

На правах рукописи

Шиловский Игорь Петрович

**Применение интерференции РНК для разработки подходов
к антицитокиновой терапии аллергической бронхиальной астмы**

03.03.03 – иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва, 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России)

Научный консультант:

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор
Хаитов Муса Рахимович

Официальные оппоненты:

Свитич Оксана Анатольевна, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова»;

Наровлянский Александр Наумович, доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории цитокинов Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Ненашева Наталья Михайловна, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры клинической аллергологии Государственного бюджетного образовательного учреждения «Российская медицинская академия непрерывного последипломного образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства».

Защита диссертации состоится «___» «_____» 2018 г. в 14-00 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 208.017.01 в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России по адресу 115478, г.Москва, Каширское шоссе, д. 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России и на сайте <http://nrcii.ru/dissertatsionnyy-sovet>.

Автореферат разослан «___» «_____» 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Гудима Георгий Олегович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Бронхиальная астма (БА) – гетерогенное заболевание, обычно характеризующееся хроническим воспалением дыхательных путей. Астма как заболевание известна более 3000 лет, но только за последние три-четыре десятилетия она стала серьезной общественной проблемой. На сегодняшний день БА является наиболее распространенным в мире хроническим воспалительным заболеванием дыхательных путей, представляющим значительную медицинскую и социальную проблему как для детей, так и для взрослых.

Клинические признаки данного заболевания имеют черты, общие для всех пациентов, независимо от возраста, наследственности и других факторов: эпизодическая одышка, хрипы, спазм бронхов, затрудненный вдох. Отличительной особенностью аллергической бронхиальной астмы (70-80% от всех случаев заболевания) является повышение уровня общих и специфических IgE-антител в сыворотке крови, а также повышение содержания эозинофилов в крови, слизистых оболочках дыхательных путей и в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ).

За последние десятилетия резко возросло количество больных БА в странах Новой Зеландии, Австралии, Великобритании, Канады и США, где число заболевших достигает 10% населения. В Европе большинство детей и взрослых, страдающих от БА, проживают в Германии, Франции, Швеции, Португалии, Италии. По данным российских эпидемиологических исследований, в нашей стране распространенность БА астмы среди детей и подростков превышает 9 %, а среди взрослого населения составляет около 5 %.

Смертность от бронхиальной астмы широко варьирует в различных возрастных группах и регионах: в 2010 году самые высокие показатели

смертности от БА были зафиксированы в Океании, Юго-Восточной Азии, Северной Африке. Общемировой уровень смертности от данного заболевания среди мужчин и женщин составляет 13 и 9 на 100 000 человек, соответственно.

Кроме того, у пациентов с БА отмечается существенное ухудшение качества жизни и снижение работоспособности, что связано с существенными экономическими потерями для государства. В настоящее время общие ежегодные медицинские расходы на терапию БА составляют в США 18 млрд. долл. в год, а в Евросоюзе – около 17,7 млрд. евро.

Таким образом, с учетом значительной распространенности заболевания среди различных слоев населения, высокого уровня смертности и существенных экономических потерь, разработка новых и безопасных способов лечения и профилактики данного заболевания продолжает оставаться актуальной задачей для здравоохранения во всем мире.

С применением современных молекулярно-биологических методов исследования, а также технологии генного нокаута показано, что в патогенезе бронхиальной астмы существенную роль играют провоспалительные цитокины, такие, как ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13, а также провоспалительные клетки, такие, как эозинофилы и нейтрофилы. Особенную роль несет цитокин ИЛ-4, поскольку в результате его активности формируются основные проявления патологии: повышенный синтез аллерген-специфических антител класса IgE, гиперреактивность бронхов, инфильтрация эозинофилов в ткань легких.

Эти открытия создали предпосылки для появления нового подхода - антицитокиновой терапии бронхиальной астмы, которая основана на использовании ингибиторов цитокинов. В первую очередь это моноклональные антитела к цитокинам и их рецепторам, растворимые рецепторы, мутеины. Ряд подобных препаратов успешно прошел стадию

клинических исследований. Однако, стоит отметить, что препараты, основанные на моноклональных антителах, сложны в производстве и дорогостоящи. В тоже время появляются новые способы регуляции активности генов, в том числе и генов, кодирующих цитокины. Один из таких способов – интерференция РНК. Интерференция РНК — это механизм негативной регуляции генной экспрессии посредством молекул миРНК. Теоретически с помощью механизма РНК-интерференции можно подавить экспрессию любого гена-мишени с известной нуклеотидной последовательностью. Однако важной проблемой внедрения подобных препаратов в клиническую практику является сложность адресной доставки миРНК к месту действия. Для преодоления этой сложности применяют различные векторы как вирусной, так и невирусной природы. Наиболее перспективной с точки зрения безопасности и экономической целесообразности представляется стратегия нековалентного комплексования катионных пептидных носителей с молекулами миРНК.

Цель

С учетом вышесказанного, целью работы стало создание иммунобиологического комплекса, состоящего из молекул миРНК, направленных против гена провоспалительного цитокина *il-4*, и катионного пептидного носителя, для терапии аллергической бронхиальной астмы, действующего на основе интерференции РНК, и оценка его биологической активности и безопасности.

Задачи исследования:

1. С использованием методов биоинформатики спроектировать молекулы миРНК, направленные на подавление гена *il-4* человека, как перспективные компоненты иммунобиологического комплекса.

2. Изучить специфическую биологическую активность спроектированных молекул миРНК в экспериментах *in vitro* и выбрать оптимальные варианты миРНК в качестве компонентов иммунобиологического комплекса.
3. Синтезировать ряд новых катионных пептидных соединений и их производных, способных транспортировать в клетки-мишени молекулы нуклеиновых кислот.
4. Экспериментально обосновать состав иммунобиологического комплекса на основе катионных пептидов и молекул миРНК для подавления экспрессии гена *il-4* человека.
5. Изучить фармакокинетические характеристики и распределение по внутренним органам компонентов иммунобиологического комплекса.
6. С использованием модели аллергической бронхиальной астмы у мышей изучить биологическую активность созданного иммунобиологического комплекса.
7. Исследовать токсические свойства иммунобиологического комплекса.

Научная новизна

В ходе работы были спроектированы и синтезированы молекулы миРНК с уникальными нуклеотидными последовательностями, способные эффективно подавлять экспрессию региона гена провоспалительного цитокина *il-4* человека, участвующего в патогенезе аллергической бронхиальной астмы. Впервые синтезирован аргинин-богатый катионный дендримерный пептид LTP, отличающийся большой плотностью положительного заряда. С использованием спроектированных молекул миРНК и пептида LTP создан уникальный иммунобиологический комплекс, для которого показана специфическая биологическая активность на модели бронхиальной астмы у мышей *in*

vivo. В частности, семикратное ингаляционное введение комплекса в дозе 483 мкг/кг/сут приводило к снижению уровня экспрессии гена *il-4* в клетках БАЛ и как следствие, к нивелированию основных проявлений патологии (снижению бронхиальной гиперреактивности, снижению количества эозинофилов и нейтрофилов в БАЛ).

Также в ходе работы предложен новый способ изучения фармакокинетики РНК-содержащих препаратов, заключающийся в использовании химически-конъюгированных флуоресцентных меток, с последующей их идентификацией методом ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией. В фармакокинетических исследованиях *in vivo* на животных продемонстрировано, что при ингаляционном пути введения иммунобиологический комплекс был стабилен в органе-мишени – легких, о чем свидетельствует равный период полувыведения его компонентов (молекул миРНК и пептида LTP), составляющий 1,9 минуты.

В токсикологических исследованиях показано, что созданный комплекс имел $LD_{50} = 325$ мг/кг и относится к классу малотоксичных соединений, при этом длительное ингаляционное введение комплекса лабораторным животным в терапевтической дозе не оказывало повреждающего действия на жизненно важные системы органов. Кроме того, в отдельных исследованиях установлено, что созданный комплекс не оказывает негативного действия на компоненты врожденного и приобретенного иммунитета, не обладает местным раздражающим действием, не индуцирует аллергические реакции, а также не является мутагенным.

Показана перспективность применения интерференции РНК в качестве инновационного подхода к антицитокиновой терапии аллергической бронхиальной астмы.

Теоретическая и практическая значимость работы

По результатам работы был создан уникальный комплекс, состоящий из молекул миРНК, направленных против гена провоспалительного цитокина *il-4* человека, и катионного дендримерного пептида, выступающего в роли носителя. С использованием модели аллергической бронхиальной астмы у мышей продемонстрирована способность созданного комплекса при семикратном ингаляционном введении подавлять основные проявления патологии (гиперреактивность бронхов, аллергическое воспаление в легких). Проведенные токсикологические исследования *in vivo* показали низкую токсичность созданной композиции, что в совокупности с доказанной специфической биологической активностью делает данный комплекс перспективным для последующего внедрения в практику. Эти результаты стали основой для планирования клинических исследований.

Положения, выносимые на защиту

1. Применение интерференции РНК является инновационным подходом к антицитокиновой терапии аллергической бронхиальной астмы.
2. Катионный дендримерный пептид представляет собой оптимальный носитель для молекул миРНК в клетки-мишени.
3. Ингаляционное введение иммунобиологического комплекса, состоящего из молекул миРНК, направленных против интерлейкина-4, играющего ключевую роль в патогенезе аллергической бронхиальной астмы, и катионного дендримерного пептида, выступающего в роли носителя, приводит к существенному подавлению проявлений заболевания у экспериментальных животных.

4. Иммунобиологический комплекс миРНК/пептид является малотоксичным, не оказывает повреждающего действия на жизненно важные системы органов, на компоненты врожденного и приобретенного иммунитета не индуцирует аллергические реакции, а также не является мутагенным.

Апробация работы

Результаты исследования докладывались на 32-ом (22-26 июня 2017 г., Милан, Италия), 33-ем (7-11 июня 2014 г., Копенгаген, Дания), 34-ом (6-10 июня 2015 г., Барселона, Испания), 35-ом (11-15 июня 2016 г., Вена, Австрия), 36-ом (17-21 июня 2017 г., Хельсинки, Финляндия) конгрессах Европейской Академии Аллергологии и Клинической Иммунологии; на VI конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (21-25 марта 2011 г., Москва, Россия); на XI Конференции иммунологов Урала (23–25 октября 2014 г., Екатеринбург, Россия.); на Международном форуме «Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы» (30 мая - 01 июня 2016 г., Казань, Россия).

Основные результаты диссертационной работы отражены в 24 публикациях в ведущих рецензируемых научных журналах, в том числе в 19 отечественных изданиях и в 5 зарубежных изданиях. Получено 6 патентов.

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа изложена на 253 страницах текста, содержит 70 таблиц, 40 рисунков. Диссертация включает следующие разделы: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, список литературы. Библиография включает 256 источников (33 отечественных и 223 зарубежных).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Трансфекция клеток 293Т

Трансфекцию клеток 293Т осуществляли с использованием коммерческого реагента Lipofectamine2000 (Invitrogen) в соответствии с рекомендациями производителя.

Определение концентрации белка ИЛ-4 человека методом ИФА

Определение концентрации белка ИЛ-4 человека в супернатантах клеток 293Т проводили методом твердофазного ИФА с использованием набора Human IL-4 ELISA Set (BD) в соответствии с рекомендациями производителя. Фиксировали результаты с помощью спектрофотометра ReaderMPR1 (ScoTech, Германия) при длинах волн 450 и 630 нм.

Определение уровня экспрессии гена *il-4* методом RT-PCR

Определение экспрессии гена *il-4* человека в клетках 293Т проводили методом количественной ПЦР с использованием набора реактивов «Синтол» и амплификатора BioRad IQ5 в соответствии с рекомендациями производителя. В качестве нормализующего гена при изучении экспрессии *il-4* использовали ген *beta-actin*.

Синтез, очистка и определение подлинности пептидов

Методика получения пептидов основана на твердофазном химическом синтезе, который включает однотипные повторяющиеся операции для наращивания пептидной цепи. Сам процесс синтеза основан на повторяющихся циклах: присоединения Fmoc-аминокислоты, промывка, удаление Fmoc-защиты, промывка. В данной методике синтеза была использована смола Rink Amide.

Первичную очистку пептидов проводили путем гель-проникающей хроматографии, используя стеклянную колонку (диаметр 24 мм, длина

500 мм) с наполнителем Toyopearl HW-40 (сшитый гидроксिलированный метакрилатный полимер), который является аналогом геля Сефадекса G-25. В качестве подвижной фазы мы использовали 0,1 % водный раствор аммиака и 5% водную уксусную кислоту при скорости потока 60-80 мл/час. Фракции вещества, выходящие с колонки, детектировали с помощью спектрофотометрического детектора при длине волны 226 нм. Аликвоты полусырого пептида очищали путем градиентной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), используя хроматографическую систему, оснащенную препаративной колонкой (250 x 22 мм), содержащей 10 мкм-сорбент с обращенной фазой C18, размер пор 300Å (Vydac 218TP1022), бинарным градиентным насосом, детектором с переменной длиной волны (224 нм). Фракцию основного пика отделяли и высушивали лиофильно, получая таким образом очищенное вещество (пептид).

Для определения подлинности пептиды подвергали анализу с использованием аналитической ВЭЖХ, тонкослойной хроматографии (ТСХ) и масс-спектрометрии (MALDI TOF).

Методика определения биологической активности пептидов

Биологическую активность (способность транспортировать нуклеиновые кислоты внутрь клеток млекопитающих) определяли в экспериментах *in vitro* с использованием культур клеток эукариот и плазмиды, несущей репортерный ген люциферазы. Для этого культуру клеток эмбриональной почки человека 293Т засеивали в 48-луночный планшет в полной среде DMEM, которая содержит 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 300 мг/л L-глутамин и 60 мг/мл гентамицина в количестве 50-75 тыс. клеток на лунку в объеме 300 мкл полной среды DMEM и культивируют при 37⁰С в 5% атмосфере CO₂ до образования монослоя 75% конfluентности (1 сутки). Готовили трансфекционную смесь плазмиды pGL3 и катионных пептидов в среде optiMEM (Gibco), не

содержащей ЭТС и антибиотиков. Для достижения равновесного состояния смеси ее инкубировали при комнатной температуре в течение 25-30 минут. Подготовленную смесь вносили к клеткам в лунки планшета и инкубировали при 37⁰С в 5% атмосфере CO₂ в течение 2 суток. После инкубации клетки лизировали в 60 мкл специального буфера (Luciferase Cell Culture Lysis Reagent, Promega). Лизат клеток очищали центрифугированием, после чего в надосадке проводили измерение люциферазной активности путем смешивания с 50 мкл люциферина – субстрата для люциферазы. При наличии в образце фермента люциферазы происходит излучение света, интенсивность которого детектировалось люминометром (Promega).

Изучение биологической активности комплекса молекул миРНК и пептида LTP на модели аллергической БА у мышей

В работе использовали самок мышей линии BALB/c массой 20-22 г, возрастом 6-8 нед., приобретенных в питомнике Филиал «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства».

Моделировали аллергическую БА путем введения внутрибрюшинного 20 мкг аллергена овальбумина (OVA), эмульгированного в адьюванте Al(OH)₃ в дни 0, 14 и 28. В дни 42-44 проводили интраназальные введения 10% раствора OVA по 50 мкл. На фоне развития признаков БА осуществляли ингаляционное введение комплекса siIL4-267-408/LTP. Для этого мышей помещали в камеру объемом 12 л (по 12 мышей) и с помощью небулайзера 10 минут распыляли аэрозоль препарата с последующей экспозицией мышей в камере в течение 20 минут. Отдельной группе животных аэрозольно вводили препарат siGFP/LTP в качестве неспецифического контроля.

Оценка гиперреактивности бронхов

Для определения гиперреактивности бронхов использовали неинвазивную методику с применением прибора Fine Point Series NAM Sites Non-Invasive Airway Mechanics (Вахсо, США). Гиперреактивность бронхов определялась при появлении у мышей бронхоспазма, вызванного аэрозольным введением метахолина в возрастающих дозах. Мышам ингаляционно вводили возрастающие концентрации метахолина: 6,25, 12,5, 25 мг/мл, после чего в автоматическом режиме оценивали удельную сопротивляемость дыхательных путей (sRaw - specific resistance of airways), которая выражалась в сантиметрах водного столба в секунду в мл ($\text{смH}_2\text{O} \times \text{сек}^{-1} \times \text{мл}^{-1}$).

Взятие бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ)

В конце исследования мышей забивали с помощью цервикальной дислокации, после чего, используя стерильные ножницы и пинцет, обнажали трахею. Дыхательные пути через трахею с помощью шприца промывались дважды 1 мл среды RPMI 1640 (с добавлением 10% ЭТС и 0,6 мМ ЭДТА). После чего измеряли клеточность (количество клеток в 1 мл) БАЛ на автоматическом гематологическом анализаторе Abacus Junior Vet (Diatron, Австрия). Результат выражали в количестве клеток в 1 мл БАЛ. После измерения клеточности образцы центрифугировали 10 мин при 150 г. Осажденные клетки наносились на предметное стекло, высушивались и фиксировались в метаноле в течение 10 минут, после чего окрашивались азуром и эозином. Подсчет клеточного состава БАЛ проводили с помощью световой микроскопии. Оставшиеся клетки лизировали в 350 мкл буфера RLT (Qiagen, США) и хранили при 70 °С до выделения РНК.

Выделение РНК, синтез кДНК

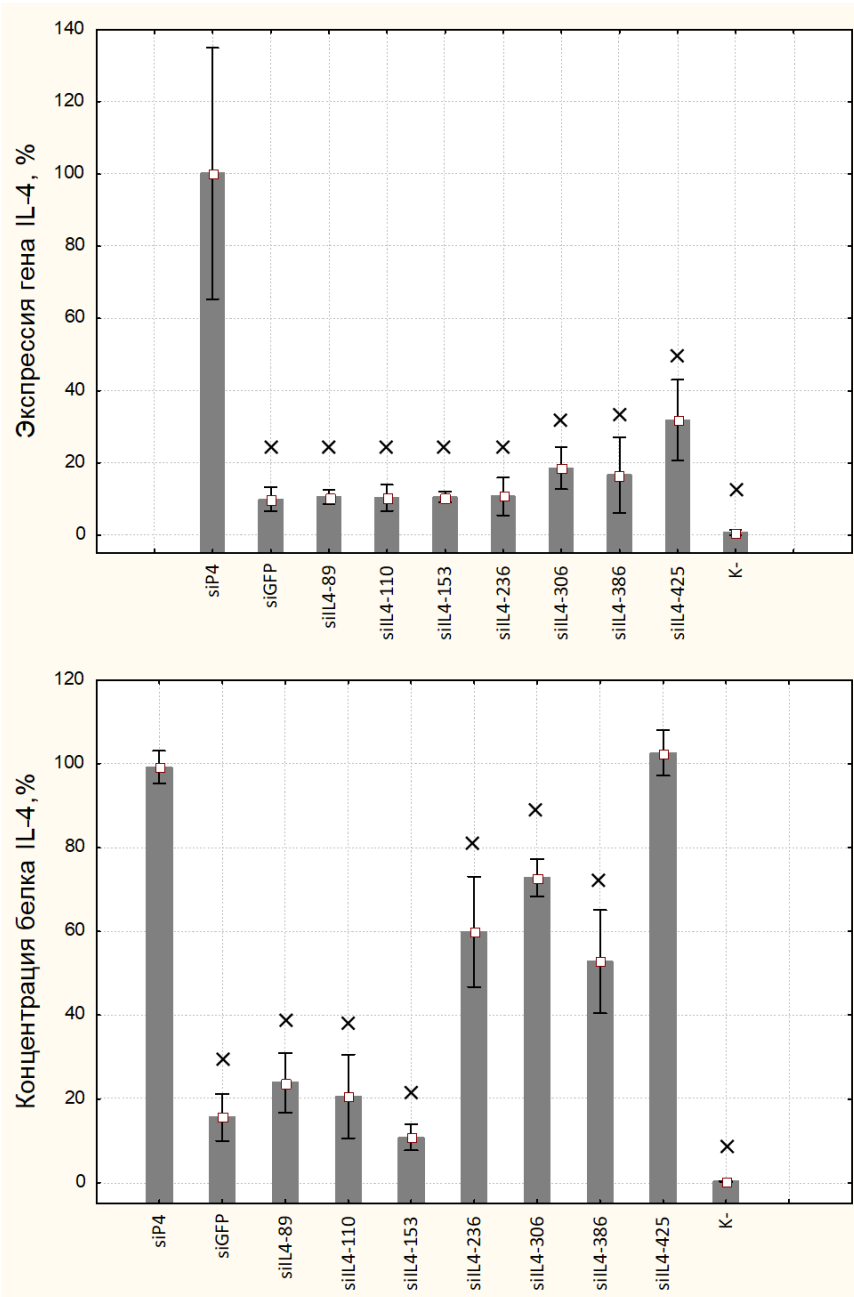
Общую РНК из клеток выделяли с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen) в соответствии с рекомендациями производителя. Синтез кДНК осуществляли с использованием коммерческого набора «Синтол» (Россия) и случайного гексамерного праймера в соответствии с рекомендациями производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Экспериментальное обоснование состава комплекса

В ходе разработки первоначально *in silico* были спроектированы молекулы миРНК против гена *il-4* человека. Для этого применялось биоинформационное программное обеспечение (OligoWalk), с помощью которого теоретически рассчитывалась предполагаемая эффективность сайленсинга (подавления) целевого гена по термодинамической эффективности связывания миРНК и мРНК-мишени. Однако данный подход не учитывает возможность стерического препятствования связыванию миРНК с мРНК со стороны белковых факторов транскрипции, находящихся в цитоплазме клетки. В связи с этим обязательным этапом работы была верификация спроектированных миРНК в экспериментах *in vitro* на культурах клеток, продуцирующих данный цитокин. Для исследования *in vitro* было синтезировано 7 вариантов молекул миРНК против гена *il-4* из 55-ти спроектированных *in silico*. Выбор миРНК для исследований *in vitro* основывался на: 1) предсказанной эффективности миРНК; 2) неспособности миРНК взаимодействовать с другими генами-мишенями для избегания т.н. off-target-эффектов.

А.



Б.

Рис. 1. Изменение уровня экспрессии ИЛ-4 в клетках 293Т после их котрансфекции плазмидой рUСHR IL4 IRES GFP в смеси с различными вариантами молекул миРНК

А. Измерение уровня экспрессии гена *il-4* в клетках 293Т методом RT-PCR.

Б. Измерение концентрация белка ИЛ-4 в супернатантах клеток 293Т, методом ИФА.

Примечания.

На рисунке представлен уровень экспрессии ИЛ-4 в процентах относительно контрольного варианта молекул миРНК (siP4). Экспрессия ИЛ-4 в клетках, обработанных siP4, принята за 100%.

Представлены средние значения \pm стандартная ошибка средней от 4-х независимых повторов.

× - статистически значимо отличается от siP4. Отличия принимаются значимыми при $p \leq 0,05$.

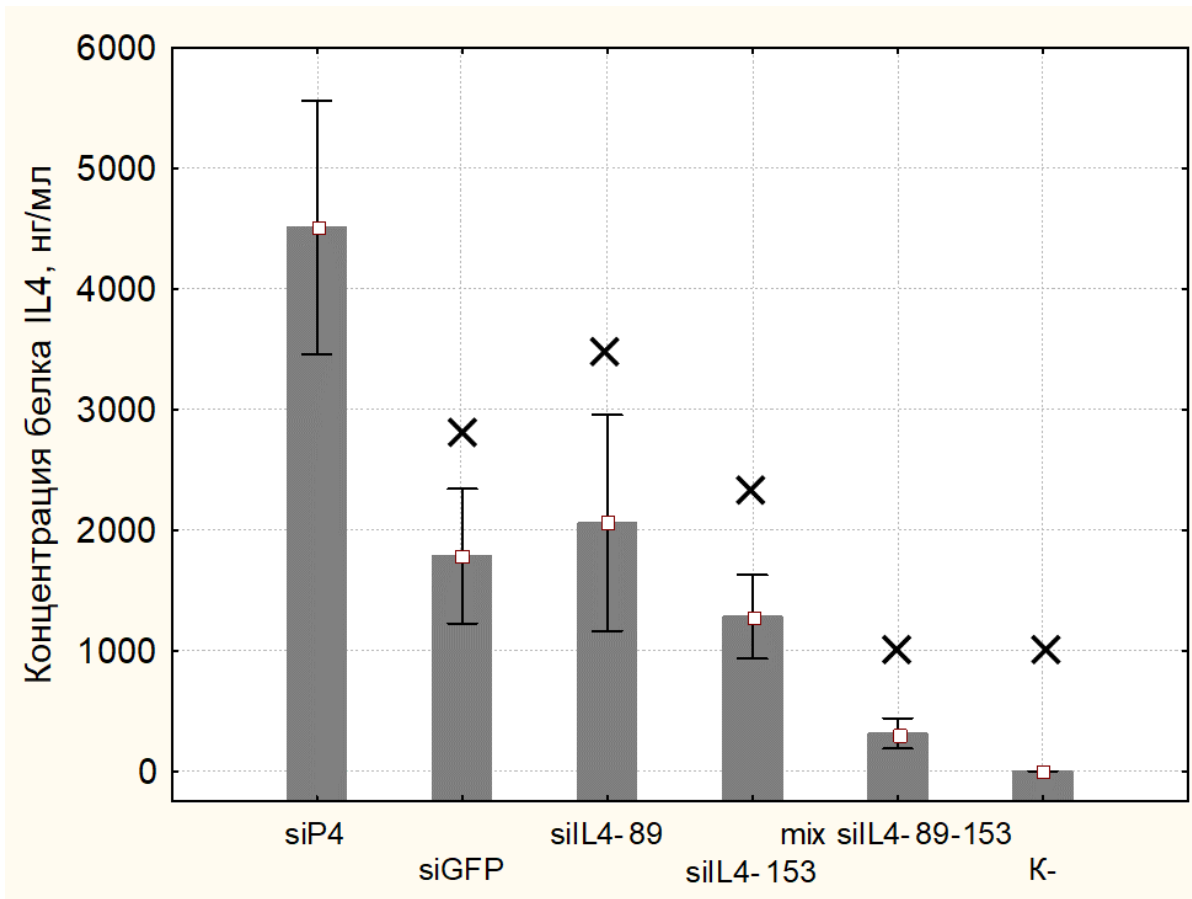


Рис. 2. Изменение концентрация белка ИЛ-4 в супернатантах клеток 293Т после их котрансфекции плазмидой рUCHR IL4 IRES GFP в смеси с молекулами миРНК.

Примечания.

Концентрация белка ИЛ-4 в супернатантах клеток измерена методом ИФА. Представлены средние значения ± стандартная ошибка средней от 4-х независимых повторов.

× - статистически значимо отличается от siP4. Отличия принимаются значимыми при $p \leq 0,05$.

В результате было показано, что 2 из 7-ми вариантов миРНК осуществляли заметный сайленсинг гена *il-4* на ~80% (варианты: siIL4-89, siIL4-153) в культуре клеток 293Т, причем подавление данного гена происходило как на уровне мРНК (рис. 1А), так и на уровне белка (рис. 1Б). Согласно нашим предварительным экспериментам, использование смеси, состоящей из нескольких миРНК, как правило,

оказывало больший супрессорный эффект. В связи с этим были проведены дополнительные исследования *in vitro*, где сравнивали эффективность подавления гена *il-4* как с применением индивидуальных миРНК, так и с применением смеси двух наиболее эффективных вариантов (siIL4–89, siIL4–153). Как оказалось, смесь siIL4–89 и siIL4–153 с большей эффективностью подавляла экспрессию ИЛ-4, в среднем на 90% (рис. 2). В связи с этим именно комбинацию данных вариантов миРНК (siIL4–89 и siIL4–153) мы использовали в последующей разработке комплексного препарата. Последовательности смысловых цепей спроектированных молекул миРНК представлены ниже (табл. 1).

Табл. 1. Последовательности молекул смысловых цепей молекул миРНК siIL4–89 и siIL4–153.

Название миРНК	Последовательность
siIL4-89	5- UUGAUGAUCUCCUGUAAGG tt -3
siIL4-153	5- AAAGAUGUCUGUUACGGUCtt -3

Следующий этап разработки комплексного препарата был посвящен подбору оптимального носителя для спроектированных ранее молекул миРНК. Проведенный нами анализ данных мировой научной литературы по носителям для молекул нуклеиновых кислот (НК) обусловил выбор шести структур пептидов для синтеза и последующего изучения. Выбранные структуры можно подразделить на три основные группы (табл. 2):

- 1) линейные: NC-795, NC-772, NC-783;
- 2) линейные липопептиды, содержащие «жирно-кислотные хвосты», где хвост представляет собой остаток пальмитиновой кислоты: Palm₂-KWK-NH₂ и Palm-CKRRRRRRRRRRRR;
- 3) дендримерный пептид LTP, т. е. имеющий ветвления.

Линейные катионные пептиды транспортировали НК внутрь клеток с низкой эффективностью. Введение жирно-кислотного хвоста усиливало транспорт НК, по всей видимости, за счет способности таких пептидов формировать в водной среде бислойные структуры, что способствует образованию наночастиц и поглощению их клетками посредством эндоцитоза. Пептиды со слабым положительным зарядом ожидаемо не обладали трансфекционной активностью (табл. 2). Максимальную биологическую активность проявил дендримерный (разветвленный) пептид LTP с высоким положительным зарядом. Использование пептидных дендримеров примечательно тем, что их структура позволяет добиваться большой плотности положительного заряда, что необходимо для взаимодействия с отрицательно заряженными НК. В итоге из 6-ти синтезированных пептидов в состав комплекса в качестве носителя был выбран катионный дендримерный пептид LTP.

Важным параметром при образовании комплекса является количественное соотношение носителя и НК. Проведенные нами исследования показали, что оптимальное соотношение НК/пептид для LTP составляет 1/25 по массе. В итоге процесс образования комплекса молекул миРНК против гена *il-4* человека (siIL4-89 и siIL4-153) и LTP заключается в растворении смеси молекул миРНК и LTP в стерильном физиологическом растворе. В водной фазе молекулы миРНК приобретают отрицательный заряд за счет остатков фосфорной кислоты сахарофосфатного остова, а пептид LTP приобретает положительный заряд за счет остатков аргинина и лизина. В результате происходит образование комплекса (siIL4-89-153/LTP) посредством электростатических взаимодействий отрицательно заряженной миРНК и положительно заряженного LTP.

Табл. 2. Трансфекционная активность катионных пептидов.

№	Пептид	Структура	Заряд/молекулу (+)	RLU/мг белка
1	NC-795	KWK-NH ₂	2	HA
2	NC-792	Palm ₂ -KWK-NH ₂	1	HA
3	NC-772	CKRRRRRRRRRRR	12	1×10 ⁴
4	NC-773	Palm-CKRRRRRRRRRRR	12	1×10 ⁵
5	NC-783	KRRGGGKLLKLLKLLKLLKC	8	0,5×10 ⁶
6	LTP	R ₈ K ₄ K ₂ KAC-NH ₂	16	1×10 ⁸
7	K-	-	-	HA

Примечания.

Представлены средние значения от 3-х независимых экспериментов. Для каждого пептида изучалась трансфекционная активность при различных соотношениях к НК, однако в таблице представлены максимальные значения активности пептида.

RLU – relative light units – относительные световые единицы.

K – отрицательный контроль (клетки 293T, обработанные pGL3, без использования носителей).

HA – нет активности.

2. Особенности фармакокинетики комплекса siIL4-89-153/LTP

Перед изучением биологической активности созданного комплекса было важно оценить его фармакокинетические характеристики. Изучение фармакокинетики препаратов, содержащих РНК и пептиды, является сложной задачей ввиду того, что в организме присутствует большое количество эндогенных соединений, сходных по природе. Поэтому первоначально был разработан методический подход к изучению фармакокинетики этого комплекса, заключающийся в химической конъюгации молекул миРНК и пептида LTP с флуоресцентными метками, что впоследствии позволяет количественно оценивать их содержание методом ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией. Главным недостатком

такого подхода является то, что химическая конъюгация изучаемого соединения с флуорофором может привести к утрате биологической активности. Сравнение активности меченных и немеченных компонентов комплекса продемонстрировало сохранность их биологической активности (рис. 3).

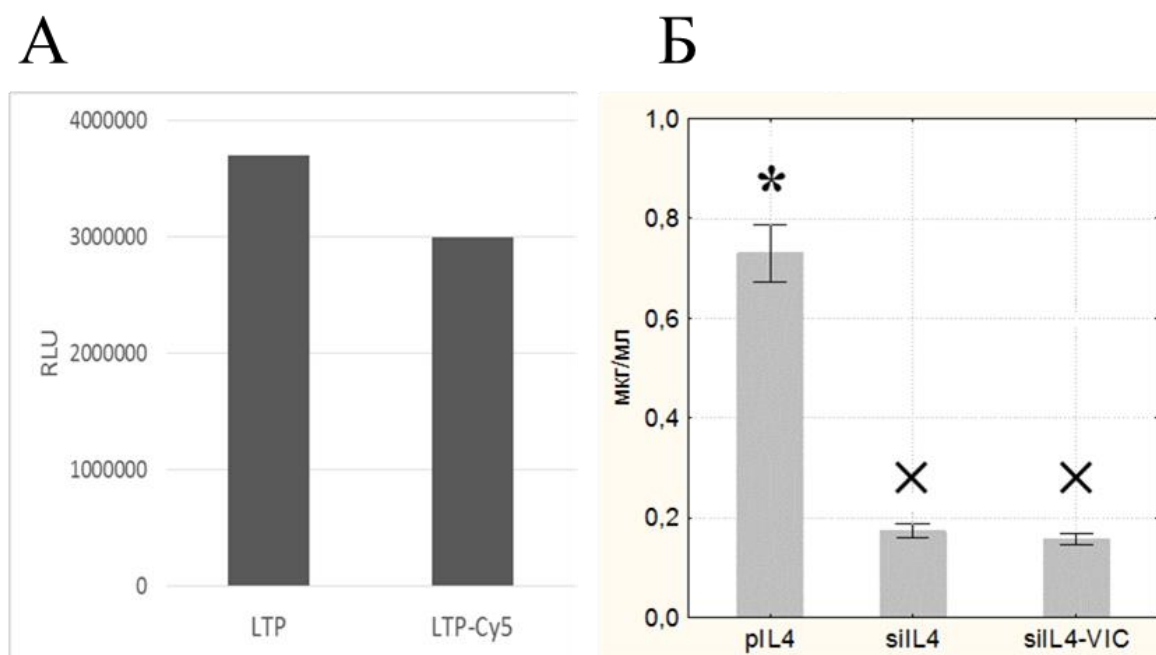


Рис. 3. Сравнение биологической активности меченного и не меченного пептида LTP (А) и меченых и немеченых молекул миРНК (Б).

А. Сравнение трансфекционной активности пептида LTP, меченного флуорофором Cy5 (LTP-Cy5) и немеченого пептида LTP. Представлены средние значения от 3-х независимых экспериментов.

Б. Концентрация ИЛ-4 человека в супернатантах клеток 293Т, обработанных молекулами миРНК, меченных флуорофором VIC (siIL4-VIC) и не меченными миРНК (siIL4).

Примечания.

Представлены средние значения \pm стандартная ошибка средней от 3-х независимых экспериментов. pIL4 – клетки 293Т, трансфицированные плазмидой pUCHR hIL4 IRES GFP, экспрессирующей ИЛ-4.

x - статистически значимо отличается от pIL4.

* - статистически значимо отличается от siIL4.

Поскольку изучаемый комплекс предполагается в дальнейшем вводить ингаляционно, то именно данный способ введения был использован в исследовании фармакокинетики на мышах. В эксперименте мыши помещались в специальные герметичные камеры, куда распыляли соответствующий аэрозоль и через определенные промежутки времени у мышей забирали биоматериал. В результате было показано, что молекулы как миРНК, так и пептида LTP детектировались в легких в течение 4 ч, при этом оба компонента имели короткий период полувыведения (в среднем 2 минуты) (табл. 3).

Табл. 3. Параметры фармакокинетики при ингаляционном и внутривенном пути введения комплекса siIL4-89-153/LTP мышам.

Путь введения	Компонент	С _{max} , нг/орган	T _{1/2} , мин.
Ингаляционный*	LTP	2361	1,9
	миРНК	118	2,0
Внутривенный	LTP	78**	2,2
	миРНК	5,1**	2,2
Внутривенный*	LTP	167	18,4
	миРНК	14	5,8

Примечания.

С_{max} - максимальная концентрация компонента комплекса. T_{1/2} - период полувыведения. * - оценивалась динамика концентрации компонентов комплекса в ткани легких. ** - данные представлены в виде нг/мл сыворотки крови.

В дополнительных экспериментах была изучена фармакокинетика при внутривенном введении. Хотя данный комплексный препарат не планируется водить внутривенно, этот этап является необходимым для

установления особенностей распределения его во внутренних органах с целью прогнозирования возможных побочных эффектов, а также для выяснения особенностей его метаболизма. Анализ данных подтвердил короткий период полувыведения обоих компонентов комплекса, который составил в среднем 2 минуты. При изучении распределения комплекса в органах было установлено, что оба компонента максимально накапливаются в легких, при этом тропность комплекса к данному органу скорее всего обеспечивается пептидом LTP, поскольку его период полувыведения составляет 18 минут (табл. 3).

Высокие концентрации компонентов комплекса отмечены в печени и почках, это позволяет предположить, что его метаболизм протекает в печени, а выведение метаболитов осуществляется почками. Данное предположение подтверждается исследованиями других коллективов, в которых молекулы миРНК также, как и в нашем исследовании, детектировали в моче.

Выявленный короткий период полувыведения был ожидаем, поскольку молекулы РНК и пептида являются биосовместимыми соединениями. С одной стороны, короткий период полувыведения позволяет ожидать отсутствие токсических эффектов, с другой стороны, биологический эффект комплекса может оказаться недостаточным.

3. Биологическая активность комплекса молекул миРНК против гена *il-4* и катионного пептида LTP

Ввиду значительных отличий геномов человека и мыши и того, что интерференция РНК является высокоспецифичным явлением, для изучения биологической активности в модели БА на мышах в состав

комплекса siIL4-89-153/LTP вместо молекул миРНК против *il-4* человека были включены молекулы миРНК против гена *il-4* мыши (siIL4-267 и siIL4-408) с аналогичной биологической активностью, предварительно доказанной в экспериментах *in vitro* [Шиловский и др., 2011; Шиловский и др., 2012].

В итоге комплекс молекул миРНК и пептида LTP – siIL4-267-408/LTP изучался на модели аллергической БА у мышей. Проведенное исследование показало, что семикратные ингаляции комплексом siIL4-267-408/LTP в дозе 483 мкг/кг/сут приводили к специфическому подавлению экспрессии гена *il-4* в клетках бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) и ткани легких в среднем на 30% (рис. 4А), и как следствие, к нивелированию проявлений БА. А именно, происходило снижение гиперреактивности бронхов в среднем на 20% (рис. 4Б). Также снижалась степень воспаления в ткани легких, что выражалось в уменьшении количества провоспалительных клеток эозинофилов и нейтрофилов в БАЛ в среднем в 2 раза (рис. 4В). Гистологический анализ ткани легких подтвердил снижение уровня инфильтрации эозинофилов и нейтрофилов в легкие, кроме того, отмечено снижение гиперплазии эпителия бронхов и нивелирование общей картины воспаления (рис. 5АБ).

Однако, несмотря на подавление экспрессии в легких гена *il-4*, отвечающего за синтез антител класса IgE, снижения уровня антител данного класса в сыворотке крови не было выявлено. Снижения уровня IgE-антител не наблюдается, по всей видимости, потому, что для этого необходимо попадание siIL4-267-408/LTP в системный кровоток. В то же время данные фармакокинетических исследований свидетельствуют, что при ингаляционном введении компоненты

комплекса не всасываются в кровь, а действует местно, т.е. в легких. Тем не менее полученные результаты о биологической активности комплекса молекул миРНК, направленных против гена *il-4*, и носителя – катионного пептида LTP, позволяют предположить, что данный подход является перспективным для будущей терапии воспалительных заболеваний дыхательных путей, в том числе – бронхиальной астмы.

Остается неясным вопрос – каким образом молекулы миРНК в комплексе с пептидом-носителем LTP, имея короткий период полувыведения, обеспечивают биологический эффект, длящийся не менее 2 суток? Можно предположить, что молекулы миРНК, благодаря пептидному носителю, довольно быстро проникают в цитоплазму клетки-мишени, где обеспечивают сайленсинг молекул мРНК целевого гена. К тому же антисмысловая цепь молекулы миРНК, включенная в комплекс RISC, способна осуществлять не один, а большое количество циклов разрезания целевой мРНК. Чтобы оценить скорость проникновения молекул пептида LTP в клетки, были проведены соответствующие исследования с использованием конфокальной микроскопии. Для этого пептид LTP был химически конъюгирован с флуоресцентной меткой Cy5 (LTP-Cy5) и внесен в культуру клеток 293T в объеме 40 мкл концентрацией 16 мкг/мл на 20 000 клеток. В результате пептид детектировался в цитоплазме клеток уже через 10-15 минут, а через 1 час его количество достигало плато (рис. 6). В тоже время, по данным фармакокинетики, компоненты комплекса миРНК/LTP детектировались в легких в течении 4 часов. Соответственно, можно ожидать, что данного отрезка времени достаточно для проникновения комплекса в цитоплазму клеток и проявления биологического эффекта.

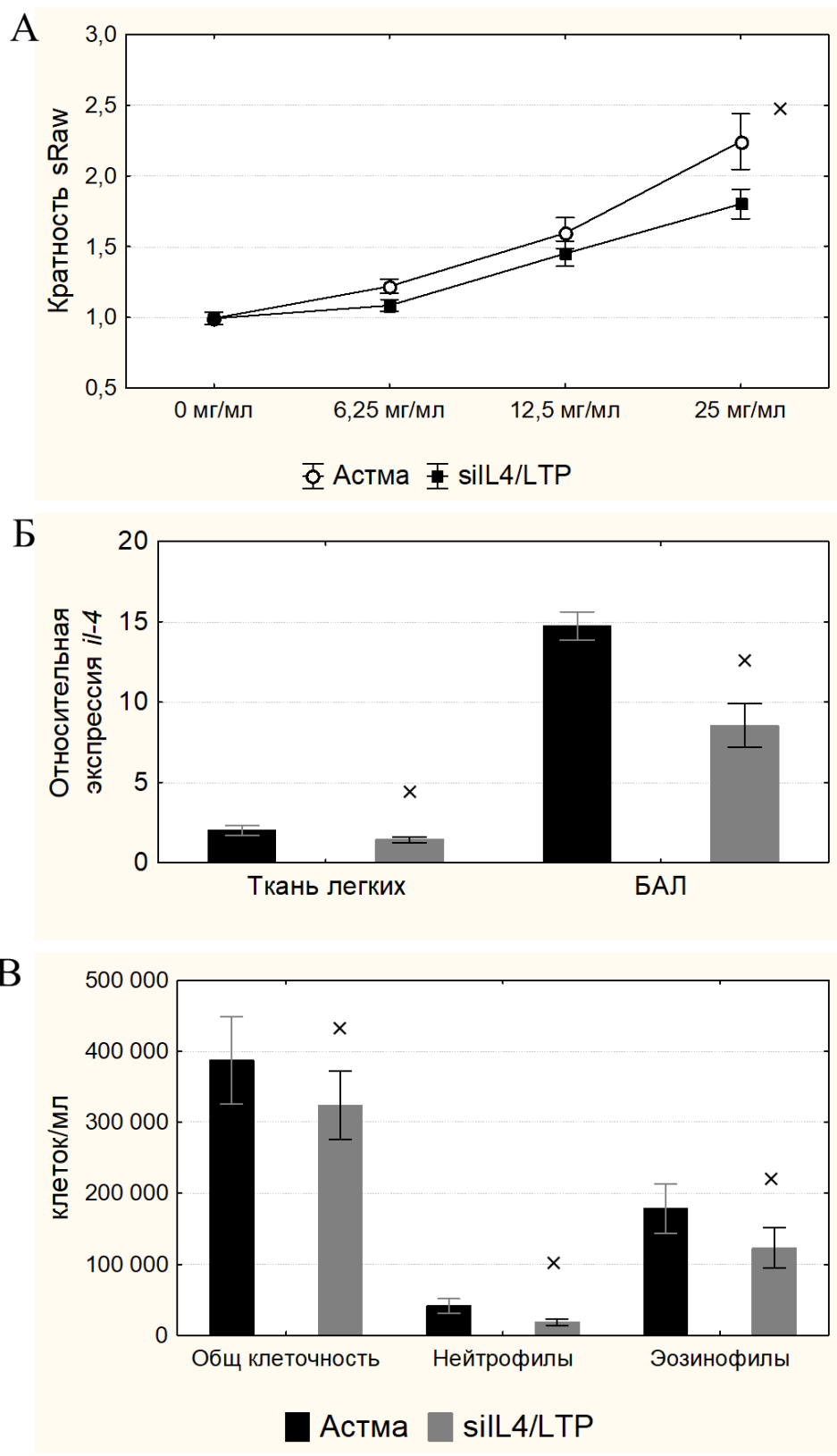
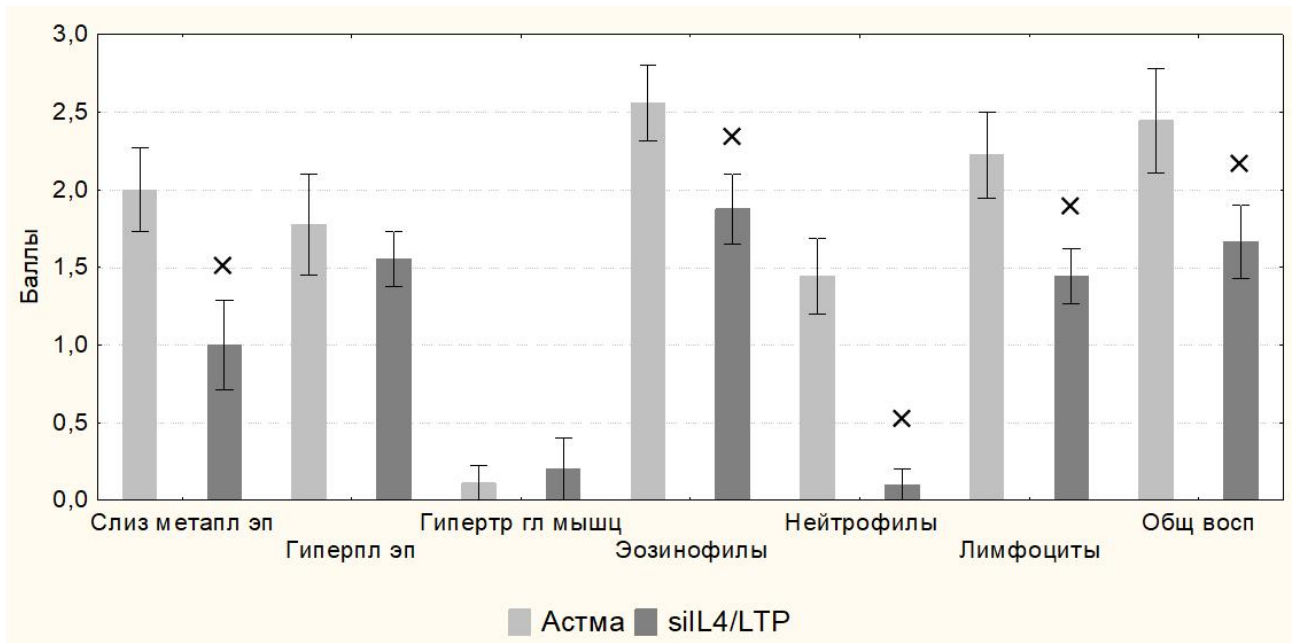
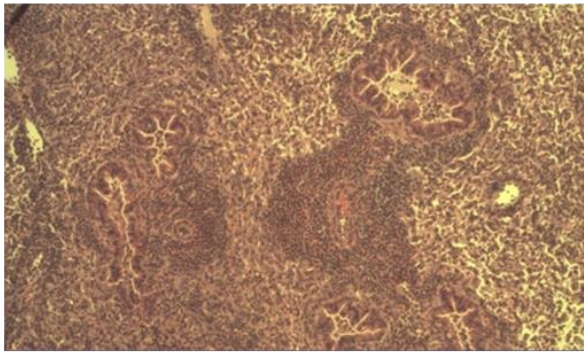


Рис. 4. Изменение проявлений экспериментальной БА у мышей после курса ингаляций комплексом молекул миРНК и пептида-носителя.
 А. Изменение уровня экспрессии гена *il-4* в ткани легких и клетках БАЛ.
 Б. Изменение гиперреактивности бронхов.
 В. Изменение клеточного состава БАЛ
 × - статистически значимо отличается от группы «Астма».

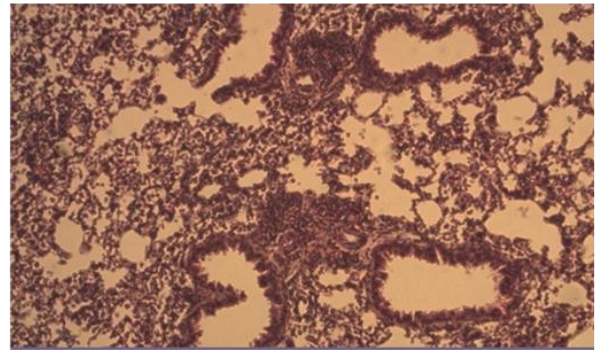
А



Б



Астма



siL4/LTP

Рис. 5. Гистологические исследования ткани легких у мышей после курса ингаляций комплексом молекул миРНК и пептида-носителя.

А. Оценка уровня воспаления в баллах.

Б. Микрофотографии ткани легких при увеличении в 100 раз.

x - статистически значимо отличается от группы «Астма».

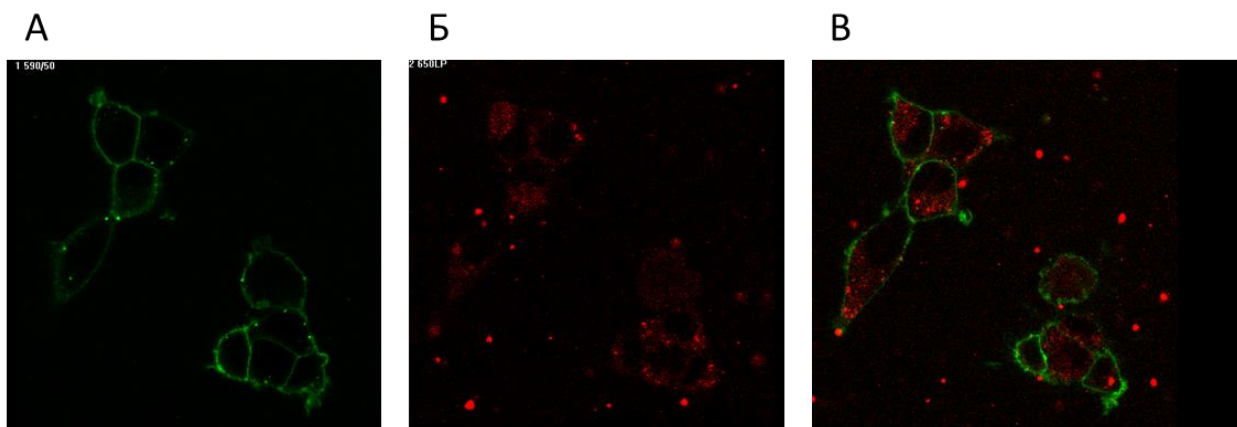


Рис. 6. Проникновение меченного пептида LTP (LTP-Cy5) в цитоплазму клеток 293Т.

А. Фотография, полученная при конфокальной микроскопии по каналу, соответствующему Nero-Dio (мембрана клетки).

Б. Фотография, полученная при конфокальной микроскопии по каналу, соответствующему Cy5 (пептид LTP).

В. Фотография, полученная при конфокальной микроскопии по обоим каналам.

Примечания.

Фотографии получены через 1 час после внесения LTP-Cy5 в культуру клеток. Пептид LTP, меченный флуорофором Cy5, обозначен красным цветом. Мембраны клеток окрашены Nero-Dio (Promo Kit) и обозначены на рисунке зеленым цветом.

Известно, что клетками-продуцентами ИЛ-4 являются лимфоциты (в частности Th2-лимфоциты, В-клетки и т.д.), в тоже время указанные типы клеток являются трудно трансфецируемыми, т.е. проникновение в них молекул нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) происходит с крайне низкой интенсивностью. Чтобы оценить, способен ли созданный пептид LTP обеспечивать транспорт нуклеиновых кислот в лимфоциты, были проведены отдельные эксперименты. Для этого выделяли лимфоциты из клеток селезенки мышей, культивировали их в полной среде ДМЕМ в течении 4 суток в присутствии комплекса, состоящего из плазмиды pGL3, несущей ген люциферазы светлячка и пептида LTP. После чего клетки лизировали и оценивали активность в них фермента люциферазы. В результате мы показали, что пептид был способен осуществлять

транспорт плазмидной ДНК внутрь лимфоцитов мыши; в тоже время плазида рGL3 в комплексе с коммерческим трансфекционным реагентом Lipofectamine2000 (Invitrogen) или без использования каких-либо носителей не проникала в эти клетки (рис. 7). По всей видимости LTP и Lipofectamine2000 осуществляют транспорт нуклеиновых кислот посредством различных механизмов.

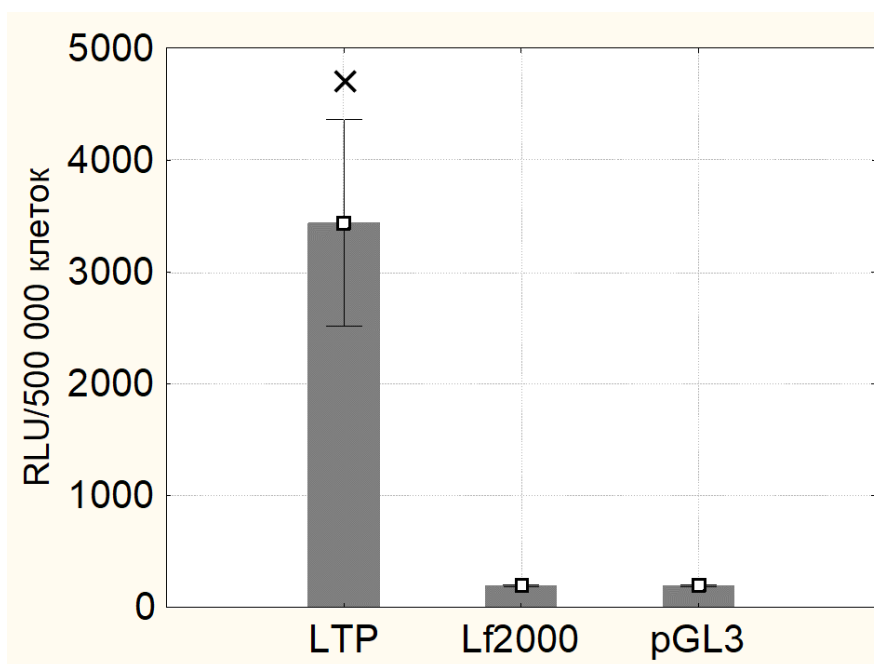


Рис. 7. Трансфекционная активность пептида LTP в культуре первичных клеток селезенки мыши.

Примечания.

Представлены средние значения от 5-ти независимых экспериментов.

Для пептида LTP изучалась трансфекционная активность при массовом соотношении LTP/pGL3 = 25/1.

RLU – relative light units – относительные световые единицы.

Lf2000 - положительный контроль (клетки лимфоциты селезенки мыши, обработанные рGL3 в комплексе с коммерческим трансфекционным реагентом Lipofectamine2000 (Invitrogen)).

pGL3– отрицательный контроль (клетки лимфоциты селезенки мыши, обработанные рGL3 без использования носителей).

x - статистически значимо отличается от «pGL3» и «Lf2000».

Таким образом, можно предполагать, что пептид LTP, находящийся в составе комплекса siIL4-89-153/LTP, способен обеспечить транспорт

молекул миРНК в клетки-мишени – лимфоциты, где они проявляют свою биологическую активность. Следует также отдельно отметить, что для индукции активности люциферазы в покоящихся лимфоцитах плазмиду рGL3 необходимо доставить в ядро клеток, т.е. через 2 биологические мембраны (клеточную и ядерную). В тоже время процесс интерференции РНК протекает в цитоплазме клеток, поэтому можно ожидать, что пептид LTR будет транспортировать молекулы миРНК с еще большей эффективностью.

4. Показатели безопасности комплекса siIL-89-153/LTR

После получения сведений об особенностях фармакокинетики и о биологической активности комплекса siIL-89-153/LTR в соответствии с действующей редакцией «Руководства по проведению доклинических исследований» [Миронов, 2012] были проведены исследования его безопасности. В ходе этих исследований изучались как общетоксические свойства комплекса, так и специфические виды токсических эффектов (иммунотоксичность, аллергизирующие свойства, мутагенность).

4.1. Общетоксические свойства siIL-89-153/LTR

В рамках изучения общетоксических свойств siIL-89-153/LTR проведены исследования острой и хронической токсичности на мышах. При изучении острой токсичности определяли диапазон летальных доз. Для этого мышам вводили тестируемый препарат в широком диапазоне доз. Максимально введенная доза составила 650 мкг/кг, что в 13 000 раз превышало предполагаемую терапевтическую. Препарат вводился внутривентрально, поскольку данный способ обеспечивает высокий уровень всасывания.

В результате показано, что однократное внутривентральное введение siIL-89-153/LTR в дозе 162,5 мг/кг не вызвало гибели животных, то есть

препарат был переносим. При введении комплекса в дозах 162,5 и 325 мг/кг происходила гибель части подопытных животных в первые сутки после введения (табл. 4). При этом ЛД₈₄ составило 650 мг/кг, а ЛД₅₀ = 325 мг/кг, что позволяет отнести данный комплекс к малотоксичным препаратам (классификация по К.К. Сидорову).

Табл. 4. Выживаемость самок мышей после однократного внутрибрюшинного введения siIL-89-153/LTP в различных дозах.

Доза, мг/кг	Количество выживших мышей					
	Исходно	1 сутки	3 сутки	7 сутки	10 сутки	14 сутки
ФР	6	6	6	6	6	6
162,5	6	6	6	6	6	6
325	6	3	3	3	3	3
650	6	1	1	1	1	1

Примечание.

ФР - физиологический раствор.

Крайне важным было исследование хронической токсичности комплекса при длительном ингаляционном введении мышам, т.к. именно данный способ имитирует клинический путь введения. Для этого мышей подвергали ежедневным ингаляциям комплекса siIL-89-153/LTP в течении 30 и 60 суток. В указанные периоды оценивали ряд показателей, характеризующих функциональное состояние жизненно важных органов и систем органов:

1. гематологические исследования крови,
2. биохимические исследования крови и мочи,
3. гистологические исследования внутренних органов.

Гематологические исследования периферической установили, что курс из 30 ингаляций не приводил к статистически значимым изменениям в сравнении с контрольными мышами. В то же время 60 ингаляций комплекса вызывали рост количества лейкоцитов, лимфоцитов и

моноцитов (таб. 5), тем не менее данные показатели находились в пределах физиологической нормы.

Табл. 5. Показатели периферической крови мышей после ингаляций комплексом siIL4-89-153/LTR в дозе 10 мкг/мышь, (M ± m).

Показатели	Физ. раствор	30 ингаляций	60 ингаляций
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	10,1 ± 0,1	9,3 ± 0,1	9,9 ± 0,1
Гемоглобин, г/л	164,1 ± 1,8	162,0 ± 1,3	161,2 ± 2,1
Гематокрит, %	45,8 ± 0,5	46,2 ± 0,6	44,6 ± 0,7
Средний объем эритроцита, фл	45,3 ± 0,5	47,1 ± 0,3	45,1 ± 0,4
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	16,2 ± 0,1	16,5 ± 0,1	16,4 ± 0,1
Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах, г/л	358,2 ± 2,7	351,2 ± 2,6	361,7 ± 3,3
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	787,7 ± 34,8	801,4 ± 30,9	873,2 ± 25,6
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	10,4 ± 0,7	11,7 ± 0,9	15,2 ± 1,2 *
Нейтрофилы палочкоядерные, %	1,2 ± 0,2	0,7 ± 0,2	1,8 ± 0,5
Нейтрофилы палочкоядерные, $\times 10^9/л$	0,13 ± 0,03	0,08 ± 0,02	0,26 ± 0,08
Нейтрофилы сегментоядерные, %	30,4 ± 1,5	27,3 ± 1,1	24,5 ± 2,4
Нейтрофилы сегментоядерные, $\times 10^9/л$	3,2 ± 0,3	3,2 ± 0,2	3,5 ± 0,2
Эозинофилы, %	1,9 ± 0,3	2,8 ± 0,4	1,5 ± 0,3
Эозинофилы, $\times 10^9/л$	0,20 ± 0,03	0,34 ± 0,07	0,22 ± 0,04
Моноциты, %	1,45 ± 0,16	1,18 ± 0,23	1,91 ± 0,31
Моноциты, $\times 10^9/л$	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,03	0,29 ± 0,04 *
Лимфоциты, %	65,2 ± 1,7	68,0 ± 1,2	70,4 ± 2,7
Лимфоциты, $\times 10^9/л$	6,7 ± 0,5	7,9 ± 0,7	10,9 ± 1,2 *

Примечание.

* - статистически значимо отличается относительно контроля, $p < 0,05$

При биохимическом исследовании сыворотки крови мышей, получивших 30 ингаляций комплекса, наблюдалось повышение триглицеридов на 34,7% и незначительное снижение мочевины и хлоридов на 21,7 и 7,7 % соответственно. Однако значения указанных показателей укладывались в физиологическую норму для данного вида животных. При этом после 60 ингаляций не наблюдалось каких-либо статистически значимых отклонений от контроля (табл. 6). Анализ биохимических показателей мочи показал сходные результаты, а именно после 30 ингаляций у мышей происходило незначительное повышение экскреции мочевины и хлоридов, что согласуется с данными биохимического анализа сыворотки крови (снижение мочевины и хлоридов на 21,7 и 7,7%, соответственно). Таким образом, биохимическими исследованиями сыворотки крови и мочи животных после многократного ингаляционного введения siIL4-89-153/LTP не выявлено нарушений белкового, липидного и углеводного обмена, а также функции печени и почек.

Табл. 6. Биохимические показатели сыворотки крови мышей после ингаляций siIL4-89-153/LTP в дозе 10 мкг/мышь, (M ± m).

Показатель	Единицы	Физ. раствор	30 ингаляций	60 ингаляций
Общий белок	г/л	51,20±0,9	55,8±2,4	50,2±0,4
Мочевина	мМоль/л	6,9±0,1	7,2±0,4*	6,9±0,4
Креатинин	мкМоль/л	48,4±4,7	54,5±1,5	43,0±2,5
АСТ	Е/л	532,2±4,9	96,0±13,3	545,4±2,6
АЛТ	Е/л	36,4±1,6	49,5±5,0	34,2±1,5
ЩФ	Е/л	250,0±7,1	248,7±5,4	260,6±6,3
Глюкоза	мМоль/л	5,9±0,3	5,8±0,1	5,5±0,2
Хлориды	мМоль/л	120,8±0,7	118,7±0,8*	116,6±1,9
Холестерин	мМоль/л	2,4±0,1	2,5±0,1	2,5±0,1
Триглицериды	мМоль/л	1,22±0,12	1,28±0,09*	1,36±0,11

* - статистически значимо отличается относительно контроля, p<0,05.

Гистологический анализ внутренних органов (легкие, сердце, печень, почки, надпочечники, органы репродуктивной системы, тимус, селезенка, перибронхиальные лимфатические узлы) мышей, получавших длительный курс ингаляций siIL-89-153/LTP, не выявил патологических изменений: признаков расстройства кровообращения, дистрофических, некробиотических, воспалительных реакций. Наблюдалось лишь умеренное снижение плотности тимоцитов в коре тимуса и увеличение ее в мозговом веществе, что свидетельствует о изменении темпов миграции лимфоидных клеток. В органе-мишени – легких – наблюдалась венозно-капиллярная гиперемия и накопление значительного числа макрофагов в просветах альвеол, однако данные изменения были слабо выраженными и обратимыми.

4.2. Изучение специфических видов токсичности

В рамках исследования специфических видов токсичности изучались иммунотоксичность, аллергизирующие свойства, а также мутагенность комплекса.

Иммунотоксичность изучалась на мышах как при внутрибрюшинном введении, как способе, обеспечивающем высокую биодоступность препарата, так и при ингаляционном, который имитирует клинический путь введения. Было показано, что внутрибрюшинное введение siIL4-89-153/LTP в широком диапазоне доз (0,1 - 10 мг/кг), вызывает, вне зависимости от дозы, почти двукратное увеличение количества антителообразующих клеток (АОК) к эритроцитам барана (табл. 7). Выявленная активация АОК характерна для иммунобиологических препаратов, к каковым относится и разрабатываемый комплекс. При этом стоит отметить, что т.н. поликлональный эффект в ответ на введение siIL-89-153/LTP экспериментальным мышам отсутствует, что позволяет прогнозировать

отсутствие активации комплексом аутореактивных клонов лимфоцитов и индукции/усиления аутоиммунных патологий.

Для уточнения эффекта siIL-89-153/LTP на активацию АОК были проведены дополнительные исследования, в которых комплекс многократно (14 раз по 1-й ингаляции в сутки) ингаляционно вводился мышам в дозе, соответствующей терапевтической (483 мкг/кг), установленной в ходе исследования специфической активности. В результате было показано, что предполагаемый клинический путь введения siIL4-89-153/LTP не индуцирует гуморального иммунного ответа, а количество АОК на селезенку у таких животных не отличается от контрольных значений.

Табл. 7. Количество антителообразующих клеток при однократном внутрибрюшинном введении siIL4-89-153/LTP.

Препарат	Доза, мг/кг	ИС АОК
Контроль	-	1,00± 0,10
siIL4-89-153/LTP	0,1	2,38± 0,40**
	1	2,09± 0,44**
	10	2,65 ±0,36***

Примечания.

ИС – индекс стимуляции. Статистическая значимость отличий от контроля: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Также показано, что однократное внутрибрюшинное и многократное ингаляционное введение комплекса siIL-89-153/LTP не влияет на интегральную реакцию клеточного иммунитета – гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ). Для ее оценки мышей иммунизировали подкожно эритроцитами барана. Перед иммунизацией мышам вводили siIL-89-153/LTP однократно внутрибрюшинно в дозах 0,1, 1 и 10 мг/кг

или ингаляционно (14 ежедневных ингаляций в дозе 483 мкг/кг/сут). Животным контрольной группы на фоне иммунизации вводили физиологический раствор. На 5 сутки в правую лапку мышей опытных и контрольной групп проводили разрешающую инъекцию антигена (эритроциты барана), в левую – физиологический раствор. Разрешающей инъекции были подвергнуты также неиммунизированные мыши (интактные). Через 24 часа регистрировали величину отека путем определения массы «опытной» и «контрольной» лапок. Индекс реакции выражали в процентах прироста массы лапки. В результате контрольная группа животных характеризовалась высоким индексом реакции – 20,5 %, что свидетельствует о развитии специфической воспалительной реакции ГЗТ. Введение животным siIL4-89-153/LTP внутрибрюшинно или ингаляционно не усиливало активность Т-клеток - индукторов ГЗТ: индекс реакции не отличался от такового у животных контрольной группы (табл. 8). Таким образом, показано, что siIL4-89-153/LTP даже в 200-кратной передозировке не оказывал влияния на интегральную реакцию клеточного иммунитета.

Табл. 8. Влияние siIL4-89-153/LTP на интенсивность развития реакции гиперчувствительности замедленного типа к ЭБ.

№ гр.	Группы	Доза, мг/кг	Индекс реакции, %
1	Контроль	ФР	20,54 ± 2,18
2	siIL4-89-153/LTP	0,1	20,47 ± 1,94
3		1	20,92 ± 2,25
4		10	21,64 ± 1,75
5	Интактные		4,01 ± 0,67

Примечание.

ФР – физиологический раствор.

Различия значений гр. 2-4 от контроля статистически незначимы.

В отдельных экспериментах исследовали количество и функциональную активность фагоцитов различной локализации: нейтрофилов крови, фагоцитирующих клеток селезенки, перитонеального экссудата, костного мозга, поскольку именно эти клетки являются главными участниками противоинфекционной защиты и развития специфического иммунного ответа. Для этого мышам вводили комплекс в дозах 0,1, 1 и 10 мг/кг внутривентрально за 4 суток до оценки результатов. Контрольные животные получали физиологический раствор. Полученные результаты показывают, что после однократного внутривентрального введения функциональная активность фагоцитов различной локализации практически не изменяется. Исключение составляют только фагоциты селезенки, активность которых при введении препарата в максимальной дозе снижается почти вдвое. При этом активность фагоцитов перитонеального экссудата повышалась в полтора раза. Дополнительные исследования показали, что длительное ингаляционное введение комплекса siIL-4-89-153/LTP не оказывало влияния на активность указанных фагоцитов. Таким образом, siIL-4-89-153/LTP не оказывает негативного влияния на количество и активность фагоцитирующих клеток различной локализации. В совокупности полученные данные о влиянии комплекса на гуморальный и клеточный иммунитет и активность фагоцитов свидетельствуют об иммунологической безопасности комплекса siIL-4-89-153/LTP.

При изучении **аллергизирующих свойств** siIL-4-89-153/LTP использовано несколько видов тестов. Во-первых, оценена способность комплекса напрямую индуцировать дегрануляцию базофилов гистамина – одного из главных медиаторов аллергии. Хотя при классической аллергической реакции его высвобождение опосредуется антителами класса IgE, локализующимися на поверхности клеток, в отдельных случаях гистамин может высвобождаться в ответ на прямое воздействие препарата. Поскольку в составе комплекса siIL-4-89-153/LTP содержится катионный пептид LTP, способный воздействовать на мембраны клеток,

то было целесообразным изучение степени либерации гистамина базофилами крови в ответ на их контакт с комплексом. Для этого цельную гепаринизированную кровь, полученную от доноров, совместно инкубировали с возрастающими концентрациями siIL-89-153/LTP. В качестве положительного контроля к образцам крови вносили антитела IgE; в качестве отрицательного – физиологический раствор. Как и ожидалось, физиологический раствор не вызвал высвобождения гистамина базофилами крови. В то же время IgE-антитела, наоборот, индуцировали высвобождения гистамина, причем для доноров с патологиями значения были выше, чем для здоровых доноров. Это свидетельствуют о более высокой чувствительности базофилов крови у данных доноров. Инкубация с различными концентрациями siIL4-89-153/LTP не приводила к высвобождению гистамина клетками, лишь клетки, полученные от доноров с патологиями дыхательных путей, высвобождали незначительные количества гистамина (табл. 9).

Табл. 9. Индукция высвобождения гистамина базофилами крови, нг/мл.

№	Препарат	Конц, мкг/мл	Здоровые доноры	Доноры с патологиями дыхательных путей
1	siIL4-89-153/LTP	1000	нпо	19±15
2	siIL4-89-153/LTP	100	нпо	нпо
3	siIL4-89-153/LTP	10	нпо	18±12
4	siIL4-89-153/LTP	1	нпо	17±8
5	siIL4-89-153/LTP	0,1	нпо	нпо
6	siIL4-89-153/LTP	0,01	нпо	нпо
7	anti-IgE	разведение 1:100	391±97	1023±164
8	Контроль	0	нпо	нпо

Примечание.

нпо - ниже предела определения (10 нг/мл).

Во-вторых, изучена способность компонентов комплекса индуцировать синтез антител класса IgE. Как упоминалось выше, ключевыми медиаторами классической аллергии являются IgE-антитела, которые, сорбируясь на тучных клетках и базофилах, способствуют их дегрануляции и высвобождению медиаторов воспаления, таких, как гистамин и лейкотриены. Поэтому крайне важно изучить, каким образом длительное ингаляционное введение siIL4-89-153/LTP влияет на продукцию IgE. Для этого методом твердофазного ИФА было оценено содержание общего и специфического IgE в сыворотке крови у животных после длительного курса siIL4-89-153/LTP (60 ежедневных ингаляций в дозе 500 мкг/кг/сут). В итоге, не было обнаружено каких-либо заметных изменений в уровнях общих и специфических антител класса IgE. Однако метод ИФА не всегда демонстрирует высокую специфичность. Поэтому было проведено дополнительное исследование методом пассивной кожной анафилаксии на крысах, который также не выявил наличия антител класса IgE.

Известно, что в аллергическом воспалении участвуют эозинофилы, которые инфильтрируют в источник воспаления – в данном случае в ткань легких, выделяя медиаторы воспаления, которые повреждают бронхиальный эпителий, оказывают воздействие на гладкую мускулатуру бронхов, вызывая бронхokonстрикцию. Поэтому мы изучили клеточный состав смывов легких – БАЛ – мышей, подвергавшихся длительному периоду ингаляций комплексом siIL4-89-153/LTP. Как показали исследования, общее содержание клеток в БАЛ составило 190 000 – 270 000 клеток/мл. При этом содержание эозинофилов в БАЛ составило 400-450 клеток/мл (менее 1 %), что является крайне низким значением, в то время как при аллергическом воспалении содержание эозинофилов может достигать 100 000 – 200 000 клеток/мл. Таким образом, компоненты комплекса неаллергенны, поскольку не происходит

индукции специфических антител класса IgE, а длительное ингаляционное введение siIL-89-153/LTP не вызывает местного (в легких) раздражающего действия.

Мутагенные свойства siIL-89-153/LTP оценивали в трех тестах:

1. в тесте Эймса на индикаторных штаммах *Salmonella typhimurium*,
2. в тесте хромосомных aberrаций *in vivo*,
3. в тесте ДНК-комет *in vivo*.

Тест Эймса основан на детекции обратных мутаций к прототрофности по гистидину у штаммов *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100. В ходе исследования указанные штаммы инкубировали с тестируемым комплексом и высевали на специально подготовленные питательные среды с последующим подсчетом числа выросших мутантных колоний. Было показано, что широкий диапазон концентраций siIL-89-153/LTP не индуцировал мутации, в то время как контрольное соединение в 4-5 раз увеличивало частоту мутаций (табл. 10).

Табл. 10. Результаты исследования мутагенной активности siIL-89-153/LTP в тесте Эймса.

Доза, мкг на чашку	Число ревертантных колоний, КОЕ		
	TA100	TA98	TA97
1000	143 ± 12	124 ± 12	74 ± 12
100	143 ± 9	125 ± 8	76 ± 11
10	142 ± 10	125 ± 12	73 ± 10
1	139 ± 9	126 ± 11	75 ± 7
0,1	143 ± 12	124 ± 12	76 ± 11
Отрицательный контроль	144 ± 12	125 ± 8	73 ± 7
Положительный контроль	695 ± 26*	715 ± 31*	597 ± 35*

Примечание.

* - статистически значимо отличается от отрицательного контроля.

Мутагенное действие siIL-4-89-153/LTP изучали также в тесте учета хромосомных aberrаций *in vivo* на мышах при двух способах введения: однократном внутрибрюшинном, как способе, обеспечивающем максимальную биодоступность, и при семикратном интраназальном введении, как способе, имитирующем рекомендованный клинический путь введения (ингаляционный). Животным из группы отрицательного контроля вводили физиологический раствор, положительного контроля – циклофосфамид с доказанными мутагенными свойствами. Далее готовили цитогенетические препараты костного мозга мышей и подсчитывали частоту хромосомных aberrаций.

В результате после однократного внутрибрюшинного введения siIL-89-153/LTP не отмечено статистически значимого увеличения количества клеток со структурными нарушениями хромосом по сравнению с группой отрицательного контроля. Доля поврежденных клеток у мышей не достигала 2%. В то же время в группе положительного контроля доля поврежденных клеток была статистически значимо выше и оставляла $7,20 \pm 1,30\%$ (табл. 11).

При семикратном интраназальном введении siIL-4-89-153/LTP мышам в дозе 0,5 мкг/кг также не отмечено статистически значимого увеличения количества клеток со структурными нарушениями хромосом ($1,40 \pm 0,55\%$) по сравнению с группами отрицательного контроля.

Табл. 11. Результаты оценки цитогенетической активности siIL-4-89-153/LTP при введении мышам однократно внутрибрюшинно.

№	Препарат	Доза	Частота aberrаций, %
1	siIL-4-89-153/LTP	65 мг/кг	$1,60 \pm 1,14$
2	siIL-4-89-153/LTP	0,5 мг/кг	$1,20 \pm 0,84$
3	Отрицательный контроль	0	$1,80 \pm 0,84$
4	Положительный контроль	-	$7,20 \pm 1,30^*$

Примечание.

* - статистически значимо отличается от отрицательного контроля.

Было проведено изучение ДНК-повреждающего действия siIL-89-153/LTP на мышах в тесте ДНК-комет. Для этого животным вводили комплекс в дозе 6 мг/кг интраназально и в дозе 60 мг/кг внутривентриально. часа после введения. Мышам группы положительного контроля внутривентриально вводили генотоксикант диоксидин, отрицательного контроля – физиологический раствор. Забой животных и приготовление микропрепаратов проводили через 3 и 24, в ходе которого осуществляли забор клеток костного мозга, также забирали печень, почки и легкое, из которых получали суспензии клеток. Суспензии клеток подвергали лизису и электрофорезу, по окончании которого микропрепараты фиксировали в 70% растворе этилового спирта, окрашивали SYBR Green I и изучали фотографии при УФ-излучении. Полученные изображения ДНК-комет анализировали, при этом в качестве показателя поврежденности ДНК использовали процентное содержание ДНК в хвосте ДНК-комет.

В результате анализа показано, что у животных после введения диоксидина происходило статистически значимое возрастание повреждений ДНК во всех исследуемых органах и тканях. При этом в органах и тканях мышей, получавших физиологический раствор, а также siIL-89-153/LTP, ДНК-повреждающее действие не выявлялось (табл. 12), что свидетельствует об отсутствии у исследуемого препарата ДНК-повреждающей активности.

Таким образом, проведенные исследования показали, что разработанный комплекс siIL-89-153/LTP относится к малотоксичным соединениям, не вызывает негативного действия на компоненты врожденного и приобретенного иммунитета, не обладает местным раздражающим действием, не индуцирует аллергические реакции, а также не является мутагенным.

Табл. 12. Влияние siIL4-89-153/LTP на уровень повреждений ДНК в органах и тканях мышей при 3-часовой экспозиции.

Группа	%ДНК в хвосте			
	Клетки костного мозга	Клетки печени	Клетки почек	Клетки легкого
Отрицательный контроль	0.7±0.3	0.7±0.4	1.0±0.3	0.4±0.2
6 мг/кг, интраназально	0.6±0.2	0.5±0.2	1.0±0.4	0.6±0.2
60 мг/кг, внутрибрюшинно	0.6±0.2	0.6±0.1	1.4±0.2	0.4±0.2
Диоксидин	13.9*±3.9	18.7*±4.5	36.6*±5.8	17.0*±2.1

Примечание.

* - статистически значимо отличается от отрицательного контроля.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментально доказана перспективность применения интерференции РНК в качестве инновационного подхода к антицитокиновой терапии аллергической бронхиальной астмы.
2. Сконструированы молекулы миРНК, подавляющие экспрессию гена *il-4* человека, и катионный дендримерный пептид LTP, способный транспортировать нуклеиновые кислоты в различные типы клеток, включая лимфоциты. Экспериментально обоснован состав и соотношение компонентов комплекса молекул миРНК и пептида LTP (siIL-89-153/LTP).
3. Предложен новый способ изучения фармакокинетики РНК-содержащих препаратов с использованием химически конъюгированных флуоресцентных меток и последующей их идентификацией методом ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией.
4. При ингаляционном введении животным комплекс siIL-89-153/LTP стабилен в органе-мишени – легких, о чем свидетельствует равный

период полувыведения его компонентов (молекул миРНК и пептида LTP) (составляющий ~2 минуты), при этом оба компонента комплекса не всасываются в системный кровоток.

5. Продемонстрирована биологическая активность комплекса молекул миРНК и пептида LTP на модели бронхиальной астмы у мышей. Семикратное ингаляционное введение комплекса в дозе 483 мкг/кг/сут приводило к снижению на 30%, уровня экспрессии гена *il-4* в клетках БАЛ, снижению на 20%, бронхиальной гиперреактивности, снижению уровня аллергического воспаления в ткани легких.
6. Установлена ЛД₅₀, равная 325 мг/кг, что позволяет отнести комплекс siIL-89-153/LTP к классу малотоксичных соединений.
7. Длительное ингаляционное введение комплекса siIL-89-153/LTP мышам в дозе 500 мг/кг не оказывало повреждающего действия на жизненно важные системы органов.
8. Установлено, что комплекс siIL-89-153/LTP не оказывает негативного действия на компоненты врожденного и приобретенного иммунитета, не обладает местным раздражающим действием, не индуцирует аллергические реакции, а также не является мутагенным.
9. Созданный иммунобиологический комплекс siIL-89-153/LTP является перспективной основой инновационного лекарственного препарата для антицитокиновой терапии аллергической бронхиальной астмы.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Хаитов М.Р., Литвин Л.С., **Шиловский И.П.**, Башкатова Ю.Н., Мазуров Д.В., Файзулов Е.Б., Зверев В. Разработка и изучение наноструктур, обладающих РСВ-специфической противовирусной активностью *in vivo*. Физиология и патология иммунной системы. 2009. Т. 13. № 6. С. 3-7.
2. **Шиловский И.П.**, Бабахин А.А., Зайцев И.С., Башкатова Ю.Н., Литвин Л.С., Андреев И.В., Козмин Л.Д., Мартынов А.И., Хаитов М.Р. Влияние аллерген-специфической иммунотерапии на краткосрочную безадыювантную модель IgE-зависимой бронхиальной астмы у мышей. Российский аллергологический журнал. 2009. № S3. С. 30-31.
3. **Шиловский И.П.**, Мазуров Д.В., Файзулов Е.Б., Хаитов М.Р. shRNA опосредованное ингибирование репликации РСВ. Сообщение №1. Создание векторных конструкций для сайленсинга гена Р. Физиология и патология иммунной системы. 2010. Т. 14. № 7. С. 7-13.
4. **Шиловский И.П.**, Мазуров Д.В., Хаитов М.Р. Разработка векторных конструкций для сайленсинга Р-гена респираторного синцитиального вируса. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2010. № 4. С. 11-16.
5. Хаитов М.Р., Литвин Л.С., **Шиловский И.П.**, Башкатова Ю.Н., Файзулов Е.Б., Зверев В.В. Интерференция РНК. Новые подходы к разработке противовирусных препаратов. Иммунология. 2010. Т. 31. № 2. С. 69-76.
6. Хаитов М.Р., **Шиловский И.П.**, Хаитов Р.М. Интерфероны третьего типа. Успехи современной биологии. 2010. Т. 130. № 2. С. 147-153.
7. **Шиловский И.П.**, Мазуров Д.В., Шершакова Н.Н., Хаитов М.Р. Разработка модели РНКи-опосредованной супрессии гена интерлейкина-4 *in vitro*. Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика. 2011. Т. 15. № 6. С. 3-12.

8. **Шиловский И.П.**, Башкатова Ю.Н., Мазуров Д.В., Файзулов Е.Б., Хаитов М.Р. Lentивирусная система доставки shRNA обеспечивает подавление репликации РСВ *in vitro* посредством активации механизма интерференции РНК. Иммунология. 2011. Т. 32. № 1. С. 6-11.
9. Бабахин А.А., **Шиловский И.П.**, Андреев И.В., Козмин Л.Д., Ходаковский И.П., Мартынов А.И., Хаитов М.Р. Экспериментальная аллерген-специфическая иммунотерапия аллерговакциной «Тимпол» на модели IgE-зависимой бронхиальной астмы у мышей. Иммунология. 2012. Т. 33. № 3. С. 134-141.
10. Башкатова Е.Н., Андреев С.М., Шершакова Н.Н., Бабахин А.А., **Шиловский И.П.**, Хаитов М.Р. Разработка препаратов, подавляющих аллергическое воспаление, и их тестирование в модели гиперчувствительности замедленного типа. синтез и изучение эффектов катионных аддуктов фуллерена C60. Российский аллергологический журнал. 2012. № S5. С. 19-20.
11. **Шиловский И.П.**, Мазуров Д.В., Шершакова Н.Н., Хаитов М.Р. миРНК специфически подавляют продукцию интерлейкина-13 *in vitro*. Российский аллергологический журнал. 2012. № 6. С. 24-27.
12. **Шиловский И.П.**, Мазуров Д.В., Шершакова Н.Н., Литвин Л.С., Гасанов В.А., Хаитов М.Р. Синтетические siRNA эффективно подавляют экспрессию провоспалительного цитокина интерлейкина-4 мыши *in vitro*. Иммунология. 2012. Т. 33. № 2. С. 66-70.
13. **Шиловский И.П.**, Никонова А.А., Кофиади И.А., Хаитов М.Р. Применение антисмысловых технологий для разработки препаратов, подавляющих активность вируса гепатита С. Химическая и биологическая безопасность. 2013. № S. С. 157-162.
14. **Шиловский И.П.**, Бабахин А.А., Прозорова М.С., Гайсина А.Р., Камышников О.Ю., Хаитов М.Р. Разработка безадьювантной модели

- хронической бронхиальной астмы у мышей. Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8. № 3 (17). С. 638-641.
15. Khaitov M.R., **Shilovskiy I.P.**, Nikonova A.A., Shershakova N.N., Kamyshnikov O.Y., Babakhin A.A., Zverev V.V., Johnston S.L., Khaitov R.M. siRNAs targeted to IL-4 and RSV reduce airway inflammation in a mouse model of virus-induced asthma exacerbation. *Human Gene Therapy*. 2014. Т. 25. № 7. С. 642-650.
 16. Шершакова Н.Н., Бабахин А.А., Башкатова Е.Н., Камышников О.Ю., Андреев С.М., **Шиловский И.П.**, Хаитов М.Р. Аллерген-специфическая иммунотерапия при экспериментальном atopическом дерматите. *Иммунология*. 2014. Т. 35. № 3. С. 155-160.
 17. Osminkina L.A., Timoshenko V.Yu., Shevchenko S.N., Gongalsky M.B., Tamarov K.P., Abramchuk S.S., Nikiforov V.N., **Shilovsky I.P.**, Khaitov M.R., Kornilaeva G.V., Karamov E.V. Porous silicon nanoparticles as scavengers of hazardous viruses. *Journal of Nanoparticle Research*. 2014. Т. 16. № 6. С. 2430.
 18. Бабахин А.А., Ласкин А.А., Камышников О.Ю., Шершакова Н.Н., **Шиловский И.П.**, Бержец В.М., Гущин И.С., Хаитов М.Р. Модель экспериментальной бронхиальной астмы, индуцированной у мышей аллергическим экстрактом из клещей домашней пыли *Dematophagoides pteronyssinus*. *Российский аллергологический журнал*. 2015. № 6. С. 25-33.
 19. **Shilovsky I.P.**, Babakhin A.A., Shershakova N.N., Kamyshnikov O.Y., Sundukova M.S., Gaisina A.R., Laskin A.A., Buzuk A.M., Ivanova A.S., Khaitov M.R. Adjuvant and adjuvant-free protocols produce similar phenotypes of allergic asthma in mice. *Current Trends in Immunology*. 2015. Т. 16. С. 79-91.
 20. Koloskova O.O., Nikonova A.A., Budanova U.A., **Shilovsky I.P.**, Kofiadi I.A., Ivanov A.V., Smirnova O.A., Zverev V.V., Sebyakin Yu.L., Andreev S.M., Khaitov M.R. Synthesis and evaluation of novel lipopeptide as a

vehicle for efficient gene delivery and gene silencing. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2016. Т. 102. С. 159-167.

21. **Шиловский И.П.**, Сундукова М.С., Гайсина А.Р., Ласкин А.А., Смирнов В.В., Бабахин А.А., Хаитов М.Р. Интерференция РНК - новый подход в терапии аллергической бронхиальной астмы (обзор). *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2016. Т. 79. № 4. С. 35-44.
22. Гайсина А.Р., **Шиловский И.П.**, Никонова А.А., Сундукова М.С., Зарецкая М.А., Смирнов В.В., Камышников О.Ю., Иванова А.С., Хаитов М.Р. Изучение баланса Th1/Th2-иммунного ответа при вирус-индуцированных осложнениях бронхиальной астмы. *Российский аллергологический журнал*. 2016. № 4-5. С. 20-28.
23. **Шиловский И.П.**, Ерошкина Д.В., Бабахин А.А., Хаитов М.Р. Антицитокиновая терапия бронхиальной астмы. *Молекулярная биология*. 2017. Т. 51. № 1. С. 3-17.
24. Michael R Edwards, Ross P Walton, David J Jackson, Wojciech Feleszko, Chrysanthi Skevaki, Tuomas Jartti, Heidi Makrinoti, Alexandra Nikonova, **Igor Shilovskiy**, Jurgen Schwarze, Sebastian L Johnston, Musa Khaitov The potential of anti-infectives and immunomodulators as therapies for asthma and asthma exacerbations. *Allergy*. 2017.

Патенты:

1. Хаитов М.Р., Смирнов В.В., Андреев С.М., Сергеев И.В., Маерле А.В., Лобанова С.Б., Калинина Е.В., **Шиловский И.П.** Композиция для подавления экспрессии гена цитокина интерлейкина-4. Патент на изобретение RUS 2563989 20.11.2014.
2. Хаитов М.Р., Мазуров Д.В., Никонова А.А., **Шиловский И.П.** Способ профилактики и лечения бронхиальной астмы, осложняющих ее респираторных вирусных инфекций и других воспалительных заболеваний дыхательных путей. Патент на изобретение RUS 2526146 27.09.2012.

3. Хаитов М.Р., Сидорович И.Г., Шевалье А.Ф., Гасанов В.А., **Шиловский И.П.** Способ очистки рекомбинантного белка интерфероноподобного фактора III типа. Патент на изобретение RUS 2549710 29.06.2012
4. Андреев С.М., Чупина Н.А., **Шиловский И.П.**, Хаитов М.Р. Средство для внутриклеточной доставки нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих. Патент на изобретение RUS 2572575 31.10.2014
5. Хаитов М.Р., Андреев С.М., Сергеев И.В., Маерле А.В., Лобанова С.Б., Ерошкина Д.В., **Шиловский И.П.** Использование композиции, состоящей из катионного пептида LTP и молекул РНК, против респираторных вирусов. Патент на изобретение RUS №2609857 от 02.11.2015 г.
6. Андреев С.М., **Шиловский И.П.**, Сундукова М.С., Маерле А.В., Сергеев И.В. Меченные дендримерные пептиды. Патент на изобретение RUS №2611399 от 19.01.2016.