

Феномен РНК-интерференции в онкологии: достижения, проблемы и перспективы

О.Е. Андреева, М.А. Красильников

Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Михаил Александрович Красильников krasilnikovm1@yandex.ru

Обзор посвящен РНК-интерференции — сравнительно недавно открытому биологическому механизму негативной регуляции экспрессии генов. В основе этого механизма лежит блок трансляции и/или деградация информационной матричной РНК под действием малых некодирующих РНК, наиболее известными представителями которых являются микроРНК и короткие интерферирующие РНК. В обзоре рассмотрены молекулярные процессы образования малых РНК, механизм действия и возможность их использования в качестве противоопухолевых терапевтических препаратов. Особое внимание отведено проблеме доставки малых РНК *in vivo*, в том числе с помощью липосом и экзосом, и перспективам использования таких препаратов в клинической практике.

Ключевые слова: РНК-интерференция, злокачественная опухоль, микроРНК, короткие интерферирующие РНК, РНК-доставка, липосома, экзосома

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-08—15

The phenomenon of RNA interference in oncology: advances, problems and perspectives

O.E. Andreeva, M.A. Krasil'nikov

Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

Review describes the phenomenon of RNA interference — the recently discovered biological mechanism of the negative regulation of gene expression. The mechanism is based on the block of the translation and/or degradation of messenger RNA under short non-coding RNA, among them: microRNA and small interfering RNA. The paper reviews the molecular processes of the formation of small RNA, the mechanism of their action and the feasibility of small RNA implementation in the anti-tumor therapy. Specially, we analyze the approaches to *in vivo* delivery of small RNA, in particular — the liposome and exosome constructs, and perspectives of the involvement of such constructs in the cancer treatment.

Key words: RNA interference, malignant tumor, microRNA, small interfering RNA, RNA delivery, liposome, exosome

РНК-интерференция: общие представления

РНК-интерференция — естественный биологический процесс подавления экспрессии определенных генов, в основе которого лежит блок трансляции и/или деградация информационной матричной РНК (мРНК) под действием так называемых малых некодирующих РНК. Явление РНК-интерференции было впервые описано А. Fire и С.С. Mello, получившими впоследствии за это открытие Нобелевскую премию [1]. Авторы на примере *Caenorhabditis elegans* продемонстрировали способность коротких двуцепочечных РНК вызывать подавление экспрессии гомологичных генов. В дальнейших исследованиях установлен и хорошо изучен механизм этого явления, основанного на процессинге малых РНК с образованием коротких 21–23-нуклеотидных двуцепочечных РНК и последующим их связыванием с гомологичными участками мРНК [2, 3].

В семействе малых некодирующих РНК выделяют несколько групп, к основным из которых относят микроРНК (miРНК) и короткие интерферирующие РНК

(siРНК). Оба вида обладают сходной структурой и являются ингибиторами экспрессии генов, основные различия между ними заключаются в механизме образования и степени гомологии к таргетным мРНК [4]. Предшественниками miРНК считаются первичные (primary) miРНК (pri-miРНК) эндогенного происхождения, транскрибируемые с соответствующих генов, кодирующих miРНК [5]. Pri-miРНК под действием внутриядерного ферментативного комплекса Drosha расщепляются до 70–100-нуклеотидных фрагментов (pre-miРНК), которые транспортируются в цитоплазму и подвергаются дальнейшему процессингу в ферментативной системе Dicer до образования miРНК [6]. Зрелые miРНК представляют собой 21–23-нуклеотидные последовательности, которые не полностью комплементарны таргетным мРНК и благодаря этому способны инактивировать одновременно несколько различных мРНК [7]. В отличие от miРНК к предшественникам siРНК относятся короткие двуцепочечные РНК (dsРНК) как эндогенного, так и эк-

зогенного (вирусного) происхождения, причем siРНК обладают полной комплементарностью к таргетным мРНК и, соответственно, являются высокоспецифическими ингибиторами синтеза белка.

Процессинг pre-miРНК и dsРНК с образованием соответственно miРНК и siРНК регулируется одной и той же ферментативной системой, включающей рибонуклеазный комплекс Dicer [8, 9]. Затем зрелые miРНК и siРНК связываются РНК-индуцируемым блокирующим комплексом RISC (RNA-Induced Silencing Complex), в котором переходят в одноцепочечное состояние с последующей деградацией одной из цепей, тогда как вторая цепь в комплексе с эндонуклеазой Argonaute 2, входящей в состав RISC, взаимодействует с комплементарными участками информационной мРНК, приводя к деградации последней и/или блоку трансляции (см. рисунок) [10].

Малые РНК и направленная регуляция экспрессии генов

В 2001 г. впервые были описаны эффекты трансфекции малых РНК в эукариотические клетки [4]. Дальнейшие исследования по таргетной доставке наночастиц, несущих siРНК в человеческие клетки путем

систематических инъекций, послужили мощным толчком для развития новых подходов с применением РНК-интерференции в клинической практике [11].

Пристальное внимание к РНК-интерференции, как к перспективному инструменту направленного воздействия на экспрессию генов, объясняется следующими факторами:

- специфичность действия;
- незначительные побочные эффекты;
- легкость синтеза препаратов РНК.

Правильно подобранные последовательности РНК могут избирательно ингибировать экспрессию генов, связанных с теми или иными нарушениями, такими как гиперэкспрессия онкогенов или мутации онкосупрессоров [12]. В настоящее время более 20 препаратов на основе малых РНК находятся на стадии клинических испытаний [12, 13].

Широкое использование РНК-препаратов в клинической практике ограничивается рядом факторов.

В физиологических условиях РНК нестабильна. Эффективное действие miРНК/siРНК предполагает их доставку к опухоли через кровеносное русло, однако при внутривенном введении молекулы деградируют

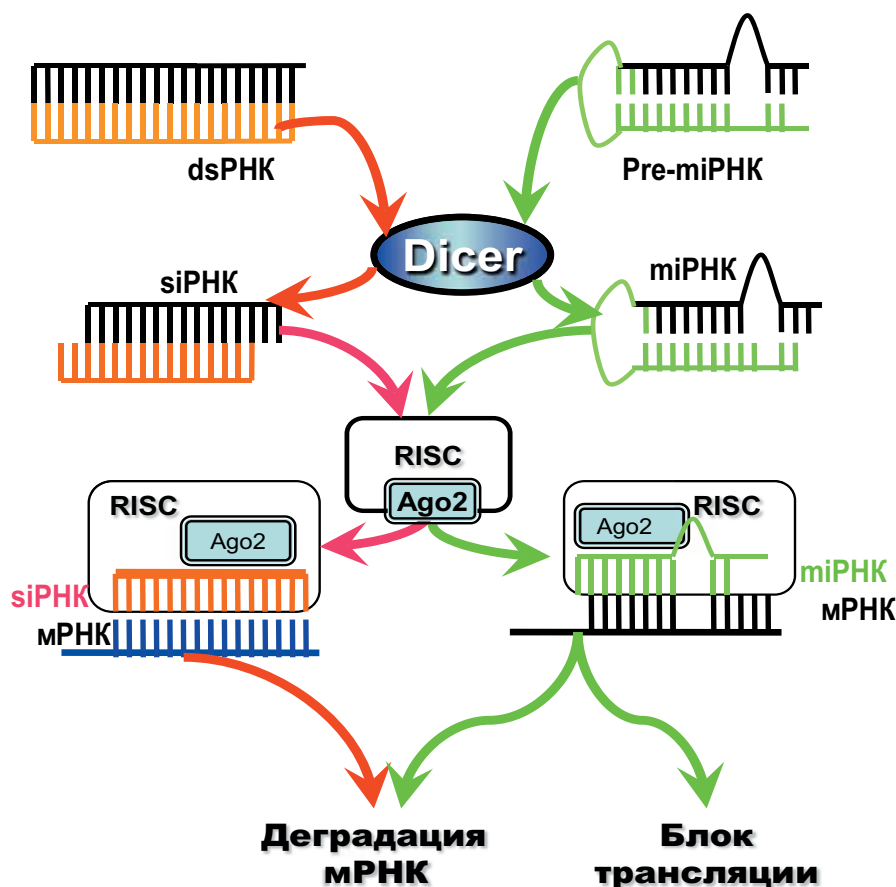


Схема образования в клетках siРНК и miРНК. Предшественники малых РНК, dsРНК и pre-miРНК, поступают в рибонуклеазный комплекс Dicer, в котором подвергаются процессингу с образованием коротких двуцепочечных РНК, siРНК и miРНК соответственно. Зрелые siРНК и miРНК связываются РНК-индуцируемым блокирующим комплексом RISC, в котором переходят в одноцепочечное состояние с последующей деградацией одной из цепей. Другая цепь в комплексе с эндонуклеазой Argonaute 2 взаимодействует с комплементарными участками информационной мРНК, приводя к деградации последней и/или блоку трансляции

под действием сывороточных нуклеаз, экскретируются почками, поглощаются фагоцитами и агрегируют с белками сыворотки [14]. Нуклеазная активность в сыворотке крови и тканях является, по сути, первым барьером при доставке малых РНК. Основная нуклеаза плазмы — 3'-экзонуклеаза, однако разрывы межнуклеотидных связей могут происходить не только на 3'-конце, но и в середине молекулы РНК. Период полураспада miРНК/siРНК в кровеносном русле составляет от нескольких минут до 1 ч [15].

Также необходимо отметить роль почек в выведении РНК из организма: *in vivo* продемонстрировано преимущественное поглощение РНК именно почками [16]. Дополнительный барьер для доставки miРНК/siРНК *in vivo* — поглощение ретикулоэндотитальной системой, в первую очередь фагоцитирующими клетками, в том числе циркулирующими моноцитами и тканевыми макрофагами [17], основными физиологическими функциями которых являются очистка от инородных патогенов, удаление клеточного дебриса и утилизация апоптотических клеток [18]. Наибольшее количество тканевых макрофагов представлено в печени (купферовские клетки) и селезенке — органах с высоким уровнем васкуляризации, пропускающих через себя большой объем крови [19].

Попадая в клетки-мишени, РНК, находящиеся в свободном состоянии, быстро деградируют. Они накапливаются в ранних эндосомах, последовательно сливающихся с сортировочными эндосомами, содержимое которых, в свою очередь, направляется в поздние эндосомы [20]. При этом уровень pH эндосомального компартмента значительно снижен (pH 5,0–6,2) по сравнению с нейтральным pH (pH 7,4) цитозольного компартмента и межклеточного пространства [21]. Затем эндосомы направляются в лизосомы, в которых их содержимое еще сильнее окисляется (pH 4,5) и деградирует после связывания нуклеазами [22].

Свободная двуцепочечная РНК обладает гидрофильными и анионными свойствами и в свободном виде не может проникнуть в клетку. Для пересечения мембраны необходима упаковка РНК, связывание ее с каким-либо носителем [23].

Несмотря на эти ограничения, терапевтический потенциал малых РНК велик, однако на пути успешного применения препаратов miРНК/siРНК в клинической практике стоит проблема их специфической доставки в опухолевые клетки.

Доставка малых РНК в опухолевые клетки: химическая модификация и искусственные носители

Для системного введения РНК *in vivo* необходимо обеспечить [14]:

- стабильность в сыворотке крови;
- неиммуногенность;
- незначительность связывания белками плазмы и нетрансформированными клетками;
- возможность избежать фильтрации почками;

- проникновение к клеткам опухоли через стенки сосудов;
- попадание в клетку и освобождение из эндосом;
- отсутствие токсичности.

Модификации РНК. Модификации молекул miРНК/siРНК, позволяющие защитить их от действия нуклеаз, увеличивают их физиологическую стабильность [24]. К таким модификациям относятся группы 2-О-метил и 2-диоокси-2-флюоро, а также тиофосфатные линкеры [10, 25]. Несмотря на способность таких модификаций повышать стабильность miРНК/siРНК и увеличивать иммунологическую толерантность, этого оказывается недостаточно для обеспечения свободного прохождения РНК через отрицательно заряженную плазматическую мембрану [26].

Упаковка РНК в наноконтейнеры из катионных полимеров позволяет решить проблему заряда для транспортировки РНК через клеточную мембрану, однако основным ограничением их использования является иммуногенность полимеров [27]. Основной путь выведения наночастиц из крови происходит посредством адсорбции на них иммунореактивных белков (опсонизации) и последующего поглощения системой мононуклеарных фагоцитов [19]. Стратегия снижения связывания наночастиц белками плазмы заключается в использовании разветвленных полимеров полиэтиленгликоля, покрывающих поверхность наноконтейнера с РНК [21]. Полиэтиленгликоль значительно увеличивает продолжительность их циркуляции в крови, защищая от взаимодействия с клетками иммунной системы и белками плазмы.

In vivo малые РНК выводятся через печень, селезенку и легкие, однако основной путь их экскреции связан с почками [28]. Размер поры гломерул, через которые происходит фильтрация, составляет около 8 нм. Молекулы меньше 50 kDa, в том числе miРНК и siРНК массой 13 kDa, проходят в канал и экскретируются с мочой [19]. Синтетические материалы, связывающие РНК и образующие наночастицы большего диаметра, используют для защиты РНК от гломерулярной фильтрации в почках, повышая биодоступность для целевых органов [29]. Многие разработанные системы основаны на применении частиц размером более 20 нм [16].

Синтетические наноконтейнеры, липосомы, трехблочные полимеры. В последнее время активно разрабатываются системы, в которых носителями miРНК и siРНК являются везикулы, мицеллы, липосомы и неорганические гибридные частицы [30–32]. Основанием для разработки таких систем считается эффект повышенной проницаемости и накопления: наночастицы размером от десятков до сотен нанометров накапливаются преимущественно в опухолевых, а не в нормальных тканях благодаря аномальной структуре кровеносных сосудов, возникающих *de novo* при неоваскуляризации [33].

Липосомы — синтетические частицы с липидной мембраной, которые могут поглощать как гидрофобные, так и гидрофильные молекулы [34]. РНК в составе

липосом попадает в клетку путем эндоцитоза, поэтому для повышения избирательности липосом используют включение в их состав таргетных лигандов [35, 36]. Связываясь с рецепторами, экспонированными на мембранах таргетных клеток, такие частицы поглощаются по механизму рецептор-опосредованного эндоцитоза [25]. Однако адсорбция белков плазмы на поверхности этих частиц может препятствовать связыванию лиганда и рецептора [37]. В других системах используются пептиды, проникающие через мембрану (cell penetrating peptides) [38], благодаря которым наночастицы могут проникать в клетку не только по механизму эндоцитоза, но и независимым от него образом [39]. Некоторые системы используют чувствительные к pH материалы, меняющие конформацию при снижении уровня pH и обеспечивающие таким образом высвобождение РНК из эндосом [40].

В синтетических липосомах присутствуют, как правило, гидрофобные молекулы, которые образуют внутреннюю стенку мицеллы, и гидрофильные молекулы, формирующие оболочку [31]. Гидрофильные участки содержат катионы и связывают отрицательно заряженные молекулы ДНК и РНК [40].

Полимеры для производства липосом организованы по блочному принципу. Примером могут служить трехблочные полимеры типа ABC, которые содержат:

- гидрофильный блок (полиэтиленгликоль);
- гидрофобное ядро: поли(капролактон), поли(n-бутил акрилат) и др.;
- катионный блок: поли(2-аминоэтилэтиленфосфат) и полиэтиленимин (PEI) [41].

Наноконтейнеры имеют тенденцию накапливаться в печени, легких, селезенке и почках, что, помимо неизбежных токсических эффектов, существенно ограничивает их использование в других тканях [14].

Доставка малых РНК в опухолевые клетки: экзосомы

Общие представления об экзосомах. Клетки эукариот являются источниками мембранных везикул — окруженных мембраной фрагментов цитоплазмы, секретируемых во внеклеточное пространство. Везикулы могут формироваться в эндолизосомальном компартменте или на плазматической мембране клетки. Среди различных видов секретируемых мембранных везикул выделяются экзосомы — везикулы диаметром 40–100 нм, которые покидают клетку при слиянии внутриклеточных мультивезикулярных комплексов (эндосом) с плазматической мембраной клетки. Экзосомы играют особую роль в межклеточной коммуникации, позволяя осуществлять горизонтальную передачу от клетки к клетке не только мембранных компонентов, но и цитоплазматического содержимого, в том числе белков и нуклеиновых кислот. Экзосомы в большом количестве присутствуют в крови, моче и других биологических жидкостях и вовлечены в различные физиологические и патологические процессы, что позволяет использовать их в качестве биомаркеров для диагностики некоторых заболеваний.

Все экзосомы вне зависимости от вида родительских клеток содержат белки, связанные с мембранным транспортом и реорганизацией мембраны (Rab GTPases, аннексины, флотиллин), белки, участвующие в биогенезе мультивезикулярных телец (Alix и TSG101), белки теплового шока (hsp70 и 90), интегрины и тетраспанины (CD9, CD63, CD81 и CD82) [39]. Некоторые из этих белков специфичны для экзосом и могут использоваться в качестве экзосомальных маркеров (например, Alix, флотиллин, TSG101, CD63). Еще одна особенность экзосом — высокое содержание липидов, характерных для липидных рафтов (холестерин, сфинголипиды, керамиды и гликофосфолипиды).

Почти все типы клеток могут секретировать экзосомы, и большинство работ, опубликованных за последнее время, указывает на их исключительную роль как в поддержании нормальных физиологических реакций, так и в патогенезе.

Интересным свойством экзосом с точки зрения генной терапии является их способность осуществлять горизонтальный перенос генетического материала. В 2006 г. было показано, что везикулы эмбриональных стволовых клеток содержат мРНК плюрипотентных белков, участвующих в созревании предшественников гематопоэтических клеток (HSPCs) [42]. Затем в микровезикулах, секретируемых опухолевыми клетками, были обнаружены опухолевые маркеры и мРНК, которые *in vitro* могут передаваться моноцитам [43]. В других работах описана способность микровезикул, секретируемых клетками-предшественниками эндотелиоцитов, активировать ангиогенные программы в эндотелиоцитах посредством селективного переноса мРНК [44]. Отмечено, что экзосомы, продуцируемые клетками глиобластомы, также осуществляют перенос мРНК, которые меняют синтез белка *de novo* в реципиентных клетках [45]. В работе Н. Valadi и соавт. впервые было показано, что в микровезикулах и экзосомах содержится не только мРНК, но и miРНК [46]. Получены свидетельства участия экзосом в переносе функциональных miРНК, причем донорами экзосом могут быть различные типы клеток, в том числе эмбриональные стволовые клетки [47]. Продемонстрирована способность экзосом доставлять miРНК к мезенхимальным стволовым клеткам и стволовым клеткам печени [48], а также к Т-лимфоцитам, причем последние участвуют в однонаправленном переносе miРНК к антигенпрезентирующим клеткам посредством секреции экзосом [49].

В целом имеющиеся на сегодняшний день данные свидетельствуют о возможности использования микровезикул и экзосом — основных межклеточных переносчиков РНК естественного происхождения — в качестве эффективных средств доставки в клетки противоопухолевых агентов — как генно-инженерных конструкций, так и химиопрепаратов.

Структурные особенности экзосом опухолевых клеток. Структура и состав экзосом могут сильно варьировать в зависимости от вида клеток-продуцентов,

и в этом плане опухолевые клетки не являются исключением. Так, в работе [50] исследованы различия в адгезии и поглощении экзосом, продуцируемых опухолевыми клетками (линии PC3, MCF-7, MDA-MB-231, SK-Mel-5, H460) и immortalized нетрансформированными клетками (16HBE, WPMY-1, ARPE-19). Анализ связывания экзосом с клетками родительских линий и другими, в том числе immortalized, показал, что опухолевые клетки в целом гораздо активнее поглощают экзосомы. При этом нельзя достоверно утверждать, что они поглощают «свои» экзосомы, полученные от той же клеточной линии, с большей специфичностью, чем экзосомы от других источников, поскольку увеличивается и неспецифическое поглощение экзосом по причине активного эндоцитоза. Анализ физических свойств экзосом, полученных из культуральной среды линий PC3, MCF-7 и MDA-MB-231, не выявил различий, следовательно, различная эффективность их поглощения клетками может определяться биологическими свойствами липидных и/или белковых компонентов экзосом.

Мембрана экзосом обогащена холестерином, сфингомиелином и анионными фосфолипидами, в том числе фосфатидилсерин, что придает экзосомам прочность и стабилизирует их структуру. Помимо липидного состава к важным компонентам для связывания с поверхностью клетки относятся белки экзосом, основными представителями которых являются белки адгезии, тетраспанины, белки ICAM (intercellular adhesion molecule).

Адгезивные белки, особенно интегрины, содержатся в экзосомах в большом количестве и служат рецепторами клеточной адгезии. Представители другой группы белков, тетраспанины, предположительно отвечают за выбор целевых клеток и взаимодействие с ними [51]. Белки ICAM также способствуют связыванию экзосом с поверхностью реципиентных клеток [52]. Необходимо отметить, что опухолевые клетки гораздо активнее поглощают экзосомы, чем синтетические липосомы или липосомы, сформированные из экзосомных липидов [27], что указывает на важность белков экзосом для реализации их биологической активности.

Экзосомы как средства доставки малых РНК. Ключевая проблема в использовании экзосом для доставки РНК — загрузка РНК-препаратов в экзосомы. Для этого применяются несколько подходов, в том числе электропорация, химическая трансфекция и химическая модификация экзосом.

Электропорация. При использовании электропорации эффективность упаковки РНК в экзосомы не зависит от последовательности РНК, и, собственно, эффективность трансфекции определяется правильным выбором параметров, условий и оборудования. Основной проблемой данного подхода является неправильная оценка эффективности фактической загрузки РНК в экзосомы, вызванная денатурацией РНК. Так, в ра-

боте [53] показано, что электропорация приводит к агрегации siРНК, поэтому эффективность загрузки siРНК, определяемая измерением флуоресценции, неадекватна и заметно завышена (фактическое содержание siРНК в экзосомах не превышало 0,05 %).

Химическая трансфекция. Для загрузки РНК в экзосомы используют также липидные трансфекционные реагенты, такие как Hiperfekt и Lipofectamin 2000. Существенное ограничение этого метода — невозможность полного отделения от экзосом несвязавшегося трансфекционного комплекса РНК, что значительно затрудняет интерпретацию получаемых данных, во всяком случае при экспериментальных исследованиях [54].

Химическая модификация экзосом. Основной подход подразумевает предварительную трансфекцию донорских клеток векторными конструкциями в целях обогащения экзосом соответствующим белком [55]. Впервые возможность использования модифицированных экзосом для таргетной доставки siРНК продемонстрирована в экспериментах на дендритных клетках [56, 57]. Незрелые дендритные клетки были трансфицированы плазмидой для экспрессии химерного белка экзосом Lamp2b, слитого с RVG (rabies viral glycoprotein) — пептидом, специфично экспрессирующимся в мозге. Экзосомы, несущие RVG, были получены из культур таких клеток и загружены siРНК GAPDH с помощью электропорации. Доставка целевых RVG-экзосом *in vivo* путем инъекции в хвостовую вену привела к значительному подавлению GAPDH в нескольких областях мозга у мышей [58].

В других исследованиях экзосомы применяли для системной доставки экзогенных miРНК [59]. Так, трансфекция моноцитов miРНК-150 приводила к усилению продукции экзосом, обогащенных miРНК-150, которые использовали для доставки последней в реципиентные клетки [59]. Аналогичный подход был применен для обогащения экзосом miРНК-143 [60]. Успешные эксперименты были проведены по доставке с помощью модифицированных экзосом siРНК и dsРНК [61].

Экзосомы и малые РНК: перспективы клинического применения

На сегодняшний день исследования экзосом в качестве средств доставки РНК находятся преимущественно на стадии экспериментальных разработок, но работы в этом направлении ведутся чрезвычайно активно. В первую очередь, это поиск оптимального варианта экзосом, содержимое которых было бы достаточно нейтральным и не провоцировало рост опухоли [62, 63]. С этой точки зрения среди потенциальных кандидатов на роль доноров экзосом следует отметить immortalized мезенхимальные стволовые клетки, которые потенциально могут быть использованы в качестве средств доставки РНК [64].

Для повышения специфичности экзосом разрабатываются конструкции, содержащие fusion-белки, в которых сигнальные пептиды или антитела к опухо-

левым антигенам фиксированы с поверхностными белками экзосом [51]. Отдельный интерес представляет использование экзосом в качестве носителей не только siРНК, но и других типов малых РНК, в том числе miРНК [65], ингибиторов miРНК [66], плазмид для экспрессии shРНК [55]. Среди успешно разработанных экспериментальных систем доставки малых РНК с помощью экзосом можно отметить эффективную доставку siРНК MAPK1 в моноциты и лимфоциты [67], siРНК RAD-51 (белок из семейства ферментов репарации) [68], c-Мyc [69], TGF- β 1 [70], PLK-1 (polo-like kinase 1) [71], а также доставку некоторых miРНК и/или их ингибиторов [72, 73]. Работы в этом направлении ведутся, и можно рассчитывать, что в ближайшее время они перейдут в фазу клинических исследований.

Заключение

Малые РНК miРНК и siРНК, являясь по природе высокоспецифичными ингибиторами синтеза белков, нашли широкое применение в экспериментальных исследованиях, в первую очередь как инструмент, позволяющий избирательно блокировать синтез определенных молекул и тем самым оценить их вклад в те или иные внутриклеточные процессы. На этом же основании и применение малых РНК в клинической практике как таргетных препаратов, направленных на подавление экспрессии определенных белков, ассоциированных с развитием данного заболевания.

Несмотря на большой потенциал использования miРНК и siРНК в терапевтических целях, лишь несколько препаратов проходят клинические испытания. Основные причины этого — низкая стабильность малых РНК в организме и отсутствие специфических средств доставки РНК к клеткам-мишеням. Средства доставки, которые используются сегодня, в том числе описанные выше наночастицы и липосомы, отличаются высокой токсичностью, слабой избирательностью и низкой эффективностью при проникновении в клетки. Именно из-за этого активно разрабатываются препараты siРНК наружного применения, главным образом для лечения заболеваний глаз и кожных болезней, при которых вопросы специфической доставки частично снимаются [74]. Что касается терапии онкологических заболеваний (гепатоцеллюлярной карциномы, множественной миеломы, неходжкинской лимфомы, меланомы и некоторых других), то в настоящее время проходят клинические испытания несколько препаратов на основе siРНК [75]. Одно из новых направлений —

комбинация siРНК с miРНК. Если siРНК высокоизбирательны в отношении подавления синтеза определенного белка, то miРНК обычно регулируют экспрессию целого набора генов, включая нужный белок. Поэтому комбинация этих 2 видов РНК, как ожидается, может существенно усилить эффективность действия препарата.

Безусловно, основной прогресс в разработке препаратов miРНК и siРНК можно ожидать только при существенном совершенствовании средств доставки. С этой точки зрения наибольший интерес исследователей привлекают экзосомы как естественные средства доставки, постоянно циркулирующие в крови и свободно проникающие в клетки-мишени. К основным преимуществам экзосом относятся длительное сохранение в неповрежденном виде содержимого экзосом, способность легко инкорпорировать внутрь клеток-реципиентов, низкие иммуногенность и токсичность. Главный недостаток экзосом — отсутствие избирательности доставки, и сегодня усилия исследователей направлены именно на разработку модифицированных экзосом, несущих на своей мембране белки, узнающие клетки-мишени [75].

В заключение следует отметить, что, несмотря на специфичность действия малых РНК и их способность избирательно блокировать активность отдельных генов белков, нельзя ожидать, что такие препараты будут абсолютно эффективны в лечении онкологических заболеваний, даже если они будут успешно блокировать экспрессию ключевых онкобелков. Причина этого — быстро развивающаяся резистентность опухолей к препаратам, обусловленная реаранжировкой внутриклеточных сигнальных путей и стимуляцией тех из них, которые идут в обход заблокированных белков. Один из подходов к увеличению эффективности таргетных соединений — использование комбинации препаратов с разнонаправленным действием, блокирующих одновременно несколько сигнальных путей в клетке. Дальнейшие исследования малых РНК и разработка современных средств доставки должны привести к созданию новых противоопухолевых препаратов, которые будут отличаться большей эффективностью и продолжительностью действия.

Работа поддержана Российским научным фондом, проект № 14-15-00362 (раздел исследований экзосом) и Российским фондом фундаментальных исследований, проект № 16-04-00347.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Fire A., Xu S., Montgomery M.K. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391(6669):806–11.
2. Hammond S.M., Bernstein E., Beach D., Hannon G.J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000;404(6775):293–6.
3. Zamore P.D., Tuschl T., Sharp P.A., Bartel D.P. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000;101(1):25–33.
4. Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411(6836):494–8.
5. Carthew R.W., Sontheimer E.J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009;136(4):642–55.
6. Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2):281–97.
7. Ohshima K., Inoue K., Fujiwara A. et al. Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. *PLoS One* 2010;5(10):e13247.
8. Nykanen A., Haley B., Zamore P.D. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 2001;107(3):309–21.
9. Whitehead K.A., Langer R., Anderson D.G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8(2):129–38.
10. Dominska M., Dykxhoorn D.M. Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape. *J Cell Sci* 2010;123 (Pt 8):1183–9.
11. Davis M.E., Zuckerman J.E., Choi C.H. et al. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* 2010;464(7291):1067–70.
12. Burnett J.C., Rossi J.J., Tiemann K. Current progress of siRNA/shRNA therapeutics in clinical trials. *Biotechnol J* 2011;6(9):1130–46.
13. Oh Y.K., Park T.G. siRNA delivery systems for cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61(10):850–62.
14. Alexis F., Pridgen E., Molnar L.K., Farokhzad O.C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm* 2008;5(4):505–15.
15. Layzer J.M., McCaffrey A.P., Tanner A.K. et al. *In vivo* activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA* 2004;10(5):766–71.
16. Castanotto D., Rossi J.J. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature* 2009;457(7228):426–33.
17. Mosser D.M., Edwards J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008;8(12):958–69.
18. Taylor R.C., Cullen S.P., Martin S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9(3):231–41.
19. van de Water F.M., Boerman O.C., Wouterse A.C. et al. Intravenously administered short interfering RNA accumulates in the kidney and selectively suppresses gene function in renal proximal tubules. *Drug Metab Dispos* 2006;34(8):1393–7.
20. Stoorvogel W., Strous G.J., Geuze H.J. et al. Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell* 1991;65(3):417–27.
21. Martina M.S., Nicolas V., Wilhelm C. et al. The *in vitro* kinetics of the interactions between PEG-ylated magnetic-fluid-loaded liposomes and macrophages. *Biomaterials* 2007;28(28):4143–53.
22. Ohkuma S., Poole B. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75(7):3327–31.
23. Nguyen K.T., Zhao Y. Engineered Hybrid Nanoparticles for On-Demand Diagnostics and Therapeutics. *Acc Chem Res* 2015; 48(12):3016–25.
24. Deleavey G.F., Damha M.J. Designing chemically modified oligonucleotides for targeted gene silencing. *Chem Biol* 2012;19(8):937–54.
25. Yu B., Zhao X., Lee L.J., Lee R.J. Targeted delivery systems for oligonucleotide therapeutics. *AAPS J* 2009;11(1):195–203.
26. Xu C.-F., Wang J. Delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy. *Asian J Pharm Sci* 2015;10(1):1–12.
27. Smyth T.J., Redzic J.S., Graner M.W., Anchordoquy T.J. Examination of the specificity of tumor cell derived exosomes with tumor cells *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 2014;1838(11):2954–65.
28. Rappaport J., Hanss B., Kopp J.B. et al. Transport of phosphorothioate oligonucleotides in kidney: implications for molecular therapy. *Kidney Int* 1995;47(5):1462–9.
29. Pan Q., Ramakrishnaiah V., Henry S. et al. Hepatic cell-to-cell transmission of small silencing RNA can extend the therapeutic reach of RNA interference (RNAi). *Gut* 2012;61(9):1330–9.
30. Rider M.A., Hurwitz S.N., Meckes D.G. Jr. ExtraPEG: a polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles. *Sci Rep* 2016;6:23978.
31. Love K.T., Mahon K.P., Levins C.G. et al. Lipid-like materials for low-dose, *in vivo* gene silencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(5):1864–9.
32. Lee H., Lytton-Jean A.K., Chen Y. et al. Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted *in vivo* siRNA delivery. *Nat Nanotechnol* 2012;7(6):389–93.
33. Akinc A., Querbes W., De S. et al. Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Mol Ther* 2010;18(7):1357–64.
34. Haque M.E., McIntosh T.J., Lentz B.R. Influence of lipid composition on physical properties and peg-mediated fusion of curved and uncurved model membrane vesicles “Nature’s own” fusogenic lipid bilayer. *Biochemistry* 2001;40(14):4340–8.
35. Ohkuma S., Poole B. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75(7):3327–31.
36. Nguyen K.T., Zhao Y. Engineered hybrid nanoparticles for on-demand diagnostics and therapeutics. *Acc Chem Res* 2015;48(12):3016–25.
37. Salvati A., Pitek A.S., Monopoli M.P. et al. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nat Nanotechnol* 2013;8(2):137–43.
38. Bolhassani A. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2011;1816(2):232–46.
39. Campbell I.D., Humphries M.J. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3(3).
40. Semple S.C., Akinc A., Chen J. et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol* 2010;28(2):172–6.
41. Batrakova E.V., Kabanov A.V. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J Control Release* 2008;130(2):98–106.
42. Ratajczak J., Miekus K., Kucia M. et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006;20(5):847–56.
43. Baj-Krzyworzeka M., Szatanek R., Węglarczyk K. et al. Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55(7):808–18.
44. Deregibus M.C., Cantaluppi V., Calogero R. et al. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 2007;110(7):2440–8.
45. Skog J., Wurdinger T., van Rijn S. et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology* 2008;10(12):1470–6.

46. Valadi H., Ekstrom K., Bossios A. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology* 2007;9(6):654–9.
47. Yuan A., Farber E.L., Rapoport A.L. et al. Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PLoS One* 2009;4(3):e4722.
48. Collino F., Deregibus M.C., Bruno S. et al. Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PLoS One* 2010;5(7):e11803.
49. Mittelbrunn M., Gutierrez-Vazquez C., Villarroya-Beltri C. et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* 2011;2:282.
50. Smyth T.J., Redzic J.S., Graner M.W., Anchordoquy T.J. Examination of the specificity of tumor cell derived exosomes with tumor cells *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 2014;1838(11):2954–65.
51. Hemler M.E. Targeting of tetraspanin proteins – potential benefits and strategies. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7(9):747–58.
52. Segura E., Nicco C., Lombard B. et al. ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood* 2005;106(1):216–23.
53. Kooijmans S.A., Stremersch S., Braeckmans K. et al. Electroporation-induced siRNA precipitation obscures the efficiency of siRNA loading into extracellular vesicles. *J Control Release* 2013;172(1):229–38.
54. Shtam T.A., Kovalev R.A., Varfolomeeva E.Y. et al. Exosomes are natural carriers of exogenous siRNA to human cells *in vitro*. *Cell Commun Signal* 2013;11:88.
55. Andaloussi S.E., Lehto T., Mager I. et al. Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically *in vivo*. *Nucleic Acids Res* 2011;39(9):3972–87.
56. Munich S., Sobo-Vujanovic A., Buchser W.J. et al. Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. *Oncoimmunology* 2012;1(7):1074–83.
57. Mittelbrunn M., Gutierrez-Vazquez C., Villarroya-Beltri C. et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* 2011;2:282.
58. Alvarez-Erviti L., Seow Y., Yin H. et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* 2011;29(4):341–5.
59. Zhang Y., Liu D., Chen X. et al. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell* 2010;39(1):133–44.
60. Akao Y., Iio A., Itoh T. et al. Microvesicle-mediated RNA molecule delivery system using monocytes/macrophages. *Mol Ther* 2011;19(2):395–99.
61. Ohno S., Takanashi M., Sudo K. et al. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Mol Ther* 2013;21(1):185–91.
62. Thery C., Boussac M., Veron P. et al. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 2001;166(12):7309–18.
63. Wubbolts R., Leckie R.S., Veenhuizen P.T. et al. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem* 2003;278(13):10963–72.
64. Olson S.D., Kambal A., Pollock K. et al. Examination of mesenchymal stem cell-mediated RNAi transfer to Huntington's disease affected neuronal cells for reduction of huntingtin. *Mol Cell Neurosci* 2012;49(3):271–81.
65. Pegtel D.M., Cosmopoulos K., Thorley-Lawson D.A. et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(14):6328–33.
66. Wang J.J., Wang Z.Y., Chen R. et al. Macrophage-secreted exosomes delivering miRNA-21 inhibitor can regulate BGC-823 cell proliferation. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16(10):4203–9.
67. Wahlgren J., De L. Karlson T., Brisslert M. et al. Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes. *Nucleic Acids Res* 2012;40(17):e130.
68. Shtam T.A., Kovalev R.A., Varfolomeeva E.Y. et al. Exosomes are natural carriers of exogenous siRNA to human cells *in vitro*. *Cell Commun Signal* 2013;11:88.
69. Lunavat T.R., Jang S.C., Nilsson L. et al. RNAi delivery by exosome-mimetic nanovesicles – Implications for targeting c-Myc in cancer. *Biomaterials* 2016;102:231–8.
70. Zhang Y., Li L., Yu J. et al. Microvesicle-mediated delivery of transforming growth factor beta1 siRNA for the suppression of tumor growth in mice. *Biomaterials* 2014;35(14):4390–400.
71. Greco K.A., Franzen C.A., Foreman K.E. et al. PLK-1 Silencing in bladder cancer by siRNA delivered with exosomes. *Urology* 2016;91:241.
72. Momen-Heravi F., Bala S., Kodys K. et al. Exosomes derived from alcohol-treated hepatocytes horizontally transfer liver specific miRNA-122 and sensitize monocytes to LPS. *Sci Rep* 2015;5:9991.
73. Wang J.J., Wang Z.Y., Chen R. et al. Macrophage-secreted exosomes delivering miRNA-21 inhibitor can regulate BGC-823 cell proliferation. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16(10):4203–9.
74. Zhuang X., Xiang X., Grizzle W. et al. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Mol Ther* 2011;19(10):1769–79.
75. Ha D., Yang N., Nadithe V. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharm Sin B* 2016;6(4):287–96.