – иммуноферментный анализ

ОТ-ПЦР обратная транскрипция с полимеразной цепной реакцией

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ВОЗ | Грипп [электронный ресурс] // режим доступа: [http://www.who.int/mediace1. ВОЗ | Грипп // WHO. – 2017.ntre/factsheets/fs211/ru/ \(01.02.2018\).](http://www.who.int/mediace1. ВОЗ | Грипп // WHO. – 2017.ntre/factsheets/fs211/ru/ (01.02.2018).)
2. Деева Э.Г., Мельникова Т.И., Сологуб Т.В. К.О.И. Химиопрепараты для лечения гриппа - современное состояние // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2013. – № 5. – с. 26–32.
3. Киселев О.И., Цыбалова Л.М. П.В И. Покровского. И. Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика. / — М.: МИА, 2012., 2012.-496 с.
4. De Clercq E. Antiviral agents active against influenza A viruses // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2006. – V. 5, № 12. P. 1015–1025.
5. Andradóttir S. et al. Reactive strategies for containing developing outbreaks of pandemic influenza // *BMC Public Health.* – 2011. – V. 11, № Suppl 1. – P. S1.
6. Киселев О.И. Пандемии начала XXI века. Грипп птиц и пандемия “свиного гриппа” H1N1 2009 года. – 2016.
7. van Mierlo J.T., van Cleef K.W.R., van Rij R.P. Small Silencing RNAs: Piecing Together a Viral Genome // *Cell Host Microbe.* – 2010. – V. 7, № 2. – P. 87–89.
8. Bitko V., Barik S. An endoplasmic reticulum-specific stress-activated caspase (caspase-12) is implicated in the apoptosis of A549 epithelial cells by respiratory syncytial virus. // *J. Cell. Biochem.* 2001. – V. 80, № 3. – P. 441–454.
9. Ballarín-González B., Thomsen T.B., Howard K.A. Clinical translation of RNAi-based treatments for respiratory diseases // *Drug Deliv. Transl. Res.* – 2013. – V. 3, № 1. – P. 84–99.
10. Горшков А.Н., Петрова А.В. В.А.В. РНК интерференция и патогенез вируса гриппа // *Цитология.* – 2017. – V. 59, № 8. – P. 513–533.
11. Tan F.L., Yin J.Q. RNAi, a new therapeutic strategy against viral infection // *Cell Res.* 2004. – V. 14, № 6. – P. 460–466.
12. Ozcan G. et al. Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics

- // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2015. № 87. – P. 108–119.
13. Ge Q. et al. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003. – V. 100, № 5. – P. 2718–2723.
 14. Ge Q. et al. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004. – V. 101, № 23. – P. 8676–8681.
 15. Hui E.K.W. et al. Inhibition of influenza virus matrix (M1) protein expression and virus replication by U6 promoter-driven and lentivirus-mediated delivery of siRNA // *J. Gen. Virol.* 2004. – V. 85, № 7. – P. 1877–1884.
 16. McCown M., Diamond M.S., Pekosz A. The utility of siRNA transcripts produced by RNA polymerase I in down regulating viral gene expression and replication of negative- and positive-strand RNA viruses // *Virology.* 2003. – V. 313, № 2. – P. 514–524.
 17. Jiao H. et al. Effective inhibition of mRNA accumulation and protein expression of H5N1 avian influenza virus NS1 gene in vitro by small interfering RNAs // *Folia Microbiol. (Praha).* – 2013. – V. 58, № 4. – P. 335–342.
 18. Svancarova P., Svetlikova D., Betakova T. Synergic and antagonistic effect of small hairpin RNAs targeting the NS gene of the influenza A virus in cells and mice // *Virus Res. Elsevier B.V.*, 2015. – V. 195. – P. 100–111.
 19. Sui H.Y. et al. Small interfering RNA targeting M2 gene induces effective and long term inhibition of influenza A virus replication // *PLoS One.* 2009. – V. 4, № 5. – P. 1–7.
 20. Thakur N., Qureshi A., Kumar M. VIRsiRNAdb: a curated database of experimentally validated viral siRNA/shRNA // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – V. 40, № D1. – P. D230–D236.
 21. Sirnaomics [Электронный Ресурс] // режим доступа: <http://old.sirnaomics.com/products.html> (03.12.2018).
 22. Kaczmarek J.C., Kowalski P.S., Anderson D.G. Advances in the delivery of RNA therapeutics: From concept to clinical reality // *Genome Med. Genome Medicine*, 2017. – V. 9, № 1. – P. 1–16.

23. Thomas M. et al. Full deacylation of polyethylenimine dramatically boosts its gene delivery efficiency and specificity to mouse lung // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005. – V. 102, № 16. – P. 5679–5684.
24. Ganas C. et al. Biodegradable capsules as non-viral vectors for in vitro delivery of PEI/siRNA polyplexes for efficient gene silencing. // *J. Control. Release.* – 2014. – V. 196. – P. 132–138.
25. Timin A.S. et al. Hybrid inorganic-organic capsules for efficient intracellular delivery of novel siRNAs against influenza A (H1N1) virus infection // *Sci. Rep.* – 2017. – V. 7, № 1. – P. 102.
26. Timin A.S., Gould D.J., Sukhorukov G.B. Multi-layer microcapsules: fresh insights and new applications // *Expert Opin. Drug Deliv.* – 2017. – V. 14, № 5. – P. 583–587.
27. Fields B.N., Knipe D.M. (David M., Howley P.M. *Fields virology*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2007. 86 – P.
28. Kawaoka Y. *Influenza Virology: Current Topics* / ed. Kawaoka Y. Caister Academic Press, Wymondham., 2006.
29. Shaw M.L. et al. Cellular Proteins in Influenza Virus Particles // *PLoS Pathog.* / ed. Früh K. 2008. – V. 4, № 6. P. e1000085.
30. Hutchinson E.C. et al. Conserved and host-specific features of influenza virion architecture // *Nat. Commun.* – 2014. – V. 5. – P. 4816.
31. Nelson M. I. H.E.C. The evolution of epidemic influenza // *Nat. Rev. Genet.* 2007. – V. 8. – P. 196–205.
32. Vasin A. V. et al. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: An overview of recently discovered proteins // *Virus Res. Elsevier B.V.*, 2014. – V. 185. – P. 53–63.
33. Чучалина А.Г., Сологуб Т.В. Грипп у взрослых : методические рекомендации по диагностике , лечению , специфической и неспецифической профилактике под редакцией : 2014.
34. Kobayashi M., Toyoda T. I.A. Influenza virus PB1 protein is the minimal and essential subunit of RNA polymerase // *Arch. Virol.* 1996. – V. 141. – P. 525–539.

35. Liu Y. et al. Structure-function studies of the influenza virus RNA polymerase PA subunit. // *Sci. China. Ser. C, Life Sci.* 2009. – V. 52, № 5. – P. 450–458.
36. Pflug A. et al. Structural insights into RNA synthesis by the influenza virus transcription-replication machine. // *Virus Res.* – 2017. – V. 234. – P. 103–117.
37. Ortín J., Martín-Benito J. The RNA synthesis machinery of negative-stranded RNA viruses // *Virology.* – 2015. – V. 479–480. – P. 532–544.
38. Das K. et al. Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2010. – V. 17, № 5. – P. 530–538.
39. Gaidet N. et al. Avian Influenza Viruses in Water Birds, Africa // *Emerg. Infect. Dis.* 2007. – V. 13, № 4. – P. 626–629.
40. Reid A.H., Taubenberger J.K., Fanning T.G. Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus // *Nat. Rev. Microbiol.* 2004. – V. 2, № 11. – P. 909–914.
41. Грипп: факты и статистика [Electronic resource].
42. А.Н. Слепушкин Л.Н.В. Профилактика гриппа и ОРВИ // *Русский медицинский журнал.* 2001. № 16. – P. 717.
43. Кареткина Г.Н. Применение индукторов интерферонов для лечения и профилактики гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций // *Лечащий врач.* 2009. № 10. – P. 23–31.
44. Naesens L., Stevaert A., Vanderlinden E. Antiviral therapies on the horizon for influenza. // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2016. – V. 30. – P. 106–115.
45. Sangawa H. et al. Mechanism of Action of T-705 Ribosyl Triphosphate against Influenza Virus RNA Polymerase // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2013. – V. 57, № 11. – P. 5202–5208.
46. Takashita E. et al. Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre- and post-administration of favipiravir. // *Antiviral Res.* – 2016. – V. 132. – P. 170–177.
47. Trist I.M.L. et al. 4,6-Diphenylpyridines as Promising Novel Anti-Influenza Agents Targeting the PA-PB1 Protein-Protein Interaction: Structure-Activity Relationships Exploration with the Aid of Molecular Modeling. // *J. Med. Chem.*

- 2016. – V. 59, № 6. – P. 2688–2703.
48. Yuan S. et al. Identification of a small-molecule inhibitor of influenza virus via disrupting the subunits interaction of the viral polymerase. // *Antiviral Res.* – 2016. – V. 125. – P. 34–42.
49. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // *Nature*. 1998. – V. 391. – P. 806–811.
50. Ketting R.F. The Many Faces of RNAi // *Dev. Cell.* – 2011. – V. 20, № 2. – P. 148–161.
51. Ender C., Meister G. Argonaute proteins at a glance. // *J. Cell Sci.* – 2010. – V. 123, № Pt 11. – P. 1819–1823.
52. Mittal V. Improving the efficiency of RNA interference in mammals. // *Nat. Rev. Genet.* 2004. – V. 5, № 5. – P. 355–365.
53. Elbashir S.M., Harborth J., Weber K. T.T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs // *Methods*. 2002. – V. 26, № 199–213.
54. Kurreck J. RNA Interference: From Basic Research to Therapeutic Applications // *Angew. Chemie Int. Ed.* – 2009. – V. 48, № 8. – P. 1378–1398.
55. DeVincenzo J.P. The promise, pitfalls and progress of RNA-interference-based antiviral therapy for respiratory viruses // *Antivir. Ther.* – 2012. – V. 17, № 1 Pt B. – P. 213–225.
56. Khanna M. et al. Gene silencing: a therapeutic approach to combat influenza virus infections // *Futur. Microbiol.* – 2015. – V. 10. – P. 131–140.
57. Barik S. SiRNA for influenza therapy // *Viruses.* – 2010. – V. 2, № 7. – P. 1448–1457.
58. Youngren-Ortiz S.R. et al. Aerosol Delivery of siRNA to the Lungs. Part 1: Rationale for Gene Delivery Systems // *Kona powder Sci. Technol. Japan. NIH Public Access*, 2016. – V. 33. – P. 63.
59. Ge Q., Eisen H.N., Chen J. Use of siRNAs to prevent and treat influenza virus infection // *Virus Res.* – 2004. – V. 102, № 1. – P. 37–42.

60. Tompkins S.M. et al. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. – 2004.
61. Zhou H. et al. Effective small interfering RNAs targeting matrix and nucleocapsid protein gene inhibit influenza A virus replication in cells and mice // *Antiviral Res.* – 2007. – V. 76, № 2. – P. 186–193.
62. Zhou K. et al. RNA interference of avian influenza virus H5N1 by inhibiting viral mRNA with siRNA expression plasmids // *J. Biotechnol.* – 2008. – V. 135, № 2. – P. 140–144.
63. Wu Y. et al. Inhibition of highly pathogenic avian H5N1 influenza virus replication by RNA oligonucleotides targeting NS1 gene // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – V. 365, № 2. – P. 369–374.
64. Abrahamyan A., Nagy É., Golovan S.P. Human H1 promoter expressed short hairpin RNAs (shRNAs) suppress avian influenza virus replication in chicken CH-212 and canine MDCK cells // *Antiviral Res.* – 2009. – V. 84, № 2. – P. 159–167.
65. Suzuki H. et al. Inhibition of influenza virus by baculovirus-mediated shRNA. // *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf).* – 2009. – V. 53, № 53. – P. 287–288.
66. Zhang W. et al. Inhibition of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 replication by the small interfering RNA targeting polymerase A gene // *Biochem. Biophys. Res. Commun. Elsevier Inc.*, 2009. – V. 390, № 3. – P. 421–426.
67. Li W. et al. Inhibition of influenza A virus replication by RNA interference targeted against the PB1 subunit of the RNA polymerase gene // *Arch. Virol.* – 2011. – V. 156, № 11. – P. 1979–1987.
68. Rajput R. et al. Small interfering RNA targeting the nonstructural gene 1 transcript inhibits influenza A virus replication in experimental mice. // *Nucleic Acid Ther.* – 2012. – V. 22, № 6. – P. 414–422.
69. Khantasup K. et al. Targeted small interfering RNA-immunoliposomes as a promising therapeutic agent against highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus infection // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2014. – V. 58, № 5. – P. 2816–2824.

70. Hinton T.M., Challagulla A., Stewart C.R., Guerrero-Sanchez C., Grusche F.A., Shi S., Bean A.G., Monaghan P., Gunatillake P.A., Thang S.H. T.M.L. Inhibition of influenza virus in vivo by siRNA delivered using ABA triblock copolymer synthesized by reversible addition-fragmentation chain-transfer polymerization // *Nanomedicine*. – 2014. № 9. – P. 1141–1154.
71. Stoppani E., Bassi I., Dotti S., Lizier M., Ferrari M. L.F. Expression of a single siRNA against a conserved region of NP gene strongly inhibits in vitro replication of different Influenza A virus strains of avian and swine origin. // *Antiviral Res.* – 2015. № 120. – P. 16–22.
72. Behera P., Nagarajan S., Murugkar H.V., Kalaiyarasu S., Prakash A., Gothwal R., Dubey S.C., Kulkarni D.D. T.C. siRNAs targeting PB2 and NP genes potentially inhibit replication of highly pathogenic H5N1 avian Influenza virus // *J. Biosci.* – 2015. № 40. – P. 233–240.
73. Liang W., Chow M.Y., Lau P.N., Zhou Q.T., Kwok P.C., Leung G.P., Mason A.J., Chan H.K., Poon L.L. L.J.K. Inhalable dry powder formulations of siRNA and pH-responsive peptides with antiviral activity against H1N1 influenza virus // *Mol. Pharm.* – 2015. № 12. – P. 910–921.
74. Xu F., Liu G., Liu Q. Z.Y. RNA interference of influenza A virus replication by microRNA-adapted lentiviral shRNA // *J. Gen. Virol.* – 2015. № 96. – P. 2971–2981.
75. McMillen C.M. et al. Inhibition of influenza A virus matrix and nonstructural gene expression using RNA interference // *Virology*. Elsevier, 2016. – V. 497. – P. 171–184.
76. Linke L.M. et al. Inhibiting avian influenza virus shedding using a novel RNAi antiviral vector technology: proof of concept in an avian cell model // *AMB Express*. Springer Berlin Heidelberg, 2016. – V. 6, № 1. – P. 1–10.
77. Wang S. et al. Targeted disruption of influenza A virus hemagglutinin in genetically modified mice reduces viral replication and improves disease outcome // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group, 2016. – V. 6, № March. – P. 1–12.
78. Youngren-Ortiz S.R. et al. Aerosol Delivery of siRNA to the Lungs. Part 2:

- Nanocarrier-based Delivery Systems // *Kona powder Sci. Technol. Japan. NIH Public Access*, 2017. – V. 34. – P. 44.
79. Ruigrok M.J., Frijlink H.W. H.W.L. – 2016. P. administration of small interfering R.T. route to go? *J.C.R.* 235: 14-23. Pulmonary administration of small interfering RNA: The route to go // *J. Control. Release.* – 2016. № 235. – P. 14–23.
80. Roberts T.C., Ezzat K., El Andaloussi S. W.M.S. Synthetic siRNA delivery: progress and prospects // *Methods Mol. Biol.* – 2016. № 1364. – P. 291–310.
81. ElHefnawi M. et al. The design of optimal therapeutic small interfering RNA molecules targeting diverse strains of influenza a virus // *Bioinformatics.* – 2011. – V. 27, № 24. – P. 3364–3370.
82. Liu Y. et al. Optimised design of siRNA based on multi-featured comparison and analysis of H1N1 virus // *Int. J. Data Min. Bioinform.* – 2013. – V. 7, № 4. – P. 345.
83. Raza A. et al. Selection of predicted siRNA as potential antiviral therapeutic agent against influenza virus. // *Bioinformation.* – 2011. – V. 6, № 9. – P. 340–343.
84. Wang X., Wang X., Varma R.K., Beauchamp L., Magdaleno S. S.T.J. Selection of hyperfunctional siRNAs with improved potency and specificity // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – V. 37. – P. e152.
85. Fakhr E., Zare F. T.-T.L. Precise and efficient siRNA design: a key point in competent gene silencing. *Cancer Gene Ther.* 23: 73-82. // *Cancer Gene Ther.* – 2016. № 23. – P. 73–82.
86. Birmingham A. et al. A protocol for designing siRNAs with high functionality and specificity // *Nat. Protoc.* – 2007. – V. 2, № 9. – P. 2068–2078.
87. A.J. H. The use of RNAi-based screens to identify host proteins involved in viral replication // *Futur. Microbiol.* – 2010. – V. 5, № 2. – P. 303–311.
88. Chou Y.-C. et al. Variations in genome-wide RNAi screens: lessons from influenza research // *J. Clin. Bioinforma.* – 2015. – V. 5, № 1. – P. 2.
89. Portela A., Digard P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. // *J. Gen. Virol.* – 2002. – V. 83, № Pt 4. – P. 723–734.

90. Decroly E et al. Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. *Nat Rev Microbiol* // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2011.
91. J.Wang, Z.Lu, M.G. Wientjes J.L.-S.A. Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers // *Am. Assoc. Pharm. Sci.* – 2010. – V. 12, № 4. – P. 492–503.
92. Никитенко Н.А. П.В.С. Невирусные методы доставки и терапевтическое применение малых интерферирующих РНК // *Acta Naturae.* – 2013. – V. 5, № 3 (18). – P. 37–56.
93. M. Jafari, M. Soltani, S. Naahidi, D. Karunaratne P.C. Nonviral approach for targeted nucleic acid delivery // *Curr. Med. Chem.* – 2012. – V. 19, № 2. – P. 197–208.
94. Northfelt D.W. et al. Efficacy of pegylated-liposomal doxorubicin in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma after failure of standard chemotherapy. // *J. Clin. Oncol.* 1997. – V. 15, № 2. – P. 653–659.
95. How Cationic Lipid Mediated Transfection Works [Electronic resource]. URL: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/gene-delivery-technologies/cationic-lipid-mediated-delivery/how-cationic-lipid-mediated-transfection-works.html> (accessed: 12.02.2018).
96. Lipofectamine® 2000 [Electronic resource]. URL: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/brands/product-brand/lipofectamine/lipofectamine-2000.html> (accessed: 12.02.2018).
97. Lipofectamine® RNAiMAX Reagent [Electronic resource]. URL: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/brands/product-brand/lipofectamine/lipofectamine-rnaimx.html> (accessed: 12.02.2018).
98. Nguyen J., Szoka F.C. Nucleic acid delivery: the missing pieces of the puzzle? // *Acc. Chem. Res.* – 2012. – V. 45, № 7. – P. 1153–1162.
99. Jere D. et al. Degradable polyethylenimines as DNA and small interfering RNA carriers. // *Expert Opin. Drug Deliv.* – 2009. – V. 6, № 8. – P. 827–834.
100. Nimesh S. et al. Polyethylenimine nanoparticles as efficient transfecting agents for mammalian cells // *J. Control. Release.* – 2006. – V. 110, № 2. – P. 457–468.

101. MUMPER, Russell J., ROLLAND A. CHITOSAN RELATED COMPOSITIONS FOR DELIVERY OF NUCLEIC ACIDS INTO A CELL. 1997.
102. Katas H., Alpar H.O. Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. // *J. Control. Release.* – 2006. – V. 115, № 2. – P. 216–225.
103. Ji A.M. et al. Functional gene silencing mediated by chitosan/siRNA nanocomplexes. // *Nanotechnology.* – 2009. – V. 20, № 40. – P. 405103.
104. Ali A., Ahmed S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – V. 109. – P. 273–286.
105. Singh B. et al. Chitosan-based particulate systems for the delivery of mucosal vaccines against infectious diseases // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2017.
106. Crivianu-Gaita V T.M. Immobilization of Fab' fragments onto substrate surfaces: A survey of methods and applications // *biosens bioelectronica.* – 2015. № 70. – P. 167–180.
107. Gao H., Wen D., Sukhorukov G.B. Composite silica nanoparticle/polyelectrolyte microcapsules with reduced permeability and enhanced ultrasound sensitivity // *J. Mater. Chem. B. The Royal Society of Chemistry*, 2015. – V. 3, № 9. – P. 1888–1897.
108. Antipina M.N., Sukhorukov G.B. Remote control over guidance and release properties of composite polyelectrolyte based capsules // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2011. – V. 63, № 9. – P. 716–729.
109. Shao J. et al. Biointerfacing polymeric microcapsules for in vivo near-infrared light-triggered drug release // *Nanoscale. The Royal Society of Chemistry*, 2015. – V. 7, № 45. – P. 19092–19098.
110. Kolesnikova T.A. et al. Nanocomposite Microcontainers with High Ultrasound Sensitivity // *Adv. Funct. Mater. WILEY-VCH Verlag*, 2010. – V. 20, № 7. – P. 1189–1195.
111. Sukhorukov G.B. et al. Multifunctionalized Polymer Microcapsules: Novel Tools for Biological and Pharmacological Applications // *Small.* – 2007. – V. 3, № 6. – P. 944–955.
112. Kolesnikova T.A., Skirtach A.G., Möhwald H. Red blood cells and polyelectrolyte

- multilayer capsules: natural carriers versus polymer-based drug delivery vehicles // *Expert Opin. Drug Deliv.* – 2013. – V. 10, № 1. – P. 47–58.
113. Timin A.S. et al. Intracellular redox induced drug release in cancerous and mesenchymal stem cells. // *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* – 2016. – V. 147. – P. 450–458.
114. Luo G.-F. et al. Encapsulation of an Adamantane-Doxorubicin Prodrug in pH-Responsive Polysaccharide Capsules for Controlled Release // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* American Chemical Society, 2012. – V. 4, № 10. – P. 5317–5324.
115. Timin A.S. et al. Triple-responsive inorganic–organic hybrid microcapsules as a biocompatible smart platform for the delivery of small molecules // *J. Mater. Chem. B.* The Royal Society of Chemistry, 2016. – V. 4, № 45. – P. 7270–7282.
116. Ott A. et al. Light-Addressable and Degradable Silica Capsules for Delivery of Molecular Cargo to the Cytosol of Cells // *Chem. Mater.* American Chemical Society, 2015. – V. 27, № 6. – P. 1929–1942.
117. Faizuloev E. et al. Water-soluble N-[(2-hydroxy-3-trimethylammonium)propyl]chitosan chloride as a nucleic acids vector for cell transfection // *Carbohydr. Polym.* – 2012. – V. 89, № 4. – P. 1088–1094.
118. Петрова-Бродская А.В., Бондаренко А.Б., Тимин А.С., Плотникова М.А., Афанасьев М.В, Семенова А.А., Лебедев К.И., Горшков А.Н., Горшкова М.Ю., Егоров В.В., Клотченко С.А. В.А.В. Сравнение эффективностей ингибирования вируса гриппа А *in vitro* комплексами малых интерферирующих РНК с производными хитозана, полиэтиленимином и гибридными микрокапсулами на основе полиаргинина с неорганическими компонентами // *вопросы вирусологии.* – 2017. – V. 62, № 6. – P. 259–265.
119. Reed L.J. M.H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints // *Am. J. Epidemiol.* 1938. – V. 27, № 3. – P. 493–497.
120. Who. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza // *World Heal. Organ.* – 2011. – P. 153.
121. CDC. CDC Protocol of realtime RT-PCR for influenza A (H1N1) // *World Heal. Organ.* – 2009. – V. 1, № April. – P. 7.

122. Mittelholzer C.M. Influenza virus – Protection and Adaptation // Program. – 2006. 1-61 – P.
123. Genbank [Electronic resource]. URL:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database>.
124. MAFFT [Electronic resource]. URL:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database>.
125. van Baalen C.A. et al. Detection of Nonhemagglutinating Influenza A(H3) Viruses by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Quantitative Influenza Virus Culture // J. Clin. Microbiol. – 2014. – V. 52, № 5. – P. 1672–1677.
126. Muslimov A.R. et al. Mesenchymal Stem Cells Engineering: Microcapsules-Assisted Gene Transfection and Magnetic Cell Separation // ACS Biomater. Sci. Eng. American Chemical Society, 2017. – V. 3, № 10. – P. 2314–2324.
127. Doench J.G., Petersen C.P., Sharp P.A. siRNAs can function as miRNAs. // Genes Dev. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003. – V. 17, № 4. – P. 438–442.
128. Leuschner P.J.F. et al. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. // EMBO Rep. European Molecular Biology Organization, 2006. – V. 7, № 3. – P. 314–320.
129. Filipowicz W., Sonenberg N. The long unfinished march towards understanding microRNA-mediated repression. // RNA. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015. – V. 21, № 4. – P. 519–524.
130. Morozova N. et al. Kinetic signatures of microRNA modes of action. // RNA. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. – V. 18, № 9. – P. 1635–1655.