

УДК 577.21

РАЗРАБОТКА АСО-ВЫПУСКАЮЩЕЙ КАССЕТЫ ДЛЯ УСЛОВНОГО НОКДАУНА ЦЕЛЕВЫХ ГЕНОВ В ЛЕЧЕНИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Дрозд В.С., Салимова А.А., Рыбалко Д.Д. (Химико-биологический кластер, НИУ ИТМО),
Научный руководитель – к.х.н., профессор Колпашиков Д.М.
(Chemistry Department and Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida)

Введение. В основе конструкции АСО-выпускающей кассеты используются антисмысловые олигонуклеотиды (АСО), как самый прогрессивный инструмент генной терапии на основе нуклеиновых кислот. В классическом понимании АСО имеет простой дизайн в виде одной терапевтической цепи, что дает 80-90 % эффективности нокдауна генов, вызывающих интерес. Однако, в онкотерапии АСО пока что не могут преодолеть барьеры 2 и 3 фаз клинических исследований. Основная причина - неэффективный выбор генов-мишеней, которые, как правило, ассоциированы с заболеванием, уже экспрессируются в больших количествах, для их подавления требуются огромные ресурсы и высокая лекарственная нагрузка на пациента. Второе ограничение технологии - невозможность нацеливать другие гены, а именно гены домашнего хозяйства (ГДХ), с помощью классического дизайна АСО, что могло бы помочь в разы усилить эффективность подхода, но такая стратегия опасна рисками возникновения очагов цитотоксичности во все тканях сразу, как в здоровых, так и в раковых. Чтобы устранить риски и открыть новую дверь в эффективной генной терапии рака, мы разрабатываем свой оригинальный подход по нацеливанию ГДХ только в раковых клетках.

Основная часть. АСО-выпускающая кассета состоит из 4 коротких функциональных олигонуклеотидов. Первый олигонуклеотид (олиго 1) несет в себе последовательность терапевтического АСО. Для внутриклеточной активации РНКазы-Н-зависимого расщепления целевого гена - этот участок АСО выполнен с тиофосфатной химической модификацией. Второй и третий олигонуклеотиды (олиго 2 и 3) формируют систему четырех-стороннего соединения (4-way-junction), находясь в составе кассеты, а в свободной виде формируют внутримолекулярные стабильные шпильки. Олигонуклеотид 4 (олиго 4) формируют платформу для сборки всех функциональных частей кассеты в одну конструкцию, кроме того имеет возможность связываться со специфическим для конкретного заболевания онкомаркером. Взаимодействие олиго 4 и онкомаркера дестабилизируют весь комплекс кассеты, олиго 2 и 3 формируют шпильки и тем самым олиго 1, несущий в себе последовательность терапевтического АСО, высвобождается из системы и становится доступным для связывания с РНК-мишенью и взаимодействия с ключевыми ферментами, участвующими в нокдауне целевого гена. Каждый дизайн АСО-выпускающей кассеты проходит 4 стадии валидации: от фундаментальной проработки дизайна, до подтверждения гипотезы в растворе, рационального внедрения химических модификаций и тестирования в раковых клетках.

Выводы. Предварительные дизайны показывают положительную динамику активации условного нокдауна модельного гена GFP как в растворных экспериментах в условиях близких физиологическим, так и в клеточной линии. Однако, требуются еще несколько шагов по финализации дизайна для более эффективного выпуска классического АСО из кассеты. Далее кассета будет переформатирована на подавление ГДХ, активность которого будет тесно связана с выживаемостью раковых клеток.