



УДК 577.113.4

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИПОФИЛЬНЫХ КОНЬЮГАТОВ МОДИФИЦИРОВАННЫХ siРНК С ГЕМОПОЭТИЧЕСКИМИ КЛЕТКАМИ *in vitro* И *in vivo*

© 2021 г. И. В. Черников*, М. И. Мещанинова*, Д. В. Гладких*,
А. Г. Веньяминава*, М. А. Зенкова*, В. В. Власов*, Е. Л. Черноловская*.[#]

*ФГБУН “Институт химической биологии и фундаментальной медицины” СО РАН,
Россия, 630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 24.08.2020 г.

После доработки 03.09.2020 г.

Принята к публикации 14.09.2020 г.

Доставка малых интерферирующих РНК (siРНК) в клетки крови является одной из наиболее сложных задач, поскольку эффективные и нетоксичные способы доставки нуклеиновых кислот в эти клетки *in vivo* отсутствуют. Конъюгирование siРНК с адресными или липофильными молекулами-доставщиками является одним из наиболее перспективных подходов к решению этой задачи, поскольку может обеспечивать эффективное накопление siРНК без побочных токсических эффектов. В данной работе мы конъюгировали siРНК с липофильными молекулами для ее доставки в первичные мононуклеарные клетки крови (РВМС) и клетки цельной крови. Мы показали, что среди исследованных липофильных молекул холестерин является наиболее перспективным агентом для этой цели. Дальнейший скрининг конъюгатов по длине линкера, соединяющего siРНК и холестерин, показал, что линкер, содержащий 6 атомов углерода, является оптимальным для эффективной доставки siРНК в клетки человека в составе цельной крови. Выбранный холестериновый конъюгат siРНК также эффективно накапливался в клетках крови и спленоцитах мыши после внутривенной инъекции.

Ключевые слова: siРНК, химические модификации, липофильные конъюгаты, гемопоэтические клетки, доставка в клетки

DOI: 10.31857/S013234232102007X

ВВЕДЕНИЕ

Создание препаратов на основе малых интерферирующих РНК (siРНК) является перспективным подходом к лечению заболеваний, связанных с нарушением экспрессии определенных генов, которые не поддаются лечению стандартными методами. Однако доставка siРНК в клетки-мишени *in vitro* и особенно *in vivo* остается в настоящее время сложной и актуальной задачей, решение которой необходимо для внедрения результатов биомедицинских исследований в клиническую практику [1]. Введение остатков молекул природного происхождения в состав siРНК путем их прямого конъюгирования с siРНК на сегодняшний день является наиболее перспективной техноло-

гией доставки, поскольку, в отличие от других подходов (вирусные векторы, доставка с помощью катионных липидов и полимеров), преимуществами использования биоконъюгатов являются специфичность и эффективность их проникновения в клетки-мишени при отсутствии токсических эффектов [2–5]. Гемопоэтические клетки считаются наиболее сложными для доставки в них siРНК, при этом разработка систем доставки siРНК в данные клетки крайне необходима для совершенствования методов антиретровирусной терапии и повышения эффективности лечения опухолевых заболеваний крови [6, 7]. Поэтому оценка возможности использования биоконъюгатов для доставки siРНК в гемопоэтические клетки является актуальной.

В данной работе было исследовано взаимодействие липофильных производных siРНК с клетками крови *in vitro* и *in vivo* и показано, что из всех исследованных липофильных молекул именно присоединение холестерина к siРНК способствует наиболее эффективному накоплению siРНК

Сокращения: А – Alexa Fluor-488; Ch – холестерин; F – флуоресцеин; Lf – Липофектамин; Lt – литохоловая кислота; OILt – олеиламид литохоловой кислоты; РВМС – первичные мононуклеарные клетки крови (primary blood mononuclear cells); siРНК – малая интерферирующая РНК (small interfering RNA, siRNA); Тосо – α -токоферол.

[#] Автор для связи: (эл. почта: elena_ch@niboch.nsc.ru).

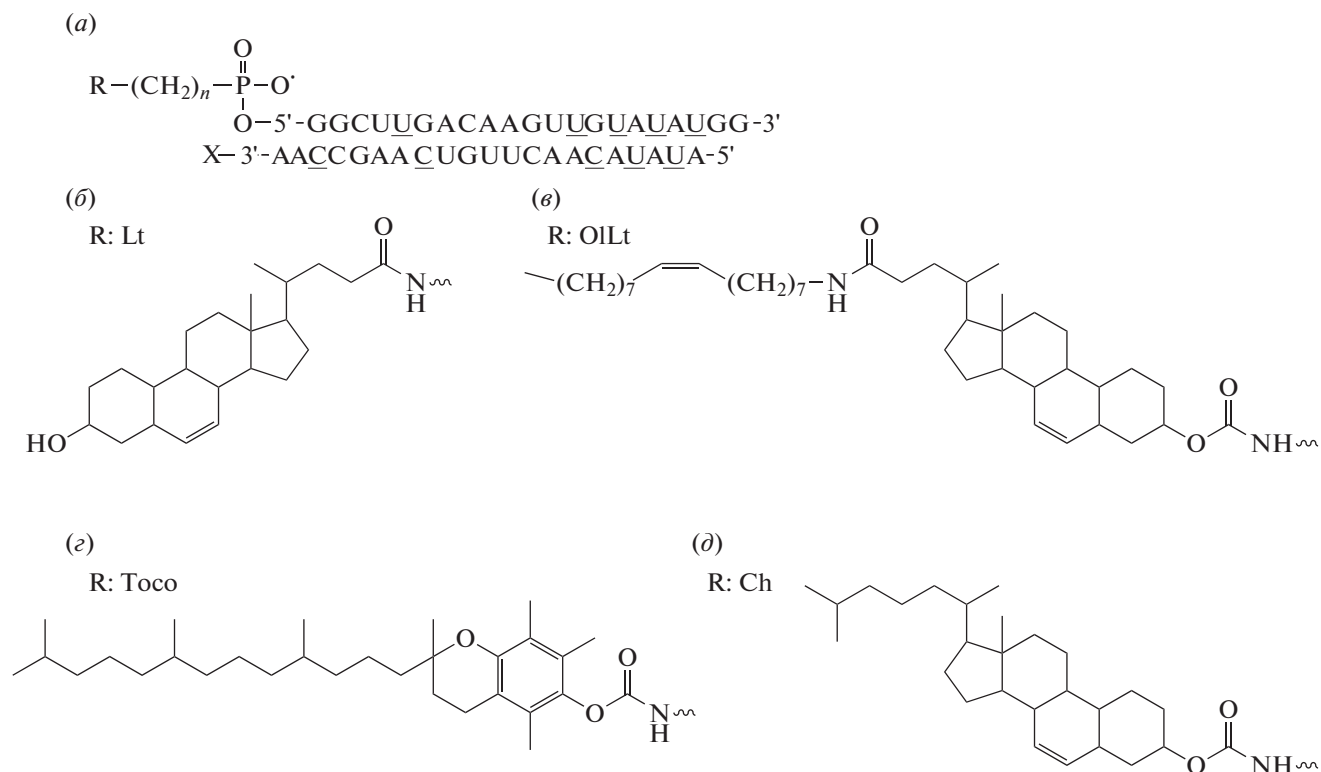


Рис. 1. (а) – Структура липофильных производных siРНК, где U и C – 2'-*O*-метильные аналоги U и C соответственно; R – остатки липофильных молекул, введенные с 5'-конца смысловой цепи; *n* (3, 6, 8, 10 или 12) – число метиленовых звеньев в алифатическом линкере, связывающем siРНК и липофильную молекулу; X – флуоресцеин (F) или Alexa Fluor-488; структуры остатков литохолоевой кислоты (Lt) (б), олеиламида литохолоевой кислоты (OILt) (в), α -токоферола (Тосо) (г) и холестерина (Ch) (д).

в клетках крови. Поскольку ранее мы показали, что длина линкера в составе холестеринового конъюгата siРНК является фактором, определяющим эффективность взаимодействия конъюгатов с культивируемыми линиями клеток [8–10], мы исследовали влияние длины линкера на накопление холестеринных конъюгатов siРНК в клетках крови и показали, что холестеринный конъюгат с оптимизированной длиной линкера эффективно накапливается в клетках крови *in vitro* и *in vivo*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Природа липофильной молекулы определяет эффективность накопления конъюгатов siРНК в гемопоэтических клетках человека. Ранее нами был разработан алгоритм селективной модификации siРНК, который включает в себя защиту нуклеазочувствительных сайтов (UpG, UpA и CpA) путем введения 2'-*O*-метильных аналогов рибонуклеотидов с 3'-стороны от легко расщепляемой связи [11]. Было показано, что siРНК, направленная на мРНК гена *MDR1* и содержащая 2'-*O*-метильные звенья в нуклеазочувствительных сайтах, способна эффективно ингибировать экспрессию данного гена в клетках человека KB-8-5 при транс-

фекции с помощью Липофектамина [12–14]. Для исследования влияния природы липофильной молекулы на эффективность накопления таких siРНК в гемопоэтических клетках человека siРНК конъюгировали с холестерином, α -токоферолом, литохолоевой кислотой и олеиламидом литохолоевой кислоты. Липофильные производные были присоединены к 5'-концу олигорибонуклеотида через олигометиленовые линкеры различной длины с использованием удобного твердофазного подхода, предложенного нами ранее [8] (рис. 1). Alexa Fluor-488- (А) или флуоресцеин-меченые (F) конъюгаты siРНК, содержащие липофильную молекулу, добавляли к выделенным первичным мононуклеарным клеткам крови (РВМС) человека (1–5 мкМ) и оценивали эффективность накопления конъюгатов методом проточной цитофлуориметрии.

Трансфекцию неконъюгированной siРНК проводили при помощи Липофектамина в концентрации 0.2 мкМ для того, чтобы сохранить рекомендуемое производителем соотношение количества Липофектамина и siРНК с целью эффективного образования комплексов, поскольку более высокая концентрация Липофектамина была бы токсич-

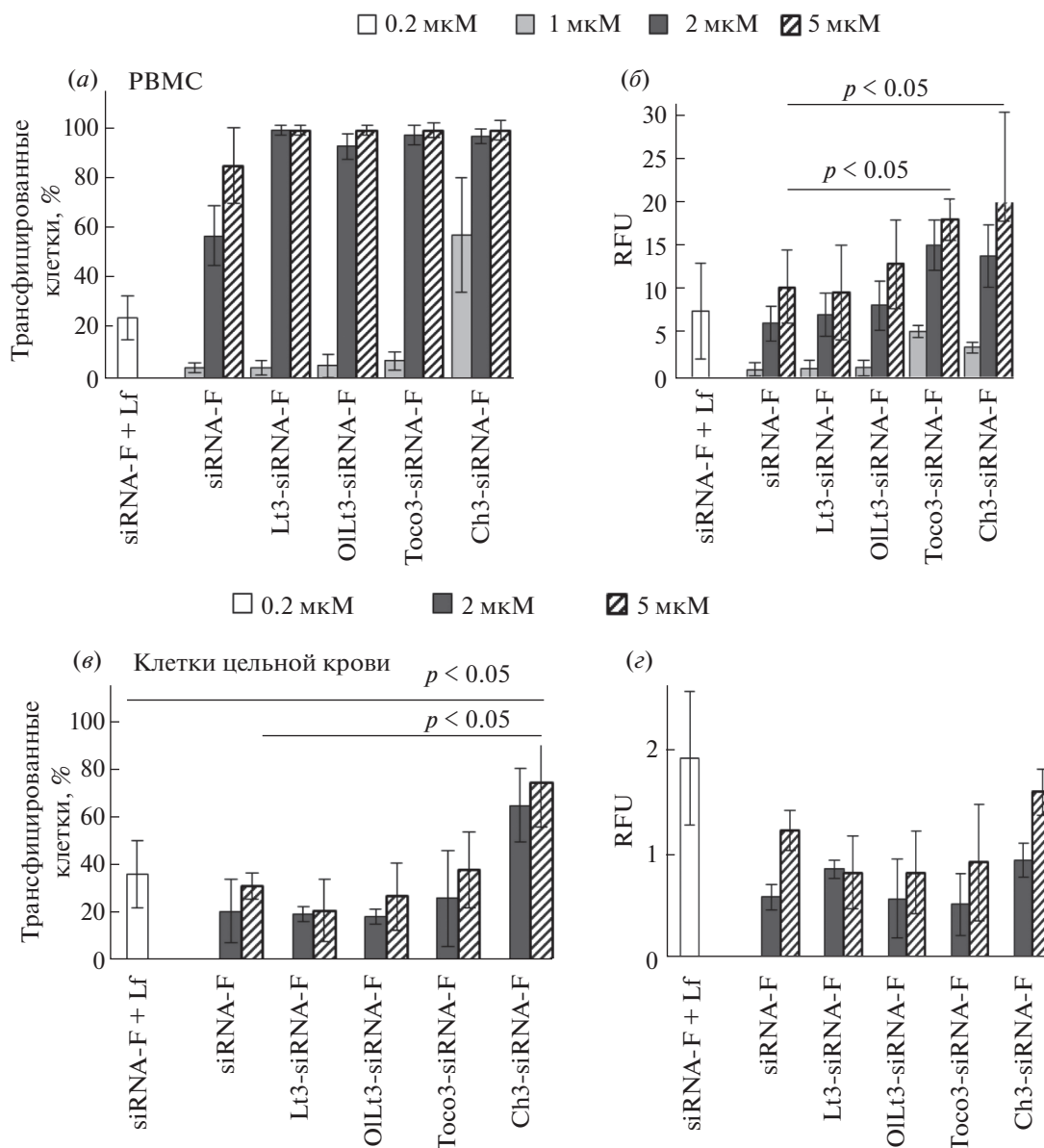


Рис. 2. Накопление флуоресцентно-меченых аналогов липофильных производных siРНК с линкером из трех метиленовых звеньев в РВМС (а, б) и клетках цельной крови человека (е, з). Приведены доля трансфицированных клеток (а, е) и средние значения флуоресценции популяции клеток (б, з). Представлены средние значения (\pm SD), рассчитанные по результатам трех независимых экспериментов, и статистическая значимость (p).

на для клеток. Время инкубации siРНК с клетками (4 ч) было выбрано исходя из ранее полученных нами данных [8, 15]. Показано, что доля клеток, трансфицированных липофильными конъюгатами siРНК в концентрации 2 и 5 мкМ, была выше как по сравнению с неконъюгированной siРНК в свободном виде, так и с siРНК, доставляемой при помощи Липофектамина (рис. 2а). При концентрации 1 мкМ наибольшая эффективность трансфекции была достигнута при использовании конъюгата siРНК и холестерина (58%) (рис. 2а), для остальных типов исследованных конъюгатов доля трансфицированных клеток варьировала от 5 до 7.5%. При

этом эффективность накопления липофильных производных siРНК в клетках РВМС, выраженная в относительных единицах флуоресценции (RFU), увеличивалась в зависимости от типа липофильной молекулы в ряду: литохоловая кислота < олеиламид литохоловой кислоты < токоферол < холестерин и при концентрации конъюгатов 5 мкМ составляла, соответственно, 10, 13, 18 и 24 RFU (рис. 2б).

Для того чтобы оценить влияние сыворотки и электролитов плазмы на накопление липофильных конъюгатов в клетках крови, проводили их

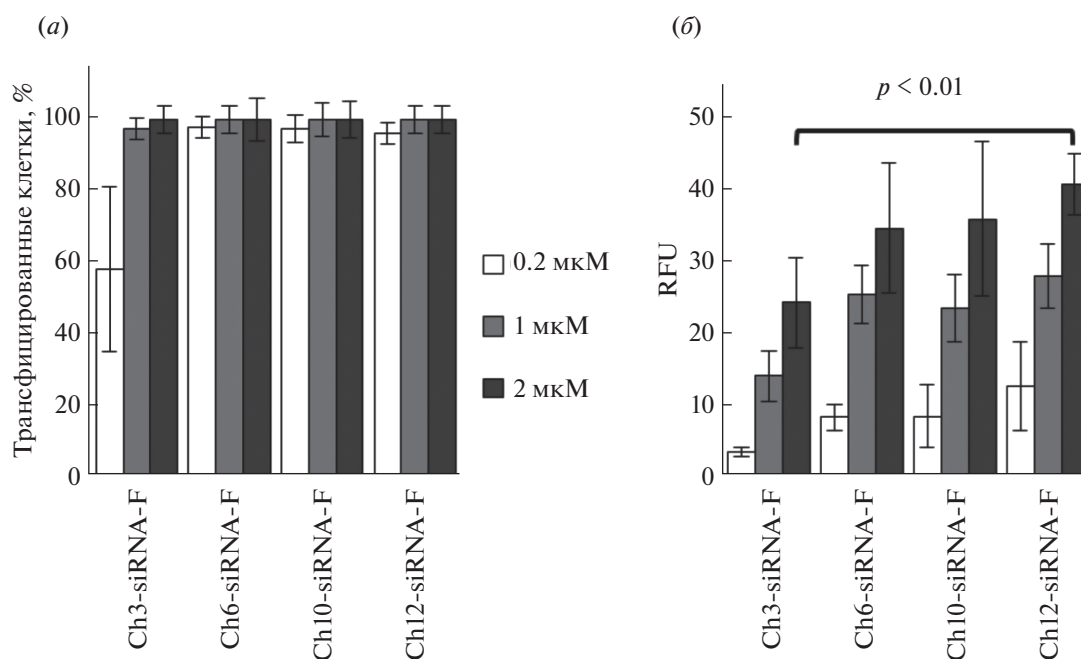


Рис. 3. Накопление флуоресцентно-меченых холестеринных производных siРНК, содержащих линкеры различной длины (3–12 метиленовых звеньев), в РВМС. Исследования проводили при помощи проточной цитофлуорометрии, в каждом образце анализировали 10000 клеток. Приведены средние значения (\pm SD), рассчитанные по результатам трех независимых экспериментов, и статистическая значимость (p).

инкубацию с цельной кровью человека в присутствии антикоагулянта. Показано, что эффективность накопления конъюгатов зависит от типа липофильной молекулы и также увеличивается в ряду: литохолевая кислота < олеиламид литохолевой кислоты < токоферол < холестерин, доля трансфицированных клеток при концентрации конъюгатов 5 мкМ составила 21, 27, 38 и 74% соответственно (рис. 2а). Оценка уровня средней интенсивности флуоресценции трансфицированных клеток показала, что данное значение для неконъюгированной siРНК, доставляемой при помощи Липофектамина, было выше, чем у клеток, инкубированных с конъюгатами (рис. 2б). Из полученных нами данных видно, что взаимодействие с клетками в составе цельной крови происходит менее эффективно, чем с теми же клетками, находящимися в культуральной среде, поэтому подбор оптимальных средств доставки для этого типа клеток-мишеней особенно важен.

Длина линкера в составе холестеринных производных siРНК влияет на их накопление в гемопоэтических клетках. Ранее нами было установлено, что структура линкера в составе холестеринных производных siРНК, в частности его длина, влияет на эффективность накопления конъюгатов в культивируемых клетках и, как следствие, определяет биологическую активность siРНК [8, 9]. Поэтому мы исследовали влияние данного фактора на эффективность накопления конъюгатов в

РВМС и клетках цельной крови человека. Для этого конъюгаты добавляли к клеткам до конечной концентрации 0.2–2.0 мкМ. В ходе работы нами показано, что все исследованные холестеринные конъюгаты эффективно накапливались в клетках: уже при концентрации 1 мкМ эффективность трансфекции достигала 100% (рис. 3а). При анализе среднего уровня интенсивности флуоресценции показано, что при удлинении линкера между siРНК и холестерином наблюдается плавное увеличение накопления холестеринных конъюгатов: эффективность накопления составляла 24, 35, 36 и 41 RFU для конъюгатов с линкером из 3, 6, 10 и 12 метиленовых звеньев соответственно. Однако статистически достоверными являются только отличия в эффективности накопления между конъюгатами, содержащими 3 и 12 метиленовых звеньев ($p < 0.01$ при сравнении Ch3-siRNA-F с Ch12-siRNA-F, рис. 3б).

Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными в нашей лаборатории ранее [8–10]. Липофильная природа холестерина позволяет предположить, что механизм проникновения холестеринных производных siРНК в клетки на первом этапе включает “заякоривание” конъюгатов в мембране [16], поэтому увеличение длины линкера может облегчать этот процесс за счет увеличения расстояния между отрицательно заряженной siРНК и остатком холестерина.

Для того чтобы оценить влияние сыворотки и электролитов плазмы на накопление холестеринových производных siРНК в клетках крови, проводили инкубацию конъюгатов с цельной кровью человека. Показано, что доля трансфицированных клеток после их инкубации в течение 4 ч с 5 мкМ холестерин-содержащими siРНК составила 70–80%, что превышает это значение для неконъюгированной siРНК (62%), а также превышает долю клеток, трансфицированных неконъюгированной siРНК при помощи Липофектамина (44%) (рис. 4а). Анализ средней интенсивности флуоресценции клеток показал, что накопление холестеринových конъюгатов зависит от длины линкера, соединяющего холестерин с siРНК (рис. 4б). При этом конъюгат с линкером из 8 метиленовых звеньев показал наиболее эффективное накопление в клетках крови, значение RFU составило 4.95, что превышает значение RFU для других исследованных производных siРНК (2.44–4.21 RFU). Неконъюгированная siРНК накапливалась с наименьшей эффективностью (1.86 RFU, это значение только в 5 раз выше уровня автофлуоресценции контрольных клеток).

Поскольку количество siРНК, доставленной в клетки при помощи Липофектамина, оцениваемое по средней интенсивности флуоресценции клеток, сопоставимо с количеством Ch8-siRNA-A, доставленной в клетки без помощи носителя (5.5 и 4.95 RFU соответственно), а доля трансфицированных клеток в случае Ch8-siRNA-A превышает таковое значение для siРНК, доставляемой Липофектамином (77 и 44% соответственно), возник вопрос о том, в каких типах клеток крови происходит наиболее эффективное накопление siРНК при доставке в составе конъюгата с холестерином или при помощи Липофектамина. Для разделения лейкоцитов крови на индивидуальные популяции клеток (лимфоциты, нейтрофилы, моноциты и макрофаги) использовали соответствующие антитела с флуоресцентными метками. Данные показали, что накопление siРНК для обоих способов доставки (Липофектамин или конъюгация с холестерином) уменьшается в ряду: моноциты и макрофаги > нейтрофилы > лимфоциты (рис. 4). Наиболее эффективное накопление во всех популяциях наблюдается при использовании холестеринových конъюгатов siРНК, при этом в нейтрофилах, моноцитах и макрофагах эффективнее всего накапливается Ch8-siRNA-A (рис. 4в–е), а в лимфоцитах – Ch6-siRNA-A (рис. 4ж, 4з). Наименьшая эффективность накопления siРНК во всех популяциях клеток наблюдается при использовании Липофектамина. Однако следует отметить, что siРНК, доставляемая при помощи Липофектамина, была использована в концентрации 0.2 мкМ из-за ограничений, накладываемых токсичностью трансфекционного агента. Доля трансфицированных клеток во всех популяциях по-

сле инкубации с неконъюгированной siРНК в свободном виде (5 мкМ) была выше, чем при ее доставке Липофектамином (0.2 мкМ) (рис. 4в, 4д, 4ж).

Таким образом, оптимальным способом доставки siРНК в моноциты, макрофаги и нейтрофилы является конъюгирование siРНК с холестерином при использовании линкера, содержащего 8 метиленовых звеньев, а для доставки в лимфоциты – линкера с 6 метиленовыми звеньями. Вероятно, в условиях цельной крови из-за наличия компонентов сыворотки конъюгаты с более длинными линкерами (10 и 12 метиленовых звеньев) за счет большей гидрофобности эффективнее взаимодействовали с компонентами сыворотки, а не с клетками крови. Нельзя исключить, что комплексы siРНК с Липофектамином, которые имеют положительный заряд и размеры 150–200 нм, могут захватываться клетками, обладающими фагоцитарной активностью, такими как нейтрофилы, моноциты и макрофаги, что обеспечивает их эффективное накопление именно в этих клетках (рис. 4в–е).

Присоединение холестерина к siРНК значительно изменяет динамику концентрации siРНК в крови мышей после внутривенного введения. Определение динамики изменения концентрации siРНК и ее холестеринового производного в крови здоровых животных проводили на мышах линии C57BL/6. Показано, что уже в первой экспериментальной точке – через 5 мин после введения – концентрация препаратов в крови животных значительно отличается: концентрация холестерин-содержащего конъюгата Ch6-siRNA на 3 порядка превышает концентрацию неконъюгированной siРНК. В течение первого часа после введения концентрация Ch6-siRNA падает примерно в 10 раз по сравнению с первой экспериментальной точкой (рис. 5) и примерно на 3 порядка уменьшается через 24 ч после введения. Следует отметить, что siРНК без холестерина значительно быстрее выводится из крови и циркулирует в ней в значительно меньших концентрациях, чем ее холестерин-содержащий аналог, хотя после 1 часа динамика изменения концентрации сильно замедляется, и далее концентрация препарата в крови снижается медленно. Такая динамика, вероятнее всего, является следствием того, что через 3 ч после инъекции концентрация siРНК подходит к порогу чувствительности метода Stem-loop ПЦР, поскольку нет оснований полагать, что siРНК несколько часов находится в плазме крови без изменения концентрации (рис. 5). Нельзя исключить и того, что равновесие между свободной и связанной с клетками siРНК вносит вклад в сохранение ее ненулевого уровня в плазме крови через 24 ч.

Значительная разница в скорости выведения препарата в первые минуты после введения, скорее всего, связана с тем, что молекулярный вес

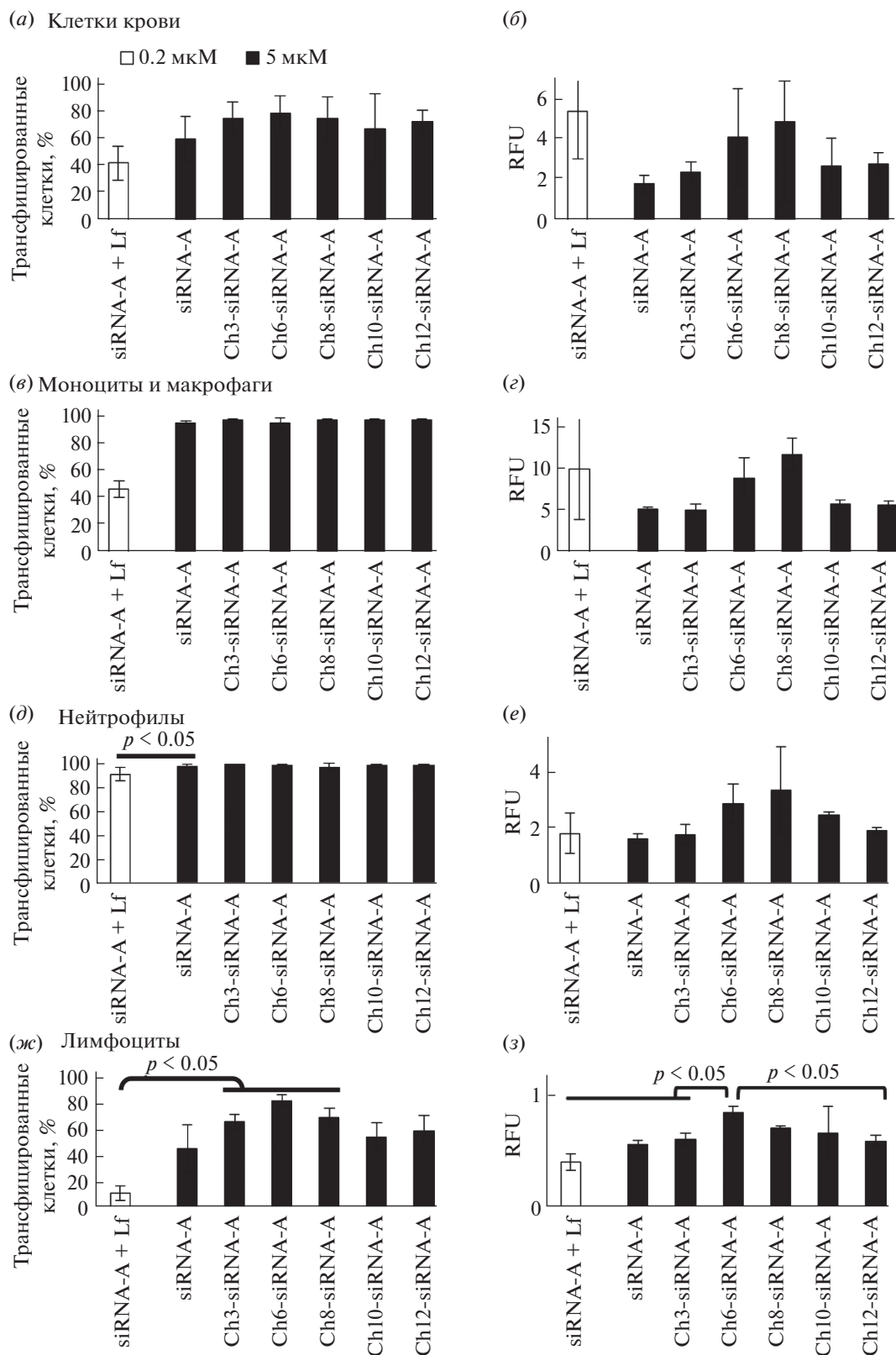


Рис. 4. Накопление Alexa Fluor-488-меченых холестериновых производных siРНК, содержащих линкеры различной длины (3–12 метиленовых звеньев), в клетках в составе цельной крови здорового донора. Приведены доля трансфицированных клеток (а, в, д, ж) и средняя интенсивность флуоресценции (RFU) (б, г, е, з) после инкубации цельной крови донора с соответствующими siРНК: всех клеток после лизиса эритроцитов (а, б), моноцитов и макрофагов (в, г), нейтрофилов (д, е) и лимфоцитов (ж, з). Исследования проводили при помощи проточной цитофлуорометрии, в каждом образце анализировали 10000 клеток. Средние значения (\pm SD) рассчитаны по результатам трех независимых экспериментов.

siРНК ниже критического лимита фильтрации соединений почками, и она быстро выводится из кровотока. В то же время было показано [17], что конъюгат асимметричной siРНК, содержащий чередующиеся 2'-O-Me- и 2'-F-модификации, фосфотиоатные звенья (PS) по концам дуплекса и холестерин с 3'-конца смысловой цепи, образуют в крови комплексы с липопротеинами, при этом молекулярная масса таких комплексов позволяет находящейся в них siРНК избежать выведения путем фильтрации. Можно предположить, что и в случае исследованного нами конъюгата увеличение времени его циркуляции в кровотоке происходит по сходному механизму.

Холестериновые производные siРНК накапливаются в клетках крови и в спленоцитах *in vivo*. Исследование накопления Alexa Fluor-488-меченых Ch6-siRNA-A и siRNA-A в клетках крови проводили на мышах линии C57BL/6 после внутривенной инъекции 1.7 или 9 мкг/г siРНК или ее холестеринного конъюгата. Через 30 мин, 1 и 4 ч после инъекции у мышей отбирали кровь из ретроорбитального синуса, индивидуальные популяции клеток окрашивали соответствующими антителами с флуоресцентными метками и лизировали эритроциты; эффективность накопления оценивали методом проточной цитофлуорометрии.

Показано, что присоединение холестерина к siРНК существенно увеличивает ее способность связываться с клетками крови (рис. 6а–з), при этом эффективность трансфекции моноцитов/макрофагов и нейтрофилов достигает 80–90% (рис. 6в, 6д). Уже через 30 мин после введения Ch6-siRNA-A клетки показывают значительный уровень флуоресценции, однако кинетика накопления для разных типов клеток отличается: максимальное накопление в нейтрофилах было зафиксировано через 30 мин после введения (94%, 1.4 RFU) и затем, через 4 ч, эффективность накопления и количество трансфицированных клеток постепенно снижались (75%, 0.9 RFU, рис. 6в, 6з). Уровень накопления Ch6-siRNA-A в моноцитах и макрофагах, напротив, увеличивался со временем: с 75 до 86% и с 1.6 до 3.2 RFU в период от 30 мин до 4 ч соответственно (рис. 6д, 6е). Интенсивность флуоресценции Ch6-siRNA-A в лимфоцитах была всего в 2 раза выше, чем в контрольных клетках (0.5 RFU, рис. 6ж, 6з). siРНК без холестерина накапливалась в незначительном количестве только в моноцитах и макрофагах (25%, 0.5 RFU, рис. 6в, 6з).

Учитывая общее количество крови мыши, доза 9 мкг/г Ch6-siRNA-A примерно соответствует концентрации 8.5 мкМ. При этом эффективность накопления в Ch6-siRNA-A в цельной крови человека при концентрации 5 мкМ в 4 раза больше (рис. 4), чем эффективность накопления Ch6-siRNA-A в клетках крови мыши при дозе 9 мкг/г (4.2 и 1.1 RFU соответственно). Различная эффектив-

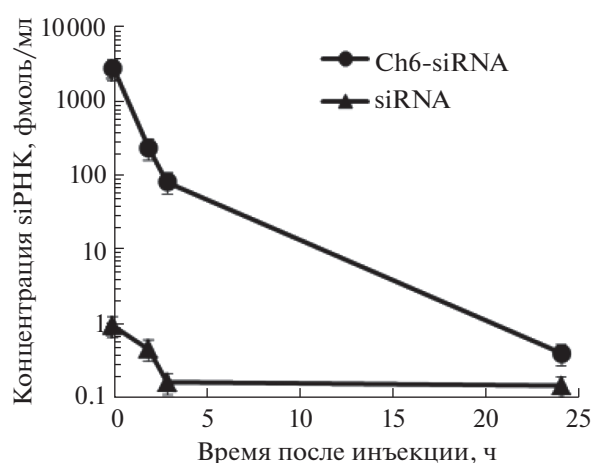


Рис. 5. Динамика изменения концентрации siРНК и ее конъюгата с холестерином, содержащего линкер из шести метиленовых звеньев (Ch6-siRNA), в плазме крови мышей C57BL/6 после внутривенной инъекции (0.5 мкг/г).

ность накопления Ch6-siRNA-A в клетках крови человека в пробирке и клетках крови мышей *in vivo* может объясняться меньшими размерами клеток крови мыши по сравнению с клетками крови человека, а также тем фактом, что *in vivo* Ch6-siRNA-A выводится из кровотока мыши путем фильтрации почками, элиминируется фагоцитарной системой животного (нейтрофилы, макрофаги и моноциты) или депонируется в различных органах и тканях (печень, селезенка и др.). В то же время в экспериментах на цельной крови человека концентрация конъюгата в процессе инкубации остается постоянной, что приводит к более высокой эффективности его накопления в клетках. Этот факт подчеркивает важность стабилизации препарата в кровотоке и обеспечения его достаточно высокой концентрации в течение длительного времени для эффективного накопления в клетках.

Моноциты и макрофаги обладают фагоцитарной активностью, за счет которой в них происходит постепенное накопление холестерин-содержащей siРНК, возможно, в составе комплексов с липопротеинами (рис. 6д, 6е). Снижение эффективности накопления Ch6-siRNA-A в нейтрофилах происходит, вероятно, из-за их миграции из кровотока в органы и ткани животного [18] и постепенного снижения концентрации Ch6-siRNA в крови (рис. 5).

Изучение накопления холестерин-содержащей siРНК в костном мозге и спленоцитах мыши проводили через 6 ч после внутривенной инъекции методом проточной цитофлуорометрии. Показано, что присоединение холестерина существенно не улучшает эффективность проникновения siРНК в клетки костного мозга (рис. 7а,

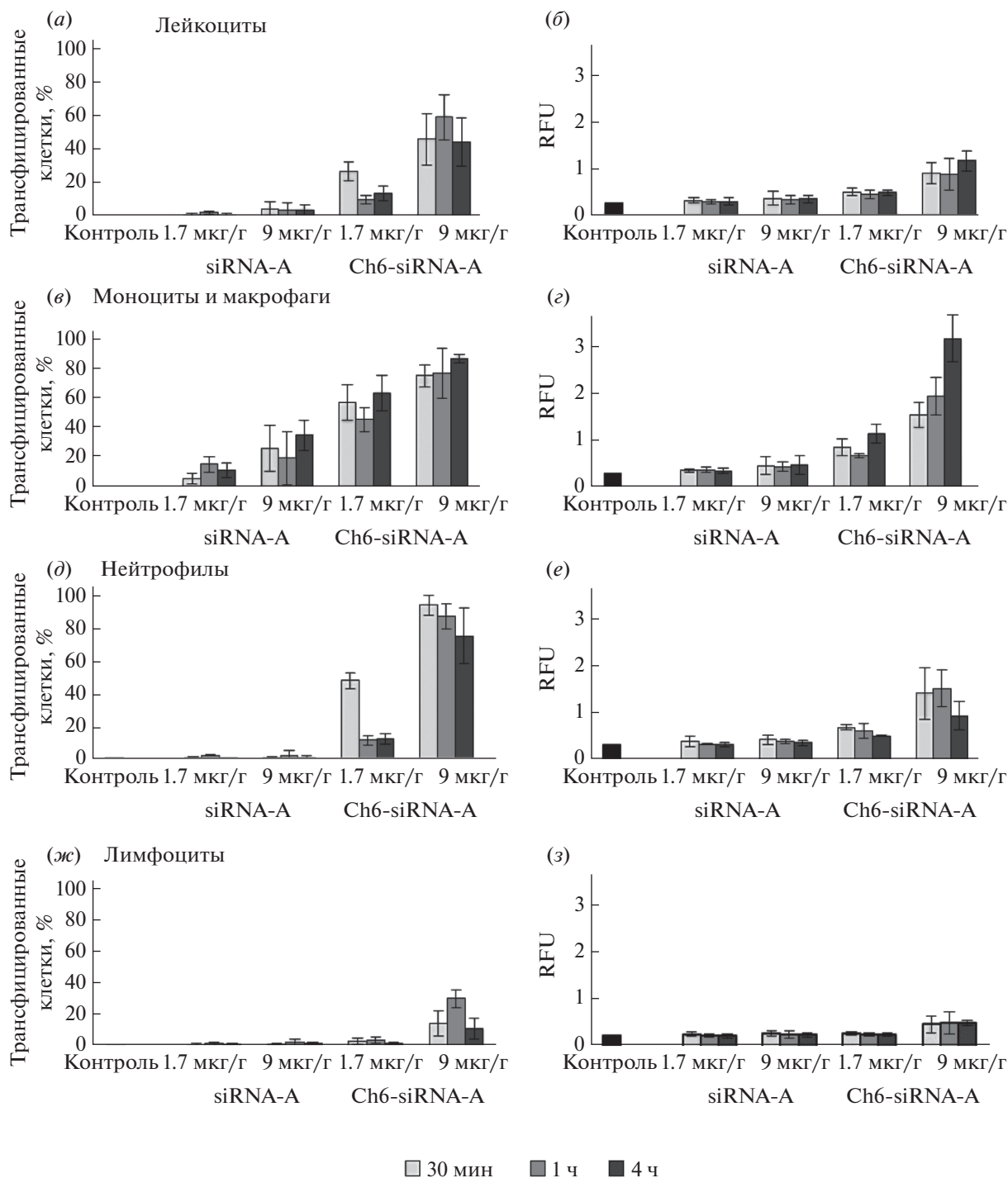


Рис. 6. Накопление флуоресцентно-меченой siРНК и ее конъюгата с холестерином в клетках крови мыши после внутривенного введения. Приведены доля Alexa Fluor-488-позитивных клеток (%) (а, в, д, ж) и интенсивность флуоресценции популяции клеток в RFU (б, г, е, з): в суммарной фракции лейкоцитов (а, б), моноцитов и макрофагов (в, г), нейтрофилах (д, е), лимфоцитах (ж, з) через 30 мин, 1 и 4 ч после внутривенной инъекции 1.7 или 9 мкг/г siRNA и Ch6-siRNA-A. Средние значения (\pm SD) рассчитаны по результатам трех независимых экспериментов, в качестве контроля использована автофлуоресценция необработанных клеток.

7б), однако способствует увеличению накопления Ch6-siRNA-A в спленocyтах мыши по сравнению с siRNA-A, при этом эффективность трансфекции составляет 70 и 2%, а интенсивность флуоресцен-

ции – 1.65 и 0.45 RFU для Ch6-siRNA-A и siRNA-A соответственно (рис. 7в, 7г). Следует отметить, что увеличение накопления Ch6-siRNA-A в селезенке может быть следствием не только способно-

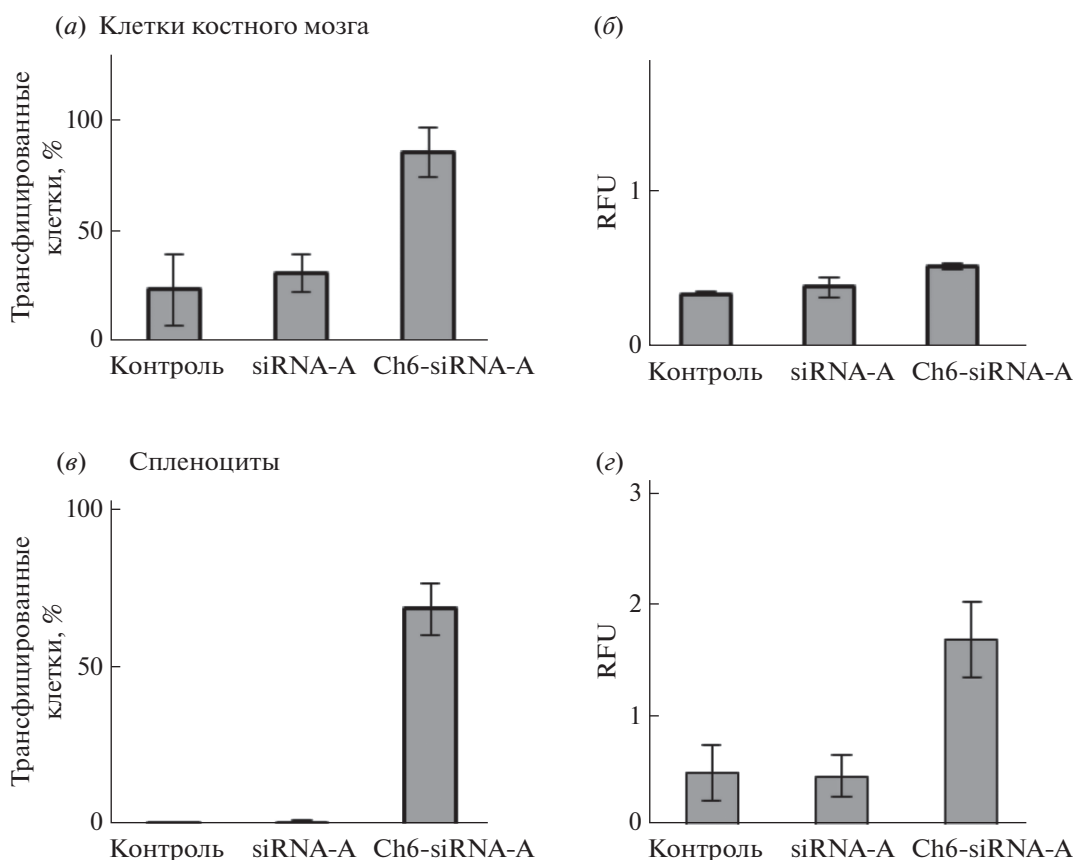


Рис. 7. Накопление флуоресцентно-меченой siРНК и ее конъюгата с холестерином в клетках костного мозга (а, б) и спленocyтaх (в, г) мыши через 6 ч после внутривенной инъекции (9 мкг/г). Приведены доля Alexa Fluor-488-позитивных клеток (%) (а, в) и интенсивность флуоресценции популяции клеток в RFU (б, г). Средние значения (\pm SD) рассчитаны по результатам трех независимых экспериментов, в качестве контроля использована автофлуоресценция необработанных клеток.

сти Ch6-siRNA-A накапливаться в спленocyтaх, но и результатом присутствия клеток крови в селезенке (нейтрофилов, моноцитов и макрофагов).

Применение препаратов на основе siРНК при гемобластозах является особенно актуальной проблемой из-за невозможности хирургического удаления данного вида опухоли. Для доставки siРНК в гемопоэтические клетки в экспериментальных условиях в основном используют катионные липиды и полимеры, которые не обеспечивают достаточную эффективность *in vivo* и зачастую проявляют токсическое действие [6].

Способность холестерина [19], α -токоферола [20], аптамеров [21], антител [22] и пептидов, способных проникать в клетку [23, 24], изменять биодоступность и биораспределение siРНК была продемонстрирована в ряде работ; тем не менее эффективность биологического действия конъюгатов разного строения в разных типах клеток существенно различается, поэтому оптимизация состава и структуры этих конъюгатов является одной из наиболее актуальных задач при конструировании ингибиторов на основе siРНК. К насто-

ящему времени довольно подробно исследовано взаимодействие siРНК и их модифицированных аналогов с культивируемыми клеточными линиями различного происхождения, имеются данные о накоплении siРНК в органах и тканях животных при внутривенном введении свободной нуклеиновой кислоты или ее комплексов с различными носителями (см., например, обзор Khatri et al. [25]), однако взаимодействию siРНК и других терапевтических нуклеиновых кислот с клетками крови до сих пор не уделялось должного внимания. В качестве альтернативного способа доставки группой исследователей Nechaev et al. было предложено конъюгировать субстрат Дайсера (DsiРНК) с CpG-содержащим олигодезоксирибонуклеотидом, обеспечивающим выход DsiРНК из эндосом в цитоплазму клетки [26]. Конъюгирование с CpG-содержащими олигодезоксирибонуклеотидами приводит к повышению накопления DsiРНК в клетках, экспрессирующих рецептор TLR9, который специфически распознает и связывает данный CpG-мотив, при этом в других типах клеток наблюдается лишь небольшое неспецифическое

накопление такого конъюгата [26]. Таким образом, из-за повышенной экспрессии рецептора TLR9 конъюгат DsiРНК и CpG эффективно накапливается в таких клетках крови, как В-лимфоциты, дендритные клетки и макрофаги [27]. Однако, в отличие от холестерина-содержащей siРНК, введение CpG-олигонуклеотидов *in vivo* приводит к активации систем врожденного иммунитета и продукции цитокинов и интерферонов, поэтому их применение ограничено.

Ранее мы показали, что Ch6-siRNA способна эффективно подавлять экспрессию гена-мишени и восстанавливать чувствительность опухолевых клеток к цитостатикам [8], однако механизм накопления Ch6-siRNA в гемопоэтических клетках значительно отличается от накопления в клетках карциномы [15], поэтому, несмотря на то что Ch6-siRNA эффективно накапливается в клетках крови, она не обеспечивает терапевтически значимого биологического действия при исследуемых концентрациях, поэтому дальнейшие разработки, направленные на увеличение эффективности накопления и биологической активности Ch6-siRNA в клетках крови, являются важным направлением исследований.

Таким образом, в данной работе показано, что природа липофильной молекулы и длина линкера в составе липофильных производных siРНК определяют эффективность накопления конъюгатов siРНК в гемопоэтических клетках человека. Наиболее эффективным способом доставки siРНК в моноциты, макрофаги и нейтрофилы является ее доставка в виде конъюгата с холестерином, присоединенного к 5'-концу смысловой цепи при помощи линкера из 8 метиленовых звеньев; для доставки siРНК в лимфоциты оптимальным является аналогичный конъюгат с линкером из 6 метиленовых звеньев. Следует отметить, что присоединение холестерина к siРНК значительно изменяет динамику концентрации siРНК в крови мышей после внутривенного введения, увеличивая время ее циркуляции и замедляя выведение, что является важным для обеспечения эффективного накопления siРНК в клетках и тканях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение siРНК и конъюгатов. Смысловые и антисмысловые цепи siРНК были синтезированы фосфитамидным методом на автоматическом синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Россия). Для синтеза антисмысловых цепей siРНК, содержащих 3'-аминогексильный линкер (амиолинкер С6), использовали 3'-PT-amino-modifier С6 CPG (GlenResearch, США). Введение липофильных остатков на 5'-конец проводили Н-фосфонатным методом, используя полимер-связанный олигонуклеотид и Н-фосфонаты липофильных соединений [8]. Выделение и характеризацию продуктов

проводили с использованием ПААГ-электрофореза и масс-спектрометрии (LC-ESI-MS и MALDI-TOF-MS).

Присоединение флуоресцеина на 3'-конец антисмысловой цепи проводили в реакционной смеси объемом 150 мкл по аналогии с работой Proudnikov et al. [28]. К 30 мкл 0.9 мМ водного раствора антисмысловой цепи siРНК с амиолинкером С6 на 3'-конец добавляли 7.5 мкл триэтиламина, 97.5 мкл свежеперегнанного ДМСО и 15 мкл свежеприготовленного 0.3 М FITC I (Sigma-Aldrich, США) в ДМСО, после чего смесь инкубировали при комнатной температуре 1 ч при непрерывном перемешивании. По окончании реакции продукт осаждали добавлением к реакционной смеси 1/10 объема NaOAc (3 М), 4 объемов этанола (96%) и инкубировали при -20°C в течение ночи.

Конъюгирование с Alexa Fluor-488 проводили в реакционной смеси объемом 250 мкл. К 45 мкл водного раствора антисмысловой цепи siРНК с амиолинкером С6 на 3'-конец в концентрации 0.5 мМ добавляли 165 мкл тетрабората натрия (рН 8.5) и 40 мкл свежеприготовленного 10 мМ сульфодихлорфенилового эфира Alexa Fluor-488 (Sigma-Aldrich, США) в ДМСО, после чего смесь инкубировали при комнатной температуре 3 ч при непрерывном перемешивании. По окончании реакции продукт осаждали добавлением 1/10 объема 3 М NaOAc, 4 объемов этанола (96%) и инкубировали при -20°C в течение ночи.

Дуплексы siРНК получали эквимольным добавлением цепей siРНК (200 мкМ) в раствор, содержащий 30 мМ HEPES-КОН (рН 7.4), 100 мМ ацетат натрия и 2 мМ ацетат магния, и хранили при -20°C .

Выделение моноцитарно-лимфоцитарной фракции из периферической крови человека (РВМС). Периферическую кровь здорового донора с антикоагулянтom разбавляли стерильным PBS (MP Biomedicals, США) в 4 раза. Разведенную кровь (5 мл) наслаивали на 2 мл среды для разделения лейкоцитов LSM (MP Biomedicals, США) с плотностью 1.077–1.080 г/мл и центрифугировали в течение 15 мин при 800 g. Белое кольцо лейкоцитов собирали пипеткой и переносили в чистую пробирку. Лейкоциты промывали 2 раза, для этого добавляли 5 мл среды IMDM (Sigma-Aldrich, США) без сыворотки и антибиотиков, ресуспендировали, центрифугировали 10 мин при 800 g, отбিরали супернатант и повторяли процедуру. Клетки высевали на чашки Петри и культивировали в среде IMDM с 10% FBS (HyClone, США), пенициллином (10 ед./мл), стрептомицином (100 мкг/мкл) и амфотерицином (0.25 мкг/мкл) (5% CO_2 , 37°C).

Образцы периферической крови здоровых доноров ($n = 3$) были предоставлены лабораторией генной диагностики Центра новых медицинских технологий (Новосибирск, Россия).

Определение эффективности накопления холестерина производных siРНК в РВМС с помощью проточной цитофлуориметрии. РВМС высевали на 48-луночные планшеты (3×10^5 клеток/луноку) в ростовой среде IMDM и добавляли к ним холестерин производные siРНК в Opti-Mem (Invitrogen, США) до конечной концентрации в лунке 0.2–5.0 мкМ, трансфекцию siРНК при помощи Липофектамина (Invitrogen, США) проводили в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Через 4 ч готовили препараты для анализа методом проточной цитофлуориметрии.

Для приготовления препаратов удаляли ростовую среду и дважды промывали клетки раствором PBS, после чего клетки снимали трипсином и переносили в 1.5-мл пробирки. После этого клетки осаждали центрифугированием при 200 g в течение 5 мин, удаляли супернатант и суспендировали осадок в PBS. Суспензию клеток вновь центрифугировали в течение 5 мин при 200 g, супернатант удаляли, суспендировали клетки в 250 мкл PBS и фиксировали клетки добавлением 250 мкл свежеприготовленного 4%-ного раствора формальдегида в PBS. Полученные данные анализировали на проточном цитофлуориметре, используя программное обеспечение Cytomics FC 500 CXP (Beckman Coulter, США). Интенсивность флуоресценции клеток в RFU (относительные единицы флуоресценции) измеряли на длине волны возбуждения лазера 488 нм. Для каждого препарата проводили измерение 8000 клеток, количество Alexa Fluor-488-положительных клеток оценивали с использованием длинноволнового оптического фильтра (530 ± 30) нм. За эффективность трансфекции принимали количество клеток (%), уровень флуоресценции которых превышал максимальный уровень автофлуоресценции клеток в контроле. Кроме того, оценивали средний уровень флуоресценции (в RFU) популяции клеток в образцах, трансфицированных siРНК, в качестве контроля использовали необработанные клетки.

Определение эффективности накопления холестерин производных siРНК в клетках крови с помощью проточной цитофлуориметрии *ex vivo*. К периферической крови человека с антикоагулянтом добавляли флуоресцентно-меченые конъюгаты siРНК до конечной концентрации в лунке 2–5 мкМ. Трансфекцию неконъюгированной siРНК проводили при помощи Липофектамина в концентрации 0.2 мкМ в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Через 3.5 ч после начала трансфекции к клеткам добавляли конъюгаты антител и флуоресцентных красителей для идентификации различных популяций клеток (CD14-Phycoerythrin (Invitrogen, США), CD66-Phycoerythrin/Cy5, CD3-Phycoerythrin и CD19-Phycoerythrin (Abcam, США)). По истечении времени трансфекции (4 ч) эритроциты лизировали добавлением 40 объемов свежеприготовленного раствора

150 мМ NH_4Cl , 10 мМ NaHCO_3 , 0.1 мМ ЭДТА (pH 7.5) в течение 7 мин, затем клетки центрифугировали (5 мин, 200 g), отмывали PBS и фиксировали 2%-ным раствором формальдегида в PBS. Далее проводили анализ флуоресценции на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 CXP с использованием каналов флуоресценции (530 ± 30), (572 ± 30) или (675 ± 30) нм.

Определение динамики изменения концентрации siРНК и ее холестерин-содержащих аналогов в плазме мышей после внутривенного введения. В работе использовали 10–14-недельных самок мышей линии C57BL/6 ($n = 9$, по 3 мыши в каждой экспериментальной группе) разведения вивария Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Животных содержали по 8–10 особей в клетке, мыши имели свободный доступ к еде и воде. После введения 0.5 мкг/г siРНК или ее холестерин производного в объеме 100 мкл в хвостовую вену мышей проводили забор крови из ретроорбитального синуса через 5 мин, 2, 3 и 24 ч. Кровь центрифугировали (5 мин при 500 g), образцы плазмы разбавляли в 10 раз раствором для лизиса клеток (137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na_2HPO_4 , 1.8 мМ, KH_2PO_4 , pH 7.4, 0.25% Triton X-100). Далее проводили выделение siРНК, для этого раствор нагревали до 95°C в течение 10 мин. Затем образцы охлаждали на льду (10 мин) и центрифугировали (10 мин, 4°C , 12000 g). Отобранный супернатант нагревали до 95°C (10 мин) и сразу добавляли в готовую смесь БиоМастер для ОТ-ПЦР (Биолабмикс, Россия) из расчета 2 мкл супернатанта на 38 мкл смеси Биомастер с использованием праймера 5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG-TATTCGCACCAGAGCCAACCTTGGCT-3'. Реакционную смесь инкубировали в течение 1 ч при температуре 42°C . Полученную кДНК использовали для проведения ПЦР в режиме реального времени при помощи амплификатора iCycler iQ5 (BioRad, США), используя готовую смесь HS-qPCR SYBR Blue (Биолабмикс, Россия) и праймеры 5'-GTTGGGGATATACAACCTTGTCA-3' (прямой) и 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' (обратный). Нормирование проводили путем построения калибровочных кривых с использованием известного количества siРНК (10, 1 и 0.1 пмоль), добавляемых к такому же количеству плазмы, как в пробах. Данные анализировали с помощью программного обеспечения Bio-Rad iQ5 v.2.0 (Bio-Rad, США).

Исследование накопления siРНК и ее холестерин-содержащих аналогов в клетках крови мышей. Мышам линии C57BL/6 внутривенно вводили 1.7 и 9 мкг/г флуоресцентно-меченой siРНК; через 0.5, 1 и 4 ч после инъекции у мышей отбирали кровь из ретроорбитального синуса. Популяции клеток окрашивали соответствующими антителами с флуоресцентными метками (CD11b-Phycoeryth-

rin/Cy5 (Invitrogen, США), CD20-Phycoerythrin/Cy5 и CD3-Phycoerythrin (Abcam, США) в течение 20 мин. Затем проводили лизирование эритроцитов, как описано выше, и анализ флуоресценции клеток на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 СХР.

Накопление siРНК и ее холестерин-содержащих аналогов в костном мозге и спленоцитах мышей. Мышам линии С57BL/6 проводили внутривенные инъекции 9 мкг/г siРНК или ее конъюгата с холестерином. Через 6 ч после этого животных подвергали эвтаназии путем дислокации шейных позвонков и проводили выделение костного мозга и спленоцитов. Для этого извлекали бедренные и большие берцовые кости. Концы костей удаляли, диафизы дважды промывали 3 мл буфера PBS. Клетки суспендировали, лизирование эритроцитов осуществляли, как описано выше, после этого готовили препараты и анализировали на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 СХР. Для получения спленоцитов извлекали селезенку и гомогенизировали ее раздавливанием между стеклами. Гомогенат смывали со стекла 3–4 мл буфера PBS. Лизирование эритроцитов в клеточной суспензии осуществляли, как описано выше, после этого готовили препараты и анализировали на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 СХР.

Статистический анализ данных. Для получения статистически достоверных результатов экспериментальные точки повторяли минимум трехкратно, результаты измерений представляли в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (SD), для оценки достоверности результатов использовали критерий Стьюдента.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-04-00251) и проекта базового бюджетного финансирования Программой фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы № АААА-А17-117020210024-8.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на животных выполнены в соответствии с протоколом, утвержденным Межинститутской комиссией по биоэтике СО РАН (протокол № 22.11 от 30.05.2014), и рекомендациями по правильному использованию и уходу за лабораторными животными (European Communities Council Directive 86/609/CEE).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Setten R.L., Rossi J.J., Han S.-P.* // Nat. Rev. Drug Discov. 2019. V. 18. P. 421–446. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0017-4>
2. *Chernikov I.V., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L.* // Front. Pharmacol. 2019. V. 10. P. 1–25. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00444>
3. *Kolosenko I., Edsbäcker E., Björklund A.-C., Hamil A.S., Goroshchuk O., Grandér D., Dowdy S.F., Palm-Apergi C.* // J. Control. Release. 2017. V. 261. P. 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.07.002>
4. *Benizri S., Gissot A., Martin A., Valet B., Grinstaff M.W., Barthélémy P.* // Bioconj. Chem. 2019. V. 30. P. 366–383. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00761>
5. *Shinkai Y., Kashihara S., Minematsu G., Fujii H., Nae-mura M., Kotake Y., Morita Y., Ohnuki K., Fokina A.A., Stetsenko D.A., Filichev V.V., Fujii M.* // Nucleic Acid Ther. 2017. V. 27. P. 168–175. <https://doi.org/10.1089/nat.2016.0647>
6. *Landry B., Valencia-Serna J., Gul-Uludag H., Jiang X., Janowska-Wieczorek A., Brandwein J., Uludag H.* // Mol. Ther. Nucleic Acids. 2015. V. 4. P. e240. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.13>
7. *Wang Y.H., Motoji T., Motomura S., Shiozaki H., Tsuruo T., Mizoguchi H.* // Eur. J. Haematol. 1997. V. 58. P. 186–194. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1997.tb00946.x>
8. *Petrova N.S., Chernikov I.V., Meschaninova M.I., Dovydenko I.S., Venyaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L.* // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40. P. 2330–2344. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1002>
9. *Chernikov I.V., Meschaninova M.I., Venyaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L.* // J. Hematol. Oncol. Res. 2016. V. 2. P. 13. <https://doi.org/10.14302/issn.2372-6601.jhor-15-822>
10. *Chernikov I.V., Gladkikh D.V., Meschaninova M.I., Karelina U.A., Ven'yaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L.* // Nucleic Acid Ther. 2019. V. 29. P. 33–43. <https://doi.org/10.1089/nat.2018.0745>
11. *Volkov A.A., Kruglova N.S., Meschaninova M.I., Venyaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L.* // Oligonucleotides. 2009. V. 19. P. 191–202. <https://doi.org/10.1089/oli.2008.0162>
12. *Logashenko E.B., Chernolovskaya E.L., Vladimirova A.V., Repkova M.N., Ven'yaminova A.G., Vlasov V.V.* // Dokl. Biochem. Biophys. 2002. V. 386. P. 296–297. <https://doi.org/10.1023/a:1020732216541>
13. *Logashenko E.B., Vladimirova A.V., Repkova M.N., Venyaminova A.G., Chernolovskaya E.L., Vlassov V.V.* // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2004. V. 23. P. 861–866. <https://doi.org/10.1081/NCN-200026032>
14. *Logashenko E.B., Vladimirova A.V., Volkov A.A., Repkova M.N., Ven'yaminova A.G., Zenkova M.A., Chernolovskaya E.L., Vlassov V.V.* // Russ. Chem. Bull. 2006. V. 55. P. 1275–1283. <https://doi.org/10.1007/s11172-006-0411-z>

15. Chernikov I.V., Karelina U.A., Meschaninova M.I., Ven'yaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 766–773.
<https://doi.org/10.1134/S1068162019060128>
16. Ly S., Navaroli D.M., Didiot M.-C., Cardia J., Pandarinnathan L., Alterman J.F., Fogarty K., Standley C., Lifshitz L.M., Bellve K.D., Prot M., Echeverria D., Corvera S., Khvorova A. // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. P. 15–25.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw1005>
17. Osborn M.F., Coles A.H., Biscans A., Haraszti R.A., Roux L., Davis S., Ly S., Echeverria D., Hassler M.R., Godinho B.M.D., Nikan M., Khvorova A. // *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47. P. 1070–1081.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1232>
18. Agrawal N., Toner M., Irimia D. // *Lab. Chip.* 2008. V. 8. P. 2054–2061.
<https://doi.org/10.1039/B813588F>
19. Soutschek J., Akinc A., Bramlage B., Charisse K., Costien R., Donoghue M., Elbashir S., Geick A., Hadwiger P., Harborth J., John M., Kesavan V., Lavine G., Pandey R.K., Racie T., Rajeev K.G., Röhl I., Toudjarska L., Wang G., Wuschko S., Bumcrot D., Koteliansky V., Limmer S., Manoharan M., Vornlocher H.-P. // *Nature.* 2004. V. 432. P. 173–178.
<https://doi.org/10.1038/nature03121>
20. Nishina K., Unno T., Uno Y., Kubodera T., Kanouchi T., Mizusawa H., Yokota T. // *Mol. Ther.* 2008. V. 16. P. 734–740.
<https://doi.org/10.1038/mt.2008.14>
21. McNamara J.O., Andrechek E.R., Wang Y., Viles K.D., Rempel R.E., Gilboa E., Sullenger B.A., Giangrande P.H. // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. P. 1005–1015.
<https://doi.org/10.1038/nbt1223>
22. Xia C.-F., Boado R.J., Pardridge W.M. // *Mol. Pharm.* 2009. V. 6. P. 747–751.
<https://doi.org/10.1021/mp800194y>
23. Moschos S.A., Jones S.W., Perry M.M., Williams A.E., Erjefalt J.S., Turner J.J., Barnes P.J., Sproat B.S., Gait M.J., Lindsay M.A. // *Bioconjug. Chem.* 2007. V. 18. P. 1450–1459.
<https://doi.org/10.1021/bc070077d>
24. Nakase I., Tanaka G., Futaki S. // *Mol. Biosyst.* 2013. V. 9. P. 855–861.
<https://doi.org/10.1039/c2mb25467k>
25. Khatri N., Rathi M., Baradia D., Trehan S., Misra A. // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 2012. V. 29. P. 487–527.
<https://doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v29.i6.20>
26. Nechaev S., Gao C., Moreira D., Swiderski P., Jozwiak A., Kowolik C.M., Zhou J., Armstrong B., Raubitschek A., Rossi J.J., Kortylewski M. // *J. Control. Release.* 2013. V. 170. P. 307–315.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.06.007>
27. Zhang Q., Hossain D.M.S., Nechaev S., Kozłowska A., Zhang W., Liu Y., Kowolik C.M., Swiderski P., Rossi J.J., Forman S., Pal S., Bhatia R., Raubitschek A., Yu H., Kortylewski M. // *Blood.* 2013. V. 121. P. 1304–1315.
<https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-442590>
28. Proudnikov D., Mirzabekov A. // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. P. 4535–4542.
<https://doi.org/10.1093/nar/24.22.4535>

Interaction of Lipophilic Conjugates of Modified siRNAs with Hematopoietic Cells *in vitro* and *in vivo*

I. V. Chernikov*, M. I. Meshchaninova*, D. V. Gladkikh*,
A. G. Ven'yaminova*, M. A. Zenkova*, V. V. Vlassov*, and E. L. Chernolovskaya*, #

#E-mail: elena_ch@niboch.nsc.ru

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS,
prosp. Akad. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

Delivery of siRNAs to blood cells is one of the most difficult tasks, since there are no efficient and non-toxic methods of delivering nucleic acids to these cells *in vivo*. Conjugation of siRNAs with targeted or lipophilic transport molecules is one of the most promising approaches to solving this problem, since it can provide efficient accumulation without toxic side effects. Therefore, in this work, we conjugated siRNA with lipophilic molecules for its delivery to PBMC (primary blood mononuclear cells) and whole blood cells. We have shown that among the studied molecules, cholesterol is the most promising agent for this purpose. Further screening of conjugates along the length of the linker connecting siRNA and cholesterol showed that a linker containing 6 carbon atoms is optimal for the most efficient delivery of siRNA into human cells as part of whole blood. The selected cholesterol conjugate siRNA was also efficiently accumulated in mouse blood cells and splenocytes after intravenous injection.

Keywords: siRNA, chemical modifications, cholesterol, lipophilic conjugates, hematopoietic cells, delivery to cells