

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

DOI 10.26163/RAEN.2019.89.74.011
УДК (615:575):616-006

E.B. Shustov

PROSPECTS OF GENE-ORIENTED PHARMACOTHERAPY IN ONCOLOGY

Evgeny Shustov – chief research worker, the Institute of Toxicology of the Federal Medical-Biological Agency, professor, the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, St. Petersburg States Chemical-Pharmaceutical University of the Ministry of Health, member of the Russian Academy of Natural Sciences, Laureate of the State Prize of the Russian Federation in Science and Engineering, Doctor of Medicine, professor, St. Petersburg, **e-mail: shustov-msk@mail.ru**.

Modern pharmacotherapy in oncology is aimed at molecular targets that have at their core tumorigenic oncogenes, signaling pathways of tumor growth, mechanisms of withdrawing tumor cells from the immunity system control and processes of programmed cell death. Currently, gene-oriented therapy deactivating the mechanisms of oncogenes' excess production of tumor growth factors and metastasis is seen as the most promising medical technology of targeted pharmacotherapy of tumors. It is aimed at deactivating the mechanisms of transcription and translation via RNA-interference (short interfering RNA and micro RNA), the destruction of matrix nucleic acids (ribozymes, DNAzymes), blocking the synthesis of nucleic acids (antisense oligonucleotides). Certain representatives of gene-oriented pharmaceuticals have already been introduced into clinical practice; an essential part of them is at the stage of pre-clinical research. We discuss the problems of the delivery of the pharmaceuticals in question to their targets as well as ways to improve their stability in the human body and prospects of their application in pharmacology.

Keywords: antisense oligonucleotides; gene-oriented pharmacotherapy; DNAzymes; short interfering RNA; micro RNA; oncology; ribozymes; RNA-interference.

Е.Б. Шустов

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ГЕН-ОРИЕНТИРОВАННОЙ ФАРМАКОТЕРАПИИ В ОНКОЛОГИИ

Евгений Борисович Шустов – главный научный сотрудник Института токсикологии ФМБА России, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета МЗ РФ, академик РАЕН, лауреат Государственной премии РФ в области науки и техники, доктор медицинских наук, профессор, г. Санкт-Петербург; **e-mail: shustov-msk@mail.ru**.

Современная фармакотерапия в онкологии ориентирована на таргетные молекулярные мишени, ключевую роль в которых играют опухолевые онкогены, сигнальные пути активации опухолевого роста, механизмы вывода опухолевых клеток из-под контроля иммунной системы и процессов программируемой клеточной гибели. В настоящее время наиболее перспективной медицинской технологией прицельной фармакотерапии опухолей является ген-ориентированная терапия, выключаящая механизмы избыточной продукции онкогенами факторов опухолевого роста и метастазирования. Она ориентирована на выключение механизмов транскрипции и трансляции за счет феноменов РНК-интерференции (короткие интерферирующие РНК и микроРНК), разрушения матричных нуклеиновых кислот (рибозимы, ДНКзимы), блока синтеза нуклеиновых кислот (антисмысловые олигонуклеотиды). Отдельные представители ген-ориентированных средств фармакотерапии уже внедрены в клиническую практику, существенная часть

находится на различных стадиях доклинического изучения. Обсуждаются сложности доставки изучаемых средств к их мишеням и способы улучшения их стабильности в биосредах организма, перспективы их применения в онкологии.

Ключевые слова: антисмысловые олигонуклеотиды; ген-ориентированная фармакотерапия; ДНКзимы; короткие интерферирующие РНК; микроРНК; онкология; рибозимы; РНК-интерференция.

В последние годы онкофармакология стала одной из наиболее быстро развивающихся областей фармакологии. Во многом это стало следствием расшифровки многих ключевых стадий онкогенеза. Стали понятными молекулярные механизмы действия онкогенов, расшифрованы сигнальные пути онкодифференцировки и пролиферации, выделены и расшифрованы структуры ферментов, обеспечивающих прочтение и реализацию кода нуклеиновых кислот. Изучены механизмы программируемой клеточной гибели и иммунного контроля за опухолевым ростом, закономерности «выскальзывания» опухолей из-под контроля организма. Активно разрабатываются технологии ген-ориентированной терапии. Все это делает задачу поиска новых перспективных подходов для онкофармакологии не только актуальной, но и реалистичной.

Важной особенностью многих противоопухолевых средств является низкая специфичность, способность угнетать процессы пролиферации в неопухолевых тканях, высокий уровень токсичности. В связи с этим в онкофармакологии более, чем в других направлениях фармакологии, вынужденно развивается идеология пролекарств, когда активным становятся не просто метаболиты препарата, а метаболиты, образующиеся непосредственно в опухолевой клетке. Активно развивается методология химерных антител, способных выключать из онкогенеза отдельные рецепторы к онкогенам и факторам роста, гиперстимуляция которых является стартовым, сигнальным моментом патогенеза опухолевого процесса.

Активно развиваемая в настоящее время стратегии ген-направленной терапии злокачественных заболеваний включает такие направления, как:

- подавление гиперэкспрессии онкогенов и выключение синтеза белков опухолевого роста,

- восстановление экспрессии генов-супрессоров опухолей и выключение механизмов метастазирования и неконтролируемого роста клеток,

- потенцирование активности Т-клеточного звена иммунного контроля за опухолевым ростом,

- подавление процессов ангиогенеза и избыточности трофических возможностей опухолевых клеток,

- запуск механизмов саморазрушения и гибели клеток опухоли.

В результате ряда исследований выяснено, что «...Подавление ряда генов, аномально высокая экспрессия которых возникает при неопластической трансформации, можно осуществить с помощью препаратов на основе нуклеиновых кислот, таких как антисмысловые олигонуклеотиды (asON), малые интерферирующие РНК (siРНК), рибозимы и дезоксирибозимы (ДНКзимы) [...]. Механизм подавления экспрессии генов под действием этих препаратов заключается в их комплементарном связывании с матричной РНК-мишенью (мРНК), после чего она либо подвергается расщеплению, либо блокируется процесс ее трансляции» [7, с. 47–66].

Как известно, «...Антисмысловые олигонуклеотиды (asON) представляют собой синтетические одноцепочные ДНК длиной 15–20 нуклеотидов, которые способны формировать комплементарный комплекс с целевой последовательностью мРНК. Подавление биосинтеза белка под действием asON происходит либо вследствие того, что мРНК-мишень в составе гибридного ДНК/РНК комплекса с asON расщепляется внутриклеточной РНКазой Н (*рис. 1а*), либо вследствие блокирования трансляции, так как образование гибридного комплекса препятствует продвижению рибосомы по мРНК (*рис. 1б*)» [7, с. 47–66].

РНК-интерференция представляет со-

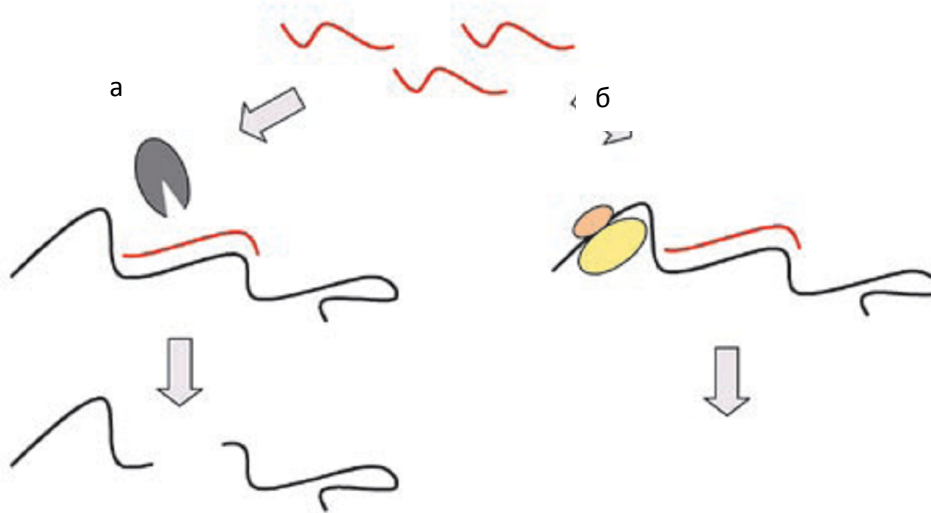


Рис. 1. Механизмы действия антисмысловых олигонуклеотидов (asON): а – расщепление РНК в составе гетеродуплекса с asON РНКазой Н; б – блокирование трансляции за счет связывания олигонуклеотида с мРНК (цит. по: [7]).

бой эволюционно консервативный механизм, благодаря которому организм способен защитить себя от внедрения чужеродной РНК, например вирусной [3; 4; 10].

В 80-х годах прошлого столетия были обнаружены каталитические молекулы РНК, способные расщеплять РНК – рибозимы [15]. «Молекулы ДНК, обладающие ферментативной активностью, в отличие от рибозимов, в природе обнаружены не были. В 1997 году Санторо и Джойс, используя метод селекции *in vitro* (SELEX), получили олигодезоксирибонуклеотиды, способные катализировать расщепление РНК. Эти молекулы были названы дезоксирибозимами или ДНКазимами [...]. ДНКазимы представляют собой одноцепочечные молекулы ДНК, в состав которых входит каталитический фрагмент длиной в 15 нуклеотидов, окруженный с двух сторон двумя переменными последовательностями олигодезоксирибонуклеотидов, отвечающих за образование комплементарного комплекса с РНК-мишенью» [7, с. 47–66].

Ген-направленные олигонуклеотиды позволяют с высокой эффективностью ингибировать ключевые звенья регуляции злокачественного роста. Эти препараты позволяют не только модулировать клеточную пролиферацию, апоптоз и лекарственную резистентность, но и влиять на

межклеточные взаимодействия, способствующие злокачественной прогрессии по организму. Однако эффективность препаратов, направленных на подавление экспрессии одного и того же гена может значительно различаться [2]. Между ген-ориентированными препаратами существует принципиальная разница по путям введения: если антисмысловые олигонуклеотиды допускают системное парентеральное введение в организм (внутривенное, внутримышечное, подкожное), то рибозимы и ДНКазимы требуют внутриопухолевого введения (или в питающий опухоль сосуд). Введение в организм интерферирующих РНК и доставка к мишеням является еще более проблематичной, так как введению подлежит генетическая конструкция в трансдукционном векторе (чаще всего – вирусе). Необходимо отметить, что достаточно активно ведется разработка различных методов повышения эффективности транспорта олигонуклеотидных препаратов в клетки-мишени. К таким методам относится, например, холестеринная модификация нуклеотидных цепочек [5], липосомный и наноконтейнерный транспорт [2; 14].

«Некоторые коммерческие компании уже предприняли попытки разработки и выпуска противоопухолевых препаратов на основе ген-направленных олигонуклеотидов. Наиболее чувствительными к дей-

ствию антисмысловых олигонуклеотидов оказались гены, участвующие в усилении пролиферации и блокировке апоптоза опухолевых клеток, а такие гены-мишени, как *Flt-1* (рецептор к вазоактивному эндотелиальному фактору роста) и *neu* (рецептор 2 типа человеческого эпителиального фактора роста HER-2), являются более чувствительными к действию рибозимов» [7, с. 47–66].

Так, начато клиническое применение:

- антисмысловой олигонуклеотид ISIS 3521 (**Affinitak**), мишенью которых является РКС- α при карциноме мочевого пузыря и толстого кишечника, легких, раке яичников;

- антисмысловой олигонуклеотид G3139 (**Genasense**) мишенью которых является антиапоптотические белки Bcl-2 при лимфомах, лимфолейкозах, миелолейкозах, меланоме, раке простаты, солидных опухолях различных тканей;

- антисмысловой олигонуклеотид AVI4126 (AVIBio Pharma, USA), мишенью которых является онкоген *c-myc* при раке молочной и предстательной желез;

- антисмысловой олигонуклеотид ISIS 5132 (Neopharm, USA), мишенью которых является онкоген *c-raf* при карциноме предстательной железы, яичников и толстого кишечника;

- рибозим Angiozyme (Sirna Ther, USA), мишенью которого является ген рецептора 2 к сосудистому эндотелиальному фактору роста VEGFR2 при раке молочной железы, карциноме легких, толстого кишечника

- рибозим Herzyme (Sirna Ther, USA), мишенью которого является онкоген *neu* (HER2/*erbB2*) при раке молочной железы

На разных стадиях клинических испытаний находятся антисмысловые олигонуклеотиды для различных генных мишеней при лечении гепатоцеллюлярной карциномы, карциномы почек, предстательной железы, толстого кишечника, немелкоклеточного рака легких, солидных опухолей.

На различных стадиях доклинического изучения находятся:

- антисмысловые олигонуклеотиды для лечения глиом, карциномы молочных

желез, карциномы почек, раке простаты, яичников;

- рибозимы для лечения глиобластом, карциномы глотки, карциномы мочевого пузыря, поджелудочной железы, раке простаты, меланомы;

- ДНКзимы для лечения карциномы молочных желез;

- интерферирующие РНК для лечения карцином молочных желез, поджелудочной железы, простаты, толстого кишечника, яичников, легких, лимфом, лимфосарком.

Таким образом, в руках врачей уже сейчас появляются средства ген-ориентированной терапии, направленные на подавление активности ключевых онкогенов, блокирующие рост и метастазирование злокачественных опухолей. Развитию этого направления придается все большее значение [7].

Такие представители препаратов на основе ген-направленных нуклеиновых кислот, как ДНКазимы и малые интерферирующие РНК, совсем недавно стали рассматриваться в качестве перспективных терапевтических инструментов, но по количеству успешных исследований быстро приближаются к *asON* и рибозимам [11].

МикроРНК – класс малых (длиной 20-30 нуклеотидов) одноцепочечных некодирующих белок РНК эндогенного происхождения, являющихся важными компонентами программируемой регуляции метаболических процессов клеток эукариот. Биорегуляция экспрессии генов с помощью микроРНК осуществляется путём модуляции процесса трансляции (ингибирование или стимуляция) и приводит в конечном итоге к снижению содержания белкового продукта гена [17].

МикроРНК имеют эндогенное происхождение. Гены микроРНК локализуются в межгенном пространстве кодирующих цепей в виде одиночных генов или их кластеров. Они являются эффективно действующим звеном регуляторной сети транскрипции. Показано, что гены *miR* коэкспрессируются с их *mRNA*-мишенями и могут иметь с ними как положительную, так и отрицательную обратную связь. Пред-

полагается, что в геноме человека может быть более 20000 генов микроРНК, что составляет более 3% емкости генома, а сами miR могут контролировать около 30% всех генов человека [17].

Как было доказано в лабораторных опытах, «...МикроРНК участвуют в контроле и регуляции развития организма (начиная с эмбриогенеза), процессах дифференциации и роста клеток, образования тканей и отдельных органов. Они контролируют самоидентификацию и дифференциацию стволовых клеток, процессы пролиферации и апоптоза, участвуют в сигнальных системах клетки, в процессах регуляции нервной и эндокринной систем, иммуногенезе» [8, с. 72–77]. Показано, что микроРНК участвуют в процессах взаимодействия белок-белок у человека, регуляции метаболизма низкомолекулярных соединений (аминокислот, липидов, глюкозы, фосфатов) и регуляции клеточного осмотического давления. Изменения профиля miR выявлены при различных патологических процессах, включая стресс, воспаление, онкогенез [8; 9; 17].

Молекулы микроРНК формируют шпильчатые структуры, подвергающиеся

процессингу с образованием малых РНК (длиной в 21-23 нуклеотида), блокирующих синтез определённых белков на уровне РНК, в основном через подавление трансляции гомологичных им последовательностей матричных РНК (мРНК) (рис. 2).

С одной стороны, каждая микроРНК потенциально может выступать регулятором экспрессии нескольких сотен мРНК, с другой стороны, экспрессия одного гена может регулироваться несколькими микроРНК. Таким образом, микроРНК представляют собой новый уровень координированной экспрессии генов, дополняющий действие белков-транскрипционных факторов, причём регуляция с помощью микроРНК отличается быстротой и обратимостью. Показано участие микроРНК в регуляции таких важных клеточных процессов как дифференцировка, пролиферация, апоптоз и реакция на стресс. Зачастую под контролем определённой микроРНК находятся сразу несколько участников регуляторных путей, отвечающих за определённое состояние клетки, поэтому нарушение экспрессии микроРНК приводит к нарушению регуляции целой сиг-

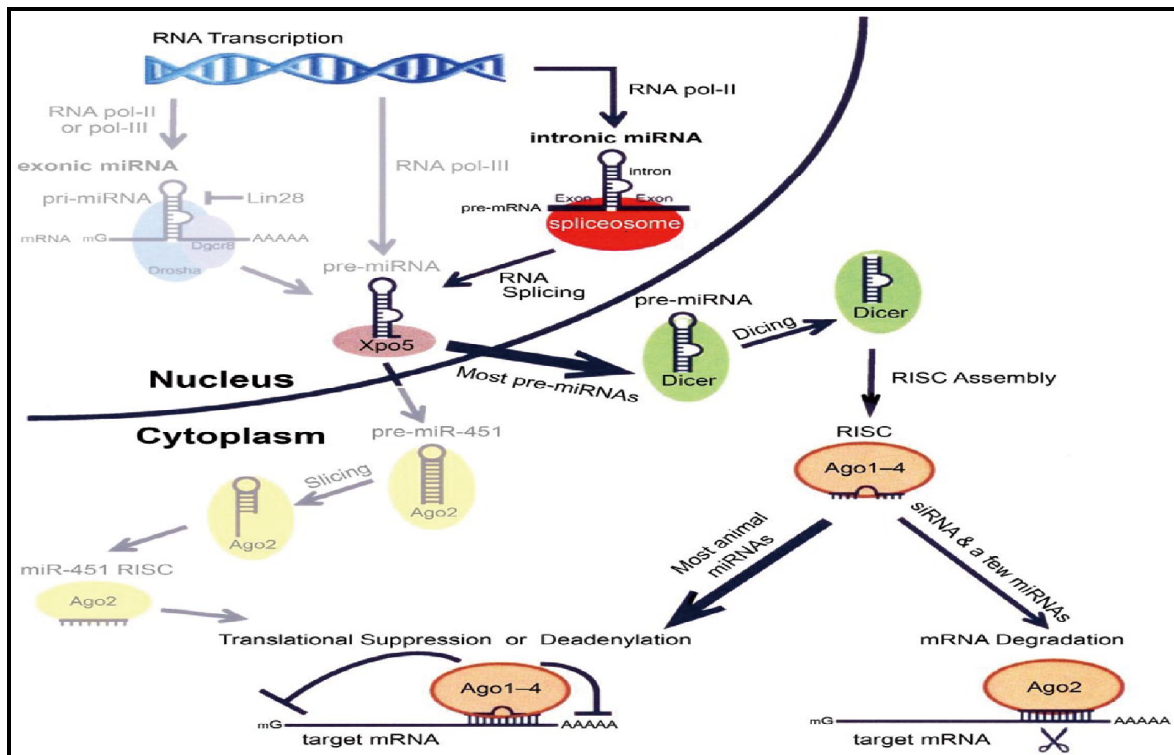


Рис. 2. Биосинтез микроРНК (затенением отмечены неканонические пути) (цит по: [16]).

нальной сети и серьёзным нарушениям функции клетки. Так, показано, что нарушение правильного функционирования определённых микроРНК связано с онкологической трансформацией клеток, развитием неврологических заболеваний, патологий сердечно-сосудистой системы [9; 12; 16; 17].

Анализ литературных данных по молекулярным механизмам процессов опухолевого роста показал, что известные основные мишени действия противоопухолевых средств в практически полном объеме используются в практике онкофармакологии (как внедренные в практику, так и находящиеся на различных стадиях доклинического или клинического изучения). Наиболее перспективные ген-ориентированные средства олигонуклеотидной природы могут включаться в программы импортозамещения в фармацевтической отрасли, Отставание от американских исследовательских центров в работах по этому направлению, также как и в технологиях химерных гуманизированных антител к ключевым антигенам составляет не менее 10 лет, что не позволяет рассчитывать на появление прорывных отечественных разработок в сфере онкофармакологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ануфриева К.М., Бессонова В.А. Синтез олигонуклеотидов // Современные научные исследования и инновации. 2016. № 7. С. 28–34.
2. Бочков Н.П., Пузырев В.П., Смирнихина С.А. Клиническая генетика. М., 2011. 592 с.
3. Вильгельм А.Э., Чумаков С.П., Прасолов В.С. Интерференция РНК: биология и перспективы применения в биомедицине и биотехнологии // Молекулярная биология. 2006. Т. 40. № 3. С. 387–403.
4. Долгих М.С. Возможности генной терапии, ее методы, объекты и перспективы // Успехи современной биологии. 2004. Т. 124. № 2. С. 123–143.
5. Круглова Н.С., Мещанинова М.И., Венямина А.Г., Зенкова М.А., Власов В.В., Черноловская Е.Л. Холестерин-модифицированные малые интерферирующие РНК, направленные на мРНК гена

MDR1: внутриклеточная доставка и биологическая активность // Молекулярная биология. 2010. Т. 44. С. 284–293.

6. Марахонов А.В., Баранова А.В., Скоблов М.Ю. РНК-интерференция: фундаментальные и прикладные аспекты // Медицинская генетика. 2008. № 10. С. 44–55.

7. Патутина О.А., Миронова Н.Л., Власов В.В., Зенкова М.А. Новейшие подходы к лечению онкологических заболеваний: противоопухолевые препараты на основе геннаправленных нуклеиновых кислот // АС-TA NATURE. 2009. № 2. С. 47–66.

8. Ревякин А.О., Каркищенко Н.Н., Шустов Е.Б., Каркищенко В.Н., Ксенофонов Д.А. Взаимовлияния микроэлементов в мышцах лабораторных животных при нормальном и избыточном пищевом потреблении // Биомедицина. 2014. № 3. Сентябрь. С. 72–77.

9. Рогаев Е.И., Боринская С.А., Исламгулов Д.В., Григоренко А.П. МикроРНК человека в норме и патологии // Молекулярная биология. 2008. Т. 42. № 5. С. 751–764.

10. Рязанский С.С., Гвоздев В.А. Короткие РНК и канцерогенез // Биохимия. 2008. Т. 73. Вып. 5. С. 640–655.

11. Черноловская Е.Л. Принципы конструирования малых интерферирующих РНК для подавления экспрессии терапевтически значимых генов: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб., 2012. 34 с.

12. Шляхто Е.В. Кардиопротекция: фундаментальные и клинические аспекты. СПб., 2013. С. 249–255.

13. Geary R.S., Yu R.Z., Levin A.A. Pharmacokinetics of phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides // Curr. Opin. Investig. Drugs. 2001. V.2. P. 562–573.

14. Kalia M. Personalized oncology: recent advances and future challenges // Metabolism. 2013. V. 62. Suppl 1. S. 11–14.

15. Kruger K., Grabowski P.J., Zaug A.J. [et al.]. Ribozyme // Cell. 1982. V. 31. № 1. P. 147–157.

16. Li Z., Rana T.M. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges // Nature Reviews: Drug Discovery. AOP, published online 11 July 2014.

17. Mann D.L. MicroRNAs and the failing heart // N. Engl. J. Med. 2007. V. 356. P. 2644–2645.