УДК 577.218:616-006

Новейшие подходы к лечению онкологических заболеваний: противоопухолевые препараты на основе ген-направленных нуклеиновых кислот

О.А. Патутина, Н.Л. Миронова, В.В. Власов, М.А. Зенкова*
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, 8
*E-mail: marzen@niboch.nsc.ru

РЕФЕРАТ На сегодняшний день основным способом борьбы с онкологическими заболеваниями остается химиотерапия. Этот метод лечения находится на пике своих возможностей, поэтому кроме усовершенствования традиционных способов терапии неоплазий назрела настоятельная необходимость разработки новых подходов к лечению злокачественных заболеваний. В данном обзоре рассмотрены инновационные экспериментальные подходы к терапии злокачественных новообразований, основанные на применении ген-направленных препаратов, таких как антисмысловые олигонуклеотиды (asON), малые интерферирующие РНК (siРНК), рибозимы и ДНКазимы, способные ингибировать экспрессию онкогенов. Подробно охарактеризованы гены-мишени для таких препаратов и суммированы основные результаты преклинических и первые этапы клинических исследований в этом направлении. Показано, что ген-направленные олигонуклеотиды, в зависимости от выбранного гена-мишени, отличаются значительным разнообразием модулирующих эффектов на опухолевые ткани, начиная от замедления и остановки пролиферации опухолевых клеток и заканчивая подавлением их инвазивных свойств. Несмотря на общую природу, не все антисмысловые ген-направленные препараты, адресованные к одному и тому же участку последовательности мРНК гена-мишени, одинаково эффективны. Результат определяется сочетанием типа препарата и участка его комплементарности в последовательности мРНК для выбранного гена-мишени.
Ключевые слова: противоопухолевая терапия, антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы, ДНКазимы, малые интерферирующие РНК.
Список сокращений: asON – антисмысловые олигонуклеотиды, siРНК – малые интерферирующие РНК, РНКи – РНК интерференция.

ВВЕДЕНИЕ

На современном этапе развития медицины приоритетной задачей практической онкологии является повышение эффективности лечения злокачественных новообразований путем поиска и разработки принципиально новых методических подходов, а также усовершенствования традиционных способов терапии неоплазий. Сочетание хирургии, радиационного облучения и химиотерапии остается золотым стандартом лечения онкологических больных, успехи которого позволили увеличить выживаемость пациентов в 8 раз за последние 30 лет. Неудовлетворительные результаты только хирургического лечения проявляются в виде рецидивов опухоли, появления метастазов, а также возникновения неоперабельных форм злокачественных заболеваний. Это заставляет обращаться к применению радио- и химиотерапии. Однако даже комбинация мощных

противоопухолевых программ во многих случаях оказывается бездейственной. Поэтому, несмотря на безусловные достижения современной онкологии, проблема повышения эффективности методов воздействия на злокачественные новообразования является крайне важной.

За несколько последних десятилетий комплексная химиотерапия стала основным методом лечения пациентов, страдающих от злокачественных заболеваний. Однако ее применение, обеспечивая выживаемость от 30 до 90 % больных в зависимости от типа онкопатологии, ограничено рядом факторов: системной токсичностью, отсутствием селективности по отношению к опухолевым тканям и появлением лекарственно-устойчивых клонов опухолевых клеток.

Достижения последних лет обогатили науку детальными знаниями молекулярных процессов, лежащих в основе канцерогенеза, опухолевой инвазии, ангиогенеза и метастазирования, а также явлений, вовлеченных в супрессию опухоли, контроль роста, апоптоз и иммунный ответ. Для химиотерапии неоплазий эти знания позволили разработать целые поколения новых препаратов, таких как глевек (Gleevec, Glivec или Imatinib mesylate), мабтера (Mabthera или Rituximab) и т.п., обладающих высокоселективным воздействием на клеточную мишень. Известно, что создание любого нового препарата требует 10–20 лет исследований, а увеличение его селективности многократно повышает его стоимость. Сегодня химиотерапия – эта высокодозная активная атака на опухолевые клетки – находится на пределе своих возможностей. Несмотря на достигнутый уровень выживаемости пациентов (при некоторых нозологических формах он увеличился за последние 20 лет в 10 раз) остается еще от 10 до 70 % больных, которые в силу разных факторов не реагируют на лечение. Таким образом, создание новых средств является актуальной задачей сегодняшнего и завтрашних дней. Среди различных классов разрабатываемых лекарственных средств для лечения онкопатологий особое место занимают ген-направленные препараты. Впервые возможность ингибирования экспрессии гена была показана в пионерских работах Гринёвой Н.И. с соавторами [1–3] и получила свое дальнейшее развитие в рамках идеи регуляции экспрессии генов, вовлеченных в канцерогенез, под действием антисмысловых [4] и ген-направленных олигонуклеотидов [5]. Сегодня основные течения ген-направленной терапии злокачественных заболеваний включают стратегии подавления гиперэкспрессии онкогенов, восстановления экспрессии генов-супрессоров опухолей, потенциирования активности иммунной системы, подавления процессов ангиогенеза и метастазирования, запуска самодеструкции опухоли.

В данном обзоре рассмотрены современные экспериментальные подходы к лечению онкологических заболеваний, основанные на использовании ген-направленных олигонуклеотидов, которые исследуются в настоящее время в экспериментах на клетках и на лабораторных животных, некоторые из них проходят различные стадии клинических испытаний.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ ГЕН-НАПРАВЛЕННЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Противоопухолевые препараты на основе нуклеиновых кислот представляют собой высокоспецифичный инструмент модуляции экспрессии генов и давно привлекают внимание исследователей в качестве регуляторов канцерогенеза на молекулярном уровне. 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. В общем, механизм подавления экспрессии генов под действием этих препаратов заключается в их комплементарном связывании с мРНК-мишенью, после чего целевая мРНК либо подвергается расщеплению, либо блокируется процесс ее трансляции.

asON представляют собой синтетические одноцепочные ДНК длиной 15–20 нуклеотидов, которые способны формировать комплементарный комплекс с целевой последовательностью мРНК [6]. 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]. В последнее время были получены asON, способные препятствовать транспорту сплайсированной мРНК из ядра в цитоплазму, а также asON, которые в результате блокирования сайта сплайсинга в пре-мРНК способны приводить к экспрессии альтернативного варианта белка [8, 9].

Впервые возможность избирательного подавления продукции определенного белка под действием asON была продемонстрирована в работе Замечника и Стефенсона в 1978 г. [4], в которой они показали, что 13-звенный олигонуклеотид, комплементарный 3′-концевой последовательности РНК вируса саркомы Рауса, ингибирует репликацию вируса *in vitro*. Эта работа послужила толчком к изучению потенциала asON в качестве терапевтических средств для лечения онкологических и вирусных заболеваний, воспалительных процессов, болезней крови, расстройств сердечно-сосудистой системы [10–14].

Ввиду того, что природные олигодезоксирибонуклеотиды в культуре клеток и в условиях *in vivo* подвергаются быстрой деградации под действием нуклеаз,

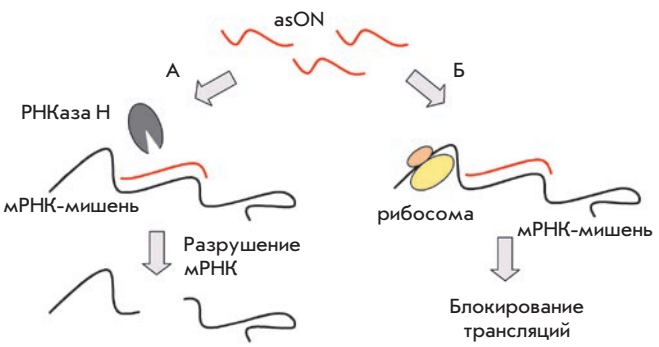


Рис. 1. Механизмы действия антисмысловых олигонуклеотидов (asON): а – расщепление РНК в составе гетеродуплекса с asON РНКазой Н; б – блокирование трансляции за счет связывания олигонуклеотида с мРНК

для повышения их стабильности в структуру asON вводят различные химические модификации [11]. Введение модификаций в структуру олигонуклеотида не только приводит к повышению устойчивости asON к нуклеазам, но и увеличивает эффективность его биологического действия, улучшает его гибридизационные свойства и облегчает его захват клетками. Среди наиболее значимых производных антисмысловых олигонуклеотидов необходимо упомянуть тиофосфатные олигонуклеотиды, у которых один из атомов кислорода, не участвующий в формировании фосфодиэфирной связи, заменен на атом серы [11, 15]. Тиофосфатные asON обладают повышенной устойчивостью к действию нуклеаз, хорошей растворимостью, хорошими гибридизационными свойствами и образуют с мРНК гетеродуплекс, который является субстратом РНКазы H [11]. Недостатком тиофосфатных asON является их повышенное сродство к ряду белков [16, 17]. Второе поколение asON содержало алкильные заместители в 2'-положении рибозы: 2'-O-метильные и 2'-O-метоксиэтильные олигорибонуклеотиды эффективно блокировали трансляцию мРНК, но не активировали расщепление гетеродуплекса мРНК/asON РНКазой H [18]. Позднее Нильсен с соавторами заменили сахарофосфатный остов нуклеиновой кислоты на N-(2'-аминоэтил)-глицин полиамидную структуру [19], что дало начало пептидил-нуклеиновым кислотам (PNA). PNA обладают высокой биологической стабильностью и хорошими гибридизационными свойствами, однако они не активируют РНКазу H. Кроме того, PNA являются нейтральными молекулами, что создает определенные трудности при их растворении и проникновении в клетки [20, 21]. К asON третьего поколения, кроме PNA, относятся N3'-N5'-фосфороамидаты (NP), в которых в 2'-дезоксирибозе 3'-гидроксильная группа заменена на 3'-аминогруппу [22] и морфолино-олигонуклеотиды (MF), основу скелета в которых составляют морфолин и диметиламидофосфитный линкер [23]. Молекулярный механизм действия этих олигонуклеотидов заключается в блокировании трансляции за счет связывания asON с целевой мРНК и/или модуляции сплайсинга [23]. NP и MF олигонуклеотиды применяют преимущественно для изучения биологии развития на эмбрионах полосатых данио (*danio rerio*, или zebra-fish) [24].

Одними из наиболее многообещающих химически модифицированных аналогов олигонуклеотидов являются LNA (Locked Nucleic Acids) – олигонуклеотиды, содержащие дополнительный структурный элемент – 2'-O,4'-C-метиленовый мостик, фиксирующий сахарный остаток в C3'-эндо-конформации [25, 26]. LNA проявляют стабильность к нуклеазному расщеплению и обладают исключительно высоким сродством к нуклеиновым кислотам. Перспективность использования LNA *in vivo* подтверждается тем, что они отличаются чрезвычайно низкой токсичностью при внутривенном введении, а также при микроинъекциях в мозг животных [27].

Явление РНК интерференции (РНКи) впервые было открыто у червя *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) как биологический ответ на экзогенную двуцепочную РНК (дцРНК), которая индуцировала специфическое подавление экспрессии гена (gene silencing) [28]. РНКи представляет собой эволюционно консервативный механизм, благодаря которому организм способен защитить себя от внедрения чужеродной РНК, например вирусной [29, 30]. Экзогенная дцРНК при попадании в организм процессируется в малые интерферирующие РНК (siРНК – small interfering RNA) под действием внутриклеточной рибонуклеазы Dicer [31]. Эти siРНК длиной 21–22 нуклеотида затем включаются в мультибелковый комплекс RISC (RNA-induced silencing complex). siРНК в составе комплекса RISC специфически связываются с комплементарной последовательностью мРНК, после чего происходит расщепление мРНК с помощью внутриклеточной рибонуклеазы Argonaute 2, входящей в комплекс RISC (*рис. 2*) [30, 32]. Далее молекулы siРНК повторно используются комплексом RISC для разрушения следующей молекулы гомологичной им мРНК, обеспечивая тем самым высокоэффективное ингибирование экспрессии гена [32]. Специфическое подавление экспрессии гена может быть достигнуто с помощью химически синтезированных siРНК или siРНК, полученных ферментативно *in vitro*, а также с помощью коротких шпилечных РНК – shРНК (short hairpin RNA), экспрессирующихся

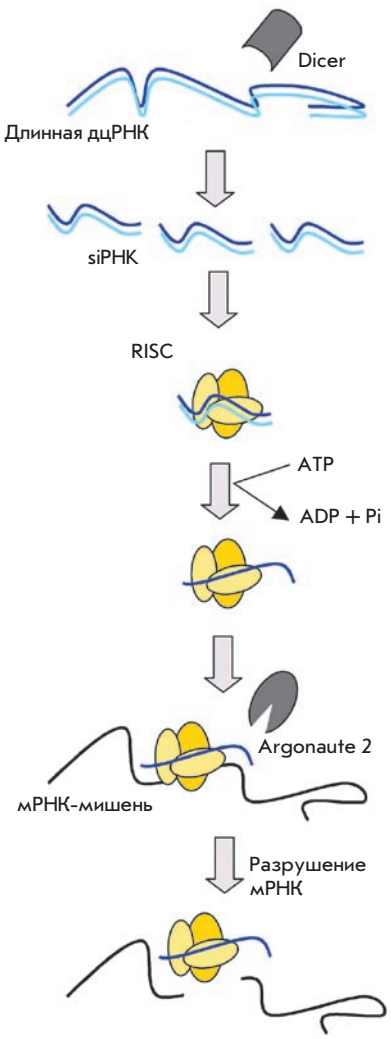


Рис. 2. Механизм РНК-интерференции

в клетке с ДНК матриц, которые могут быть получены с помощью ПЦР или включены в состав ДНК векторов [33].

В 80-х годах прошлого столетия были обнаружены каталитические молекулы РНК, способные расщеплять РНК, – рибозимы [34]. Существующие в природе каталитические РНК исследователи делят на большие и малые рибозимы. Большие рибозимы включают РНК, кодирующие интроны I и II групп, а также РНК субъединицы РНКазы P. Малые рибозимы включают рибозимы типа «головки молотка», шпилечные рибозимы, рибозимы вируса гепатита D и рибозимы сателлитной РНК Варкуда (Varkud Satellite RNA) [35, 36]. Расщепление РНК рибозимами протекает в 3 этапа: связывание рибозима с комплементарной последовательностью РНК путем формирования классических Уотсон-Криковских пар оснований, сайт-специфичное расщепление РНК-субстрата и высвобождение продуктов расщепления (*рис. 3а*) [36].

Практически все типы рибозимов проходят исследования в качестве терапевтических препаратов, однако рибозимы типа «головки молотка» применяются более широко благодаря их большей изученности [35]. Этот рибозим расщепляет РНК-мишень преимущественно по триплету NUH (N – любой нуклеотид; H – любой нуклеотид, кроме гуанозина), причем последовательности AUC и GUC процессируются наиболее эффективно [37]. Другим часто применяемым в терапевтических исследованиях рибозимом является рибозим в форме шпильки [38]. Рибозим в форме шпильки расщепляет РНК-субстрат по последовательности N*GUC (N – любой нуклеотид).

Природные 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 «10–23» ДНКазимами [39]. «10–23» ДНКазимы представляют собой одноцепочные молекулы ДНК, в состав которых входит консервативный каталитический кор длиной в 15 нуклеотидов, фланкированный двумя вариабельными последовательностями олигодезоксирибонуклеотидов, отвечающих за образование комплементарного комплекса с РНК-мишенью (*рис. 3б*) [39]. Расщепление молекулы РНК происходит между неспаренным пурином и спаренным пиримидином в присутствии ионов магния, при этом наиболее эффективное расщепление происходит по AU и GU сайтам.

ГЕНЫ-МИШЕНИ ДЛЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ГЕН-НАПРАВЛЕННЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Ключевую роль в онкогенезе играют изменения уровней активности определенных генов, аномальная экспрессия которых приводит к нарушениям регуляции клеточной пролиферации, апоптоза, дифференцировки, инвазии [40]. На молекулярном уровне процесс злокачественной трансформации представляет собой сложный каскад реакций, поэтому деятельность онкогенов зачастую многофункциональна и тесно взаимосвязана [40]. Являясь транскрипционными факторами и компонентами системы передачи сигналов в клетке, они вовлечены в целый ряд регуляторных путей, начиная от пролиферации клеток и ингибирования апоптоза и заканчивая инвазией. Основные гены-мишени для ген-направленной терапии представлены в *табл. 1*.

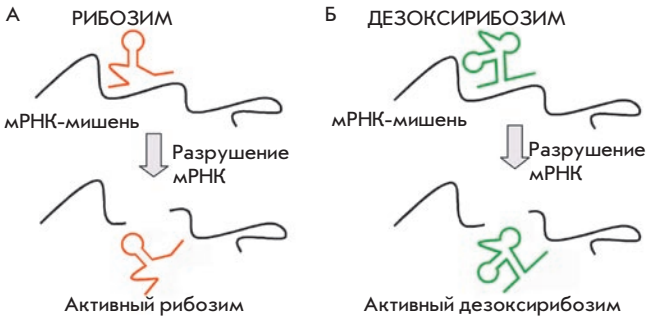


Рис. 3. Механизм действия рибозимов (**а**) и ДНКазимов (**б**)

Прежде всего, злокачественный рост клеток основан на автономной и неограниченной пролиферации клеточного клона. Поэтому исследователей в первую очередь привлекают гены, контролирующие пролиферацию и смену фаз клеточного цикла, такие как *c-myc*, *ras*, гены, кодирующие протеинкиназу C-α (PKC-α – proteinkinase C-α), рецептор инсулин-подобного фактора роста-1 (IGF-1R – insulin growth factor-1 receptor). Воздействие на системы программируемой гибели клеток путем ингибирования экспрессии антиапоптотических генов, таких как *bcl-2*, сурвивина и других, представляется также чрезвычайно эффективным.

Белки семейства Ras (K-ras, H-ras и N-ras) являются одними из самых изученных молекул, осуществляющих передачу сигнала от тирозинкиназных рецепторов в ядро клетки [41]. В результате гиперэкспрессии или точечной мутации гена *ras*, обнаруженной во многих типах онкологических заболеваний, белок Ras утрачивает способность дефосфорилироваться и, таким образом, постоянно находится в активированном состоянии, имитируя и передавая сигналы, стимулирующие пролиферацию и поддерживающие выживаемость опухолевых клеток [42]. Гены представителей семейства Ras являются привлекательными мишенями для применения ген-направленной ингибирующей терапии. Любопытной чертой ингибирующего действия рибозимов на активность онкогена *ras* является повышение степени дифференцированности опухолевых клеток [43–47]. Однако лидирующую позицию среди ген-направленных препаратов, подавляющих экспрессию онкогена *ras*, занял asON ISIS 2503. В 2004 году были объявлены результаты фазы II клинических испытаний совместного применения asON ISIS 2503 и гемцитабина [48].

Важная роль онкогена *c-myc* в регуляции пролиферации клеток и их злокачественного перерождения была установлена в конце 70-х годов Бишопом [49], и в качестве мишени для антисмысловой терапии этот белок один из первых привлек внимание исследователей. Доминирующую позицию среди ген-направленных препаратов, разработанных для регуляции экспрессии гена *c-myc*, занял морфолино-олигонуклеотид asON AVI-4126, подавляющий синтез белка не за счет активации РНКазы H, а за счет стерического блокирования трансляции [50]. Этот препарат успешно прошел преклинические испытания, продемонстрировал хорошую переносимость у паци-

Таблица 1. Характеристика генов-мишеней для препаратов на основе ген-направленных нуклеиновых кислот

События канцерогенеза	Гены-мишени	Функции	Препараты, применяемые для подавления функции
Пролиферация	Онкогены *ras* (*K-ras*, *H-ras* и *N-ras*)	Участие в системе передачи сигналов в клетке, регуляция широкого спектра деятельности клетки, включая пролиферацию, дифференцировку и выживаемость [42]	asON, рибозимы, siРНК
	c-myc	Активация пролиферации опухолевых клеток (регуляция клеточного цикла и активности теломеразы) [49,160]	asON, siРНК, ДНКазимы
	PKC-α	Участие в клеточной системе передачи сигналов, контроль пролиферации и выживаемости клеток [53,54]	asON, рибозимы, ДНКазимы
	Кластерин	Участие в транспорте липидов, делении клеток, апоптозе, поддержание выживаемости клеток в ответ на лечение и повышение резистентности опухолей [57,58]	asON
	IGF-1R	Активация сигнальных путей MAPK и PI-3K, стимулирующих пролиферацию/митогенез и ингибирование апоптоза [61–63]	asON
Блокировка апоптоза	bcl-2	Негативная регуляция апоптоза за счет блокирования выхода в цитоплазму цитохрома с из митохондрий [67]	asON, siРНК, рибозимы
	Сурвивин	Регуляция клеточного деления (взаимодействие с трубочками веретена деления способствует переходу клеток в сверочной точке G_2/M в состояние митоза), подавление апоптоза (ингибирование внутреннего каспаза-9-зависимого пути апоптоза) [73,74]	asON, рибозимы
	bcr-abl	Стимуляция митогенного и антиапоптотического сигналов, опосредуемых Ras-регулируемыми сигнальными путями [81,82]	Рибозимы, ДНКазимы, siРНК
	c-raf	Активация каскада MAPK/ERK, негативная регуляция апоптоза посредством инактивации проапоптотического белка Bad [88,90]	asON
Лекарственная устойчивость	MDR1	Формирование трансмембранных каналов для АТФ-зависимого выкачивания лекарственных средств из клетки, обеспечение резистентности опухоли [95–97]	asON, siРНК, рибозимы
	γ - глутамилцистеин синтетаза (система глутатиона)	Внутриклеточная детоксикация противоопухолевых препаратов [95]	Рибозимы
Дисфункция генов-супрессоров опухоли	DNMT1	Гиперметилирование и инактивация генов-супрессоров опухолей [102, 103]	asON
Увеличение продолжительности жизни опухолевых клеток	hTERT	Гиперактивация механизма удлинения теломерного повтора и, как следствие, увеличение продолжительности жизни малигнизированных клеток и их злокачественности [109]	asON, рибозимы
Арест синтеза ДНК	*RRR2* или *RRM2*	Регулирование содержания в клетках дезоксирибонуклеотидов, необходимых для синтеза ДНК за счет трансформирования рибонуклеотидов в дезоксирибонуклеотиды [113]	asON, siРНК
Ангиогенез опухоли	*Flt-1* (VEGFR)	Активная неоваскуляризация, подавление противоопухолевого иммунного ответа [119, 120]	asON, рибозимы, ДНКазимы, siРНК
	neu (HER2 или ErbB2, семейство EGFR)	Активация сигнальных путей, приводящих к стимуляции событий опухолевой прогрессии: пролиферации, инвазии и ингибированию апоптоза [127,128]	asON, рибозимы
	eIF4E	Усиление трансляции ростовых факторов, например, таких, как VEGF, C-myc, сурвивин и других [133–135]	asON
	PTN	Являясь фактором роста, способствует активному росту опухолей и их васкуляризации [137–139]	Рибозимы
	ALK	Являясь рецептором тирозинкиназы для PTN, способствует его активной работе и, следовательно, усилению васкуляризации опухолей [141]	»
Инвазия опухоли	MMP9	Элиминирование компонентов внеклеточной мембраны, облегчение инвазии опухолей [144–146]	Рибозимы, siРНК
	Ген FGF-BP	Активация FGF-2, индуцирующего пролиферацию опухолевых клеток и усиление инвазивного и ангиогенного потенциала [148]	Рибозимы
	Egr-1	Активация пролиферации и инвазия опухолей, участие в формировании фенотипа МЛУ [154,155]	ДНКазимы
	FAK	Регуляция адгезии и инвазии во внеклеточный матрикс [158]	siРНК
	CXCR4	Стимуляция процессов метастазирования [159]	»

ентов и сейчас находится в фазе II клинических исследований [51, 52].

Семейство генов протеинкиназы С представляет собой семейство серин-треониновых киназ, которые вовлечены в регуляцию важнейших функций клетки, включая дифференцировку, межклеточные взаимодействия, секрецию, функционирование цитоскелета, транскрипцию генов, пролиферацию и апоптоз [53]. Среди десятка изоформ белков этого семейства лишь PKC-α имеет связь с выживаемостью клеток, пролиферацией и апоптозом [54], принимая активное участие в неопластической трансформации клеток. Наилучшим кандидатом для избирательного подавления экспрессии гена опухолеспецифичной изоформы PKC-α оказался тиофосфатный asON ISIS 3521 (Affinitak™, США), селективно связывающийся с мРНК PKC-α и не проявляющий специфичности в отношении генов других неонкогенных представителей семейства протеинкиназ [55]. Этот препарат был разрешен для проведения клинических испытаний.

Кластерин впервые был описан в 1983 году как секреторный гликопротеин [56], ассоциированный с широким спектром физиологических и патологических процессов, таких как транспорт липидов, тканевая трансформация, защита клеточной мембраны, апоптоз и участие в системе комплемента [57]. Более поздние наблюдения показали, что кластерин представляет собой шапероноподобный белок и в ответ на стресс способствует выживаемости клеток [58]. Инактивация этого гена под действием ген-направленных препаратов может ослаблять механизмы репарации клетки в ответ на внешние губительные воздействия, такие как химиотерапия. Действительно, asON OXG-011 двукратно увеличивал токсическое действие паклитакселя на опухолевые клетки у мышей [59], а сейчас активно тестируется в клинических испытаниях в сочетании с химиопрепаратами [60].

Рецептор ростового инсулин-подобного фактора-1 (IGF-1R – insulin growth factor-1 receptor) представляет собой трансмембранную протеинкиназу, которая поддерживает независимый рост клеток [61]. Аномалия в экспрессии гена *IGF-1R* тесно связана с канцерогенезом [61]. Было показано, что гиперэкспрессия гена *IGF-1R* способствует развитию MDR1- и Bcl-2-опосредованной множественной лекарственной устойчивости МЛУ [61, 63]. Снижение экспрессии гена *IGF-1R* под действием ген-направленного антисмыслового олигонуклеотида препятствует развитию опухолей у мышей в экспериментах *ex vivo* [64], что подтверждает перспективность применения asON для устранения защитной системы опухолевых клеток.

Белок Bcl-2 является основополагающим представителем семейства про-(Bax, Bak, Bad) и анти-(Bcl-xl, Mcl-1) апоптотических факторов и был впервые обнаружен в клетках В-клеточной лимфомы в 1985 году [65]. Экспрессия гена *bcl-2* ассоциирована с агрессивным поведением опухолей в ответ на лечение химиопрепаратами и облучением [66]. Избыточный белок Bcl-2 способствует ингибированию деполяризации митохондриальной мембраны, блокируя тем самым механизмы апоптоза, запускаемые в ответ на лечение [67]. Снижение экспрессии гена *bcl-2* под действием ген-направленных олигонуклеотидов как напрямую способствовало запуску апоптоза в опухолевых клетках, так и увеличивало чувствительность клеток к апоптоз-индуцирующим химиопрепаратам [68, 69]. asON G3139 продемонстрировал значительный терапевтический успех, он находится в фазе III клинических испытаний [70–72].

Сурвивин является представителем семейства ингибиторов апоптоза (IAP). Несмотря на то что его функция в клетке до сих пор остается неопределенной, было установлено, что этот белок вовлечен в регуляцию клеточного деления и апоптоз [73]. Сурвивин селективно ингибирует внутренний каспаза-9-зависимый путь апоптоза [74], а в результате взаимодействия с микротрубочками веретена деления в обход механизмов апоптоза способствует переходу клетки в сверочной точке G_2/M в состояние митоза [75], стимулируя аномальную прогрессию роста клеток. Снижение экспрессии гена сурвивина под действием asON напрямую приводило к индукции апоптоза и гибели опухолевых клеток [76, 77], ингибирующее же действие рибозима на активность гена без привлечения дополнительных индукторов апоптоза не влияло на жизнеспособность клеток [78–80]. Изучение сурвивина в качестве гена-мишени в экспериментах *in vivo* пока не проводилось.

Хромосомная транслокация t(9;22) объединяет два независимых гена – *bcr*, локализованный в хромосоме 22, и *abl*, расположенный в хромосоме 9 человека, – с образованием гибридного онкогена [81]. Так же как и исходный ген *abl*, образовавшийся химерный ген *bcr-abl* обладает повышенной киназной активностью. Путем фосфорилирования определенных клеточных факторов *bcr-abl* способствует злокачественному преобразованию клеток и отмене апоптоза [82]. В частности, образование гена *bcr-abl* приводит к развитию миелоидной или лимфоидной лейкемии [83]. Гибридная природа белка создала некоторые трудности для воздействия на его экспрессию: в некоторых случаях ген-направленные препараты вызывали подавление экспрессии не только химерного гена *bcr-abl*, но и исходного *abl* [84]. Эффективно избегать неспецифичности воздействия позволил максизим, двойной рибозим, осуществляющий расщепление РНК-мишени по двум сайтам [85]. Для подавления развития хронического миелолейкоза был разработан препарат иматиниб, обеспечивающий селективное ингибирование тирозинкиназы и позволяющий эффективно контролировать развитие лейкемии [86]. Однако встречаются случаи заболевания, проявляющие резистентность к иматинибу, вследствие образования точечных мутаций в гене или в силу каких-то других причин. В этих случаях на помощь приходит технология РНКи. Эксперименты с применением siРНК показали, что восприимчивость *bcr-abl*+ клеток к действию иматиниба можно восстановить с помощью РНКи [87].

Белки семейства Raf представляют собой серин-треониновые киназы, которые передают сигналы от широкого спектра мембранных рецепторов факторов роста к регуляторам апоптоза. Было установлено, что функционально активный белок Raf-1 активирует каскад MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases) [88], посредством NF-κB участвует в сигнальных путях регуляции пролиферации и выживаемости клетки [89], ингибирует проапоптотический белок Bad [90].

7–я
международная
специализированная
выставка

ЛабораторияЭкспо - 2009

10-13 ноября

Россия, Москва,
ВВЦ, пав. 69



7 th
international
specialized
exhibition

LaboratoryExpo - 2009

November, 10-13

Pav. 69, All-Russian
Exhibition center,
Moscow, Russia

ОРГАНИЗАТОРЫ:

- Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии
- Русская выставочная компания «Эксподизайн»

при поддержке:
Федеральных министерств и ведомств, РАН, РАМН, Ассоциации аналитических центров «Аналитика»

РАЗДЕЛЫ ВЫСТАВКИ:

- аналитическое и контрольно-измерительное оборудование, инструменты и химреактивы
- метрология
- центры коллективного пользования: оснащение и перспективы
- оборудование для механических испытаний, измерений твердости, испытаний на коррозионную стойкость
- оборудование для неразрушающего контроля
- оборудование электролабораторий
- лабораторная мебель, посуда, спецодежда
- инвестиционные проекты.

МЕРОПРИЯТИЯ, ПРОВОДИМЫЕ В РАМКАХ ВЫСТАВКИ:

- Научно - практический форум «Современная лаборатория»: конференции, семинары, круглые столы.
- Конкурс: «Лучшее лабораторное оборудование, изделие, прибор»
- Награды: Медаль и Диплом выставки «ЛабораторияЭкспо-2009», Медаль и Диплом ВВЦ, «Знак качества» лабораторного оборудования, изделия, прибора.

ЭКСПОДИЗАЙН

ДИРЕКЦИЯ ВЫСТАВКИ:
Тел./факс:(495) 926-80-63,
258-87-62,(499)181-60-83
E-mail:lab@expo-design.ru
Http://www.expo-design.info

Таким образом, белок Raf-1 находится в центре важнейших сигнальных сетей клетки, и мутации или нарушения экспрессии гена *raf-1* играют существенную онкогенную роль при перерождении клеток. Кроме того, белок Raf-1 является эффектором белкового продукта онкогена *ras* [91], мутации которого с высокой частотой возникают при злокачественной трансформации, поэтому терапия, направленная на подавление гена *raf-1*, может оказаться эффективной и при лечении ras-опосредованных неоплазий. Наиболее обещающие результаты специфического подавления гена *c-raf* и связанный с этим противоопухолевый эффект были получены при использовании asON. В 2002 году исследователи сообщили о результатах фазы II клинических испытаний препарата на основе тиофосфатного asON [92–94].

Как правило, при традиционной химиотерапии более чем у 30 % больных развивается лекарственная устойчивость, вызванная гиперэкспрессией гена множественной лекарственной устойчивости *MDR1* [95–97], кодирующего белок Р-гликопротеин. Р-гликопротеин принадлежит к суперсемейству ABC-транспортеров, использующих энергию гидролиза ATP для осуществления выкачивания химиопрепаратов из клетки. Гиперактивность Р-гликопротеина определяет устойчивость опухолевых клеток к широкому спектру химиопрепаратов. Поэтому инактивация гена *MDR1* может способствовать накоплению химиопрепарата в клетках и их гибели. Ген *MDR1* является достаточно распространенной мишенью для ген-направленных препаратов олигонуклеотидов, из которых наиболее эффективными на сегодняшний день кажутся рибозимы и siРНК. Эти препараты практически полностью подавляли рост опухолей у мышей [98, 99].

Одной из важнейших систем клетки, позволяющей ей обезвреживать цитостатики, является система глутатиона. Глутатион представляет собой небелковый тиол, взаимодействие сульфгидрильной группы которого с реактивной группой лекарственного средства определяет образование конъюгатов препарата с глутамином [95]. Эти конъюгаты менее активны, более водорастворимы и выбрасываются из клетки с помощью белков транспортеров [95]. Поэтому активация генов системы глутатиона может определять резистентность клеток к лекарствам [100]. Для преодоления МЛУ, опосредованной системой глутатиона, был разработан рибозим, который эффективно восстанавливал чувствительность опухолевых клеток к химиопрепаратам [101].

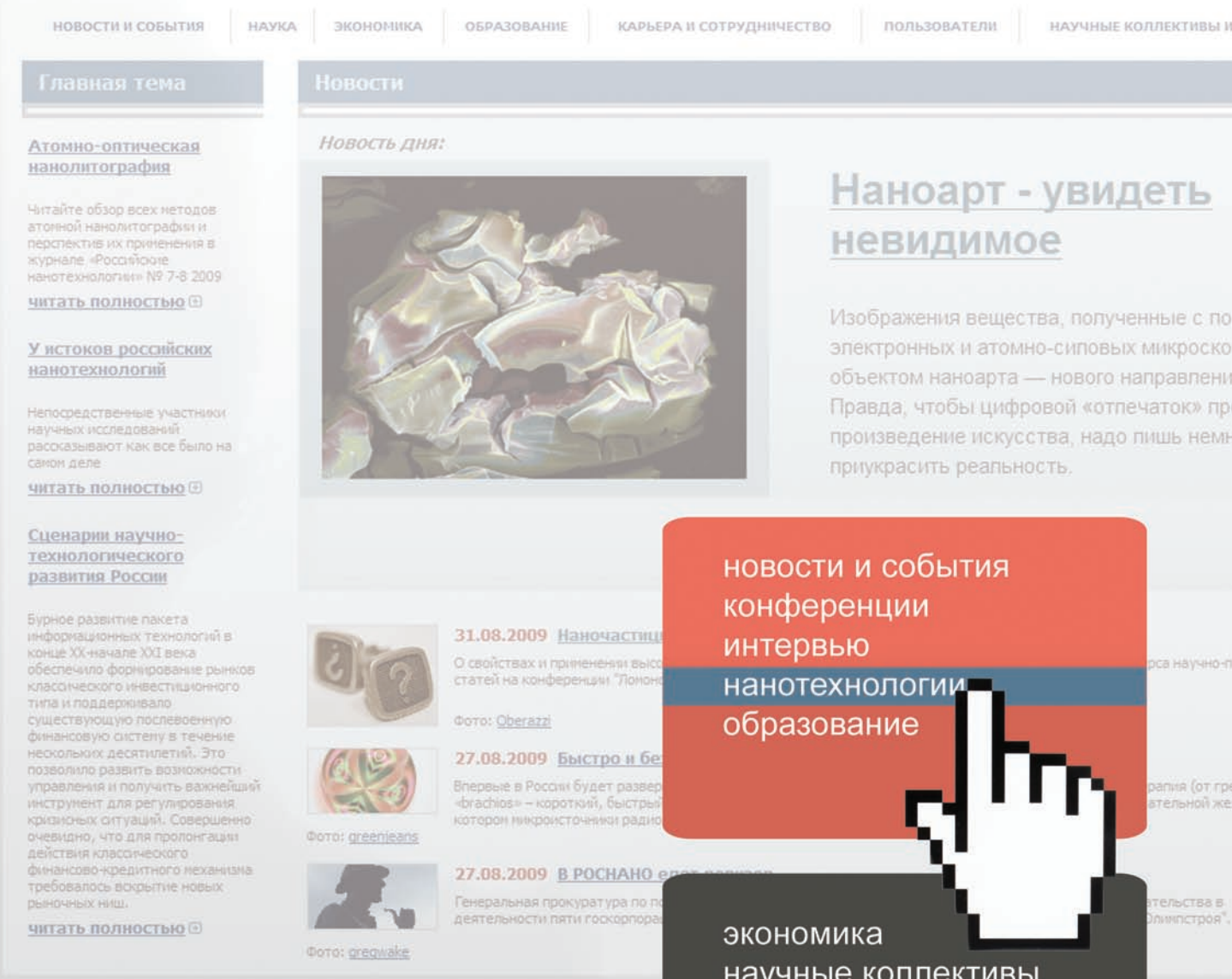
Множественные исследования показали возникновение в раковых клетках нарушенного метилирования некоторых районов генома [102]. Фермент ДНК-метилтрансфераза (DNMT1 – DNA methyltransferase 1) катализирует перенос метильной группы от S-аденозилметионина по 5 положению остатков цитозина в CpG островках, влияя тем самым на экспрессию генов [103]. Было установлено, что в опухолевых клетках возрастает активность ДНК-метилтрансферазы [104], а инициация гиперактивности этого фермента приводит к злокачественной трансформации [105]. Кроме того, утверждается, что аномалия в процессах метилирования является важным фактором в определении ответа опухоли на химиотерапию [106]. В результате антисенс-ингибирования экспрессии гена *DNMT1* восстанавливалась функция генов-супрессоров опухолей и увеличивалась гибель опухолевых клеток [107]. Разработанный антисмысловой олигонуклеоид MG98 сейчас находится в фазе II клинических испытаний [108].

Теломеразная обратная транскриптаза восстанавливает длину теломеров за счет добавления тандемных повторов (TTAGGG) и необходима для полной репликации концов хромосом [109]. Установлено, что гиперактивация теломеразной обратной транскриптазы человека (hTERT – human telomerase reverse transcriptase) и канцерогенез тесно взаимосвязаны [110]. Для подавления активности гена фермента были разработаны asON, содержащие различные модификации, включая 2'-O-метильный asON, PNA [111] и 2'5'-олигоаденилат олигонуклеотид [112]. 2'-O-метильный asON подавлял экспрессию гена *hTERT* в культуре клеток на 97 % [111], а 2'5'-олигоаденилат олигонуклеотид вызывал 50 %-ную регрессию опухоли [112].

Фермент рибонуклеотидредуктаза катализирует синтез 2'-деоксирибонуклеотидов из соответствующих рибонуклеозид 5'-дифосфатов. Этот этап является лимитирующим скорость реакции образования 2'-деоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов, необходимых для синтеза ДНК [113]. R2 субъединица рибонуклеотидредуктазы (RRR2) экспрессируется в период поздней G_1 и ранней S фазы и играет существенную роль в определении скорости репликации ДНК [113]. Кроме того, известно, что RRR2 играет важную роль в определении злокачественного потенциала клеток посредством синергизма с некоторыми онкогенами и связи с мембраносвязывающим белком Raf-1 и митоген-ассоциированной протеинкиназой-2 [114, 115]. Поэтому специфическое ингибирование мРНК *RRR2* может оказать антинеопластический эффект через целый ряд механизмов. Применение asON GTI-2040 для подавления экспрессии *RRR2* приводило к 98 %-ную регрессии трансплантированной мышам карциномы почек [116]. В клинических испытаниях этот препарат продемонстрировал хорошую переносимость пациентами [117].

В начале 70-х годов Фолькман предположил, что рост солидных опухолей и метастазирование критическим образом зависят от ангиогенеза – формирования новых кровеносных сосудов из окружающей сосудистой сети [118]. Патологический рост новых сосудов обусловливает дальнейшую прогрессию солидных опухолей и их метастазирование. В течение нескольких последних десятилетий были обнаружены и охарактеризованы основные медиаторы ангиогенеза, обеспечив исследователей новыми онкомишенями. Среди многих стимуляторов неоангиогенеза наиболее мощным является фактор роста эндотелия сосудов (VEGF – vascular endothelial growth factor) [119]. Путем активации рецепторов VEGFR-1 и VEGFR-2 VEGF индуцирует активность внеклеточных сигнальных тирозинкиназ, играющих центральную роль в стимуляции пролиферации эндотелиальных клеток [120]. В результате альтернативного сплайсинга образуется как минимум 5 изоформ VEGF: $VEGF_{206}$, $VEGF_{189}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{145}$, $VEGF_{121}$ [121, 122]. Установлено, что усиленный ангиогенез и прогрессия опухолей ассоциированы с гиперэкспрессией изоформы $VEGF_{165}$ [123]. Для ингибирования активности VEGF были разработаны олигонуклеотиды и siРНК, специфически подавляющие экспрессию гена ростового фактора [124, 125]. Интересным подходом ингибирования активности VEGF

российский электронный
НАНОЖУРНАЛ



Парк-медиа, © 2009

стала разработка рибозимов, а позднее и ДНКазимов, направленных на подавление экспрессии рецепторов VEGF VEGFR-1, кодируемого геном *Flt-1*, и VEGFR-2, кодируемого геном *KDR* [126]. Среди всех предложенных стратегий подавления активности VEGF этот подход оказался наиболее эффективным, и препарат на основе рибозима ангиозим, направленный на подавление экспрессии гена *Flt-1*, достиг фазы II клинических испытаний [35].

Протоонкоген *neu,* также известный как *HER-2/erbB-2* или *NGL,* кодирует трансмембранный рецептор, обладающий высокой тирозинкиназной активностью, важной для внутриклеточной передачи сигналов [127]. В норме белок HER-2 не экспрессируется в большинстве тканей человека, а при неоплазиях этот рецептор проявляет тирозинкиназную активность даже в отсутствии лиганда [128]. Гиперэкспрессию HER-2 при онкогенезе часто связывают с амплификацией гена [129]. Недавно на основе моноклональных антител были разработаны препараты герцептин (Herceptin) и ритуксан (Rituxan), направленные на блокировку рецептора HER-2, однако в клинических испытаниях были отмечены неблагоприятные побочные эффекты, наиболее негативным из которых являлась кардиотоксичность [130, 131]. Поэтому на ген-направленную терапию HER-2-опосредованных неоплазий возлагают большие надежды. Среди препаратов на основе нуклеиновых кислот, применяемых для подавления активности HER-2, в клинические испытания вошел препарат херзим, созданный на основе рибозима типа «головки молотка». В фазе I клинических испытаний этот препарат продемонстрировал хорошую переносимость пациентами [132].

Эукариотический фактор инициации трансляции 4E (eIF4E – eukaryotic translation initiation factor 4E) связывается с 5'-кэпированным концом клеточных мРНК и доставляет их в комплекс инициации трансляции eIF4E. Этот комплекс считывает последовательность мРНК в 5'-3' направлении и расплетает вторичную структуру мРНК в 5'-нетранслируемой области, обнажая стартовый кодон трансляции и способствуя посадке рибосомы [133, 134]. В нормальных условиях активность eIF4E сдерживается специфическим белком, связывающим eIF4E–4E-BP (4E binding protein). При злокачественной трансформации может происходить либо гиперэкспрессия eIF4E, либо фосфорилирование 4E-BP и высвобождение активного eIF4E с формированием комплекса трансляции eIF4E [135]. Исследователями было отмечено, что в опухолях гиперактивный eIF4E усиливает трансляцию преимущественно генов белков, участвующих в опухолевой прогрессии, таких как Bcl-2, сурвивин, циклин D1, C-myc, VEGF [133, 134]. Поэтому избирательная супрессия активности eIF4E может оказаться чрезвычайно важной для ингибирования опухолевой прогрессии. Хороший терапевтический результат продемонстрировал asON, комплементарный eIF4E, который при введении мышам-опухоленосителям вызывал десятикратную регрессию опухоли и отсутствие побочных эффектов [136].

Плейотропин (PTN) является секретируемым фактором роста, который высоко экспрессируется в период развития нервной системы и «выключается» у взрослых [137], за исключением некоторых онкологических больных [138]. PTN является активным митогеном для фибробластов и эпителиальных клеток [137, 138]. Кроме того, он может индуцировать выброс активных протеолитических ферментов из эндотелиальных клеток [139]. Эти данные указывают на важную потенциальную роль PTN в ангиогенезе. Для подавления активности гена PTN в опухолевых клетках был разработан рибозим, комплементарный мРНК PTN, который продемонстрировал существенное противоопухолевое и антиметастатическое действия [140]. Более того, недавно было установлено, что ингибирование экспрессии анапластической лимфомной киназы (ALK – anaplastic lymphoma kinase), индуцирующей развитие анапластической лимфомы [141] и являющейся рецептором плейотропина [142], приводило не только к регрессии опухоли, но и к двукратному увеличению средней продолжительности жизни мышей [143].

Опухолевая прогрессия характеризуется способностью распространяться за пределы собственной ткани и развиваться в отдаленных негомологичных тканях. Модуляция экспрессии генов, вовлеченных в стимуляцию миграции и инвазии, с помощью ген-направленных препаратов также широко применяется исследователями. Матриксная металлопротеиназа-9 (MMP9 – matrix metalloproteinase-9) способна запускать деградацию компонентов внеклеточного матрикса и базальной мембраны (коллагены IV и V, эластин, энтактин, казеин, галектин) [144, 145], что способствует эпителиально-мезенхимальному переходу опухолевых клеток и стимулирует метастазирование [146]. Подавление функции металлопротеиназ с помощью рибозима способствует ингибированию метастазирования и увеличению средней продолжительности жизни мышей-опухоленосителей, однако не приводит к регрессии опухоли [147].

Фактор роста фибробластов (FGF – fibroblast growth factor) привлекает внимание исследователей как мощный митоген, индуцирующий дифференцировку и ангиогенные свойства в период развития, а также стимулирующий инвазию опухолевых клеток [148]. В норме у взрослых FGF синтезируется в чрезвычайно малых количествах, однако часто детектируется при некоторых онкологических заболеваниях [149]. Секретируемый FGF крепко связывается гепаран-сульфатным протеогликаном внеклеточного матрикса, что сдерживает его биологическую активность [150]. Одним из механизмов высвобождения FGF из внеклеточного матрикса является его связывание белком FGF-BP (FGF binding protein), который мобилизует и активирует его [150]. Было показано, что FGF-BP экспрессируется при ряде карцином [151], а также способствует перестроению неонкогенной клеточной линии SW-13, экспрессирующей FGF на онкогенный и ангиогенный фенотип [150]. Рибозим, разработанный для подавления экспрессии гена, кодирующего FGF-BP, эффективно угнетал развитие опухолей у мышей [152].

Фактор раннего ростового ответа (EGR-1 – early growth response factor-1) является типичным представителем семейства транскрипционных факторов, обладающих структурным доменом «цинковый палец» [153]. Активность EGR-1 индуцируется рядом внутренних и внешних факторов, таких как ростовые факторы, цитокины, ультрафиолет, ионизационное излучение и др. [153] Было показано, что EGR-1 участвует во множестве регулятор-

ных механизмов опухолевых клеток. Его активность связана с развитием злокачественной трансформации [154], транскрипцией гена *MDR1* [155], отрицательной реакцией на эстроген в случае карциномы молочной железы [156]. Для подавления активности гена, кодирующего EGR-1, был создан ДНКазим, который приводил к трехкратному уменьшению размеров опухолей у мышей [157].

Киназа местной адгезии FAK представляет собой нерецепторную тирозинкиназу, располагающуюся в области интегринового кластера, где цитоскелет клетки взаимодействует с белками внеклеточного матрикса. Здесь FAK получает сигналы от факторов роста и факторов адгезии и передает их внутрь клетки. FAK является важным посредником сигнальных путей пролиферации, миграции и выживаемости клеток и часто гиперэкспрессируется при неоплазиях. siРНК эффективно подавляет активность FAK и рост опухолей у мышей [158].

В случае рака молочных желез трансформированные клетки начинают экспрессировать хемокиновый рецептор CXC (CXCR4), вызывающий метастазирование в органы, содержащие большое количество CXCR4 лигандов. Ингибирование экспрессии CXCR4 с помощью siРНК уменьшает адгезивные и инвазивные свойства опухолевых клеток [159].

ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ГЕН-НАПРАВЛЕННЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК, НА МОДЕЛЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ И В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Препараты на основе нуклеиновых кислот давно привлекают внимание исследователей в качестве перспективных средств для ген-направленной терапии онкологических заболеваний благодаря их способности воздействовать на ключевые процессы канцерогенеза. В табл. 2 суммированы основные результаты исследований в этом направлении *in vitro,* а табл. 3 объединяет данные преклинических исследований *in vivo* и клинических испытаний. В данном разделе описано развитие препаратов на основе ген-направленных олигонуклеотидов, разработанных для ингибирования функции генов-мишеней, наиболее тесно связанных с канцерогенезом.

Ras

In vitro. Установленная локализация точечных мутаций в последовательности мРНК онкогена *ras* позволяет разрабатывать препараты олигонуклеотидов, точно адресованные в абберантный сайт мРНК-мишени, и «выключать» работу онкогена с высокой эффективностью. Первым для подавления экспрессии онкогена *ras* был разработан тиофосфатный asON (сейчас известный как ISIS 2503), адресованный к инициирующему кодону мРНК гена *H-ras* [161]. Обработка клеток карциномы шейки матки HeLa, трансфецированных плазмидой, содержащей объединенный ген *ras*-люцифераза, приводила к 98 %-ному подавлению экспрессии репортерного гена. В работах китайских исследователей обработка клеток гепатомы человека тиофосфатным asON в течение 5 дней приводила к ингибированию роста клеток на 87.8 % [162]. При этом наблюдалась блокировка H-ras-зависимого перехода раковых клеток в S-фазу клеточного цикла, а ДНК фрагментация, зафиксированная в обработанных клетках, указывала на запуск апоптоза [162].

Активно исследуется противоопухолевый потенциал рибозимов, направленных на подавление экспрессии генов семейства Ras. На клеточной модели меланомы, карциномы глотки и рака мочевого пузыря разными группами исследователей было показано, что H-ras рибозимы вызывали индукцию апоптоза, ингибирование пролиферации опухолевых клеток и способствовали восстановлению дифференцировки клеток [44–47].

Альтернативным подходом подавления экспрессии генов семейства Ras является применение технологии РНКи. Ретровирус-опосредованная экспрессия siРНК, гомологичной мРНК генов *H-ras* и *K-ras,* эффективно подавляла синтез белков этих генов в клетках рака яичников и карциномы поджелудочной железы [163, 164], снижала пролиферативную активность раковых клеток в результате увеличения количества клеток в G_0/G_1 фазе клеточного цикла до 66.2 % [163] и увеличивала количество клеток в состоянии апоптоза с 4 до 21 % [163]. Чанг с соавторами, применив аденовирусную систему доставки K-ras-siРНК в клетки, получил 80 %-ное снижение количества белка K-ras в клетках рака легкого и подавление пролиферации опухолевых клеток [165].

In vivo. Предварительная трансфекция клеток гепатоцеллюлярной карциномы с помощью asON, направленной на подавление онкогена *H-ras*, приводила не только к снижению веса опухолей у мышей [162, 166], но и ингибировала процессы метастазирования [166]. Эффективность противоопухолевого действия asON ISIS 2503 у мышей с опухолями предстательной железы увеличивалась при введении в последовательность препарата LNA-нуклеотидов [167]. Препарат asON ISIS 2503 был разрешен для проведения клинических испытаний. В фазе I клинических испытаний пациенты ежедневно в течение 14 дней получали инъекции asON ISIS 2503 в дозе 10 мг/кг [168]. Через неделю курс инъекций повторяли. asON ISIS 2503 не проявил выраженной токсичности и в некоторых случаях способствовал стабилизации заболевания. Результаты фазы II клинических испытаний с участием пациентов, страдающих аденокарциномой поджелудочной железы, определили переносимость сочетанного применения asON ISIS 2503 и гемцитабином и показали положительный ответ на лечение в 10.4 % случаев [48].

Применение анти-H-ras рибозимов *in vivo* приводило к существенному торможению роста опухолей у мышей, снижению их инвазивного потенциала и двукратному увеличению продолжительности жизни животных [43–45]. Киджима и соавторы разработали рибозим, направленный в область кодона 12 мутантного транскрипта гена *K-ras* (замена триплета GGT на GTT), и получили рекомбинантный аденовирус, экспрессирующий рибозим [169]. Внутриопухолевое введение такого препарата атимусным мышам с трансплантированной карциномой поджелудочной железы вызвало регрессию опухоли у 68 % мышей [169].

Обработка клеток *in vitro* ретровирусным вектором, содержащим siРНК, гомологичной мРНК генов *K-ras* и *H-ras,* приводила к полному подавлению роста карциномы поджелудочной железы и 80 %-ному ингибированию развития рака яичников у мышей [163, 164]. Однократная внутриопухолевая инъекция siРНК в составе аденовируса, гомологичная мРНК гена *K-ras*, подавляла развитие рака легких на 45 %,

Таблица 2. Применение препаратов на основе нуклеиновых кислот в экспериментах *in vitro*

Гены-мишени	Препарат	Тип опухоли	Эффект
H-ras/ K-ras	asON	Карцинома шейки матки [161], гепатома [162]	Снижение экспрессии H-ras-люцифераза-мРНК на 98% [161]; ингибирование роста клеток на 87.8%, блокирование перехода в S-фазу клеточного цикла, запуск апоптоза [162]
	Рибозим	Меланома, карцинома глотки, рак мочевого пузыря	Снижение экспрессии *H-ras*; замедление пролиферации опухолевых клеток, повышение уровня их дифференцированности [43–47]
	siРНК	Карцинома яичников, поджелудочной железы [163], легкого [165]	80%-ное снижение уровня белка [165], подавление пролиферативной активности [163,164], изменение режима клеточного цикла, увеличение количества клеток в состоянии апоптоза [163]
c-myc	asON	Лейкемия [170], карцинома молочных желез [171]	50-95%-ное снижение экспрессии гена c-*myc* [170, 171]; полный арест клеточного цикла в фазе G_0/G_1 [172]
	Рибозим	Гепатома	Понижение уровня белка в 1.7 раза, снижение пролиферативной активности в 1.85 раза [173]
	siРНК	Эпидермоидная карцинома, нейробластома [175], карцинома молочных желез и аденокарцинома легких [176]	60-92%-ное снижение мРНК гена, 55-85%-ное ингибирование синтеза белка [175,176]; замедление и остановка деления клеток [175]
PKC-α	asON	Карцинома легких	Снижение уровня мРНК гена *PKC-α* на 90-95% [55]
	Рибозим	Глиобластома [178], карцинома предстательной железы [179]	Снижение уровня белка на 73%, снижение пролиферативной активности на 90% [178]; восстановление чувствительности к цисплатину [179]
Кластерин	asON OGX-001	Карцинома почек	Снижение мРНК кластерина на 64%, увеличение чувствительности клеток к паклитакселу на 80% [59]
IGF-1R	asON	Карцинома мочевого пузыря	Снижение мРНК гена на 74% и белка на 61.3% [207]
bcl-2	asON G3139 (Genasense™, США)	Лимфома [183], лейкемия [68, 69]	Снижение уровня мРНК гена *bcl-2* и белка Bcl-2 на 60-80% и 80-95%, соответственно, 76-90%-ное увеличение гибели клеток в результате индукции апоптоза, увеличение чувствительности к доксорубицину [68, 69, 183]
	Рибозим	Лимфома	Снижение уровня мРНК в 5 раз, белка - в 3 раза, двукратное увеличение количества событий апоптоза [184]
	siРНК	Карцинома шейки матки человека [185] и поджелудочной железы [189]	Подавление синтеза белка Bcl-2 на 90%, индукция апоптоза в 50% клеток [185]; увеличение доли клеток в состоянии апоптоза на 37% [189]
Сурвивин	asON	Злокачественная мезотелиома легких, глиома, карцинома молочных желез, аденокарцинома легких [76], рак щитовидной железы [77]	7-8-кратное увеличение активности каспазы-3, индукция клеточной гибели по механизму апоптоза в 42.5% клеток [76]; снижение уровня мРНК на 75% и белка на 73%, ингибирование клеточной пролиферации на 53%, 11-кратное увеличение доли клеток в состоянии апоптоза [77]
	Рибозим	Меланома [78, 79], карцинома молочных желез [80]	Снижение уровня мРНК и белка на 75 и 74%, повышение чувствительности опухолевых клеток к химиопрепаратам и лучевой терапии, отсутствие эффекта без дополнительного апоптоз-индуцирующего стимула [78–80]
bcr-abl	asON	Хронический миелолейкоз	Полное апоптоз-индуцирующее ингибирование роста клеток [208]
	Максизим	Хронический миелолейкоз	95%-ное снижение уровня мРНК химерного гена, индукция апоптоза, торможение роста опухолевых клеток [85]
	siРНК	Хронический миелолейкоз	Подавление BCR-ABL-ассоциированного роста клеток, увеличение чувствительности опухолевых клеток к иматинибу в 4 раза [87]
	ДНКазим	Хронический миелолейкоз	Подавление экспрессии белка на 40-75% [208]
c-raf	asON	Рак легкого, толстого кишечника, предстательной железы [190, 191], яичников [192, 193]	100%-подавление белка C-raf, 80%-ное ингибирование пролиферации [190–192]; подавление роста клеток различных линий карциномы яичников от 10 до 90% [193]
	siРНК	Рак мочевого пузыря	Снижение количества белка на 37.5% [194]
MDR1, mdr1a/ mdr1b	asON	Аденокарцинома толстого кишечника [211], эпидермоидная карцинома [212]	Полное обращение фенотипа МЛУ, увеличение накопления доксорубицина в клетках в 6.4 раза, их гибель [211, 212]
	siRNA	Эпидермоидная карцинома человека [215], карциномы желудка и поджелудочной железы человека [217], клетки рака яичников [218], лимфосаркома мыши [219]	Снижение уровня мРНК гена *MDR1* на 91% и белка P-гликопротеина на 72-83%, увеличение чувствительности клеток к винбластину [99, 215], дуанорубицину [217] и паклитакселу [218]
	Рибозим	Рак печени	Обращение фенотипа МЛУ, увеличение чувствительности клеток к винкристину [214]
Глутатион	»	Рак толстого кишечника	Увеличение чувствительности опухолевых клеток к химиопрепаратам [101]
DNMT1	asON MG98	Карцинома легких и мочевого пузыря	Восстановление функции *p16*, накопление гипометилированной формы ретинобластомы, ингибирование пролиферации [107]
hTERT	asON	Рак мочевого пузыря [111, 112]	Снижение уровня белка на 97%, увеличение чувствительности клеток к цитостатикам, трехкратное увеличение доли апоптотических клеток, активация каспазы-3 [111, 112]
	Рибозим	Карцинома молочных желез	Сокращение длины теломерного тандема с 5.5 тыс.п.н. до 3.5 тыс.п.н., снижение скорости роста клеток [224]
RRR2	asON GTI-2040 (Genasense™, США)	Карцинома легких, мочевого пузыря, фибросаркома	Практически поное исчезновение мРНК субъединицы R2 [116]
	siРНК	Аденокарцинома поджелудочной железы	Увеличение чувствительности опухолевых клеток к гемцитабину [198]
VEGF, *Flt-1* (VEGFR1), *KDR* (VEGFR2)	asON	Рак молочных желез и мочевого пузыря	Снижение уровня VEGF на 45-83%, снижение клеточной выживаемости [124]
	siРНК	Рак яичников, рак шейки матки, остеосаркома	Снижение экспрессии гена *VEGF* на 33-53% [125]
	Рибозим Ангиозим, Sirna Ther., США	Карцинома лёгких, толстого кишечника и молочных желез	Специфическое расщепление РНК-субстрата, эффективное понижение уровня мРНК в культуре клеток [199]
	ДНКазим	Карцинома молочных желез	Снижение уровня VEGFR-2 на 90%, 34-65%-ное понижение выживаемости клеток за счет индукции апоптоза [200]
neu (HER-2/erbB2)	asON	Карцинома яичников и молочных желез	Аддитивное ингибирование пролиферации опухолевых клеток в сочетании с доксорубицином [205]
	Рибозим Херзим	Карцинома яичников и молочных желез	Снижение уровня мРНК *neu* на 40-60%, ингибирование клеточного роста [131]
eIF4E	asON LY2275796	Неходжкинская лимфома, рак легких, мочевого пузыря, толстого кишечника, предстательной и молочной железы	Снижение белка eIF4E на 80%, снижение уровня белков Bcl-2, сурвивина, циклина D1, C-myc и VEGF, индукция апоптоза [136]
PTN и *ALK*	Рибозим (анти-PTN)	Меланома	Снижение мРНК *PTN* на 75% [140]
	Рибозим (анти-ALK)	Глиобластома	Снижение активности PTN [143]
MMP9	Рибозим	Рак предстательной железы	Полное расщепление мРНК *MMP9* [220]
	siРНК	Детская костная саркома	50%-ное снижение миграции клеток [221]
FGF-BP	Рибозим	Карцинома предстательной железы и толстого кишечника [152, 222]	80%-ная супрессия синтеза белка FGF-BP, замедление пролиферации опухолевых клеток [152, 222]
EGR-1	ДНКазим	Карцинома молочных желез	Понижение уровня белка в 6 раз, блокирование пролиферации, 3-кратное ослабление инвазии опухолевых клеток [157]
FAK	siРНК	Карцинома предстательной и молочных желез	Ингибирование клеточной адгезии, миграции и пролиферации [158]
CXCR4	»	Карцинома молочных желез	Ингибирование миграции и инвазии клеток более чем на 70% [225]

а многократный режим инъекций полностью подавлял рост опухоли у 8 из 10 мышей. При этом апоптотическая активность опухолевых клеток увеличивалась в 2.8 раза [165].

C-MYC

In vitro. Первым кандидатом в препараты, направленные на специфическое подавление протоонкогена *c-myc*, выступил фосфодиэфирный asON, который вызывал 50 %-ное снижение уровня белка в клетках лейкемии и ингибировал их пролиферацию на 50 % после пятидневной инкубации с олигонуклеотидом [170]. Уотсон и соавторы разработали тиофосфатный asON, который продемонстрировал более продолжительное (до 9 дней) и эффективное (75 %) подавление пролиферации клеток карциномы молочных желез и вызывал 95 %-ное ингибирование эстроген-индуцированной гиперэкспрессии гена *c-myc* [171]. Следующим этапом стала замена в структуре анти-*c-myc* asON тиофосфатного остова на морфолино-фосфодиамидатный. Этот олигонуклеотид не только вызывал снижение уровня белка, но и приводил к полному аресту клеточного цикла в фазе G_0/G_1 [172].

Для подавления активности гена *c-myc* был разработан рибозим типа «головки молотка». Трансфекция клеток ретровирусным вектором, содержащим рибозим, приводила к снижению количества белка в клетках гепатомы в 1.7 раза и снижала пролиферативный потенциал клеток в 1.85 раза [173].

Способность подавлять гиперфункцию белка C-myc была оценена и для ген-направленных препаратов на основе siРНК. Было показано, что siРНК вызывает 60–92 %-ное снижение уровня мРНК гена и 55–83 %-ное ингибирование синтеза белка [174, 175]. Подавление экспрессии гена *c-myc* было ассоциировано с 2.5-кратным торможением роста клеток в случае эпидермоидной карциномы человека KB-3-1 и полной остановкой деления в случае нейробластомы SK-N-MC [175]. Для повышения стабильности и облегчения проникновения в клетки был разработан поли-ДНФ-РНК (поли-2-O-(2,4-динитрофенил)-олигорибонуклеотид – poly-DNP-RNA). Этот препарат понижал уровень мРНК гена *c-myc* до 15 % в клетках молочных желез и аденокарциномы легких [176].

In vivo. В экспериментах *in vivo* было показано, что морфолино-олигонуклеотид AVI-4126 (AVIBioPharma, США), разработанный для ингибирования экспрессии гена *c-myc*, вызывает 80 %-ное подавление роста опухоли предстательной железы у атимусных мышей [50]. Сейчас этот препарат находится в фазе II клинических испытаний [52]. В фазе I клинических испытаний AVI-4126 было отмечено отсутствие серьезных побочных эффектов у здоровых людей после однократной внутривенной инъекции AVI-4126 в дозе 90 мг [51]. Параллельно оценивали биоаккумулирование препарата в тканях опухолей предстательной и молочных желез через сутки после введения препарата в дозе 90 мг (анализ проводили после хирургического удаления опухолей у пациентов) [51].

Подавление экспрессии гена *c-myc* с помощью РНКи в преклинических испытаниях выглядит достаточно обнадеживающим. Клетки карциномы молочных желез, трансфецированные плазмидой, содержащей анти-c-myc-siРНК, при трансплантировании мышам не давали развития опухоли [177]. На модели трансгенных мышей с развивающейся лимфомой методом ОТ-ПЦР в реальном времени было зафиксировано снижение экспрессии мРНК гена *c-myc* под действием поли-ДНФ-РНК в плазме крови больных мышей до 15–20 % [176].

PKC-α

In vitro. Для подавления экспрессии гена *PKC*-α Дин с соавторами провели тщательное исследование эффективности 20 тиофосфатных asON и их 2'-O-метильных аналогов [55]. Наиболее результативный олигонуклеотид (известный под коммерческим названием ISIS 3521) способствовал снижению уровня мРНК гена *PKC*-α на 90–95 %, а его 2'-O-метильное производное в тех же концентрациях не оказывало влияния на активность гена *PKC*-α, что указывает на исключительную необходимость в этом случае активности РНКазы H [55].

На модели глиобластомы оценивали ингибирующий потенциал анти-PKC-α рибозима. Было показано, что уровень белка под действием рибозима снижался на 73 %, а пролиферативная активность клеток снижалась на 90 % по сравнению с 50 % при использовании контрольного рибозима [178]. В другом эксперименте рибозим, направленный на нарушение экспрессии PKC-α, восстанавливал чувствительность клеток карциномы предстательной железы к индуцированному цисплатином апоптозу в 2.6–3.2 раза [179].

In vivo. Внутривенные инъекции ISIS 3521 мышам с гетеротрансплантатами трех различных опухолевых моделей (карцинома легких, мочевого пузыря и толстого кишечника) вызывали полное подавление роста опухолей у мышей уже при дозе препарата 0.06–0.6 мг/кг [55]. В фазе I клинических испытаний asON ISIS 3521 при исследовании нескольких различных режимов введения препарата наибольшая токсичность проявлялась в форме тромбоцитопении и усталости [180]. В фазе II клинических испытаний при применении рекомендованной схемы лечения 2 мг/кг/день в течение 3 недель у одного пациента с карциномой яичников был зафиксирован объективный ответ на лечение и у двух пациентов с карциномой яичников наблюдалась регрессия опухолей [181]. Однако при лечении пациентов, страдающих метастатической формой карциномы толстого кишечника, никакого достоверного ответа на лечение не наблюдалось [182].

КЛАСТЕРИН

In vitro. Для подавления экспрессии кластерина был разработан тиофосфатный asON, который ингибировал активность гена на 64 % и увеличивал чувствительность клеток карциномы почки к паклитакселу на 80 % [59].

In vivo. 2'-метоксиэтил-модифицированный тиофосфатный asON OXG-011 в сочетании с паклитакселом вызывал двукратное уменьшение объема карциномы почек у мышей [59]. В фазе I клинических испытаний asON OXG-011 в дозе 640 мг снижал уровень кластерина в опухолевой ткани у человека [60]. На данный момент в фазе II клинических испытаний исследуют потенциал asON OXG-011 в сочетании с химиопрепаратами.

Bcl-2

In vitro. Несомненными лидерами среди ген-направленных олигонуклеотидов, применяемых для лечения онкологи-

ческих заболеваний, являются препараты, направленные против мРНК гена антиапоптотического белка Bcl-2. Китада и соавторы разработали 18-звенный фосфодиэфирный asON, комплементарный первым 6 кодонам открытой рамки считывания в мРНК гена *bcl-2*. Этот олигонуклеотид практически полностью останавливал синтез белка Bcl-2 в клетках лимфомы [183]. Рид и коллеги провели сравнение ингибирующего действия фосфодиэфирного и тиофосфатного олигонуклеотидов, комплементарных мРНК *bcl-2*, на рост клеток лейкемии, гиперэкспрессирующих этот ген [68]. Было показано, что ингибирующий эффект фосфодиэфирного asON детектируется приблизительно вдвое раньше, чем действие тиофосфатного аналога. Однако последний более эффективно подавляет рост раковых клеток: тиофосфатный asON достигает эффекта фосфодиэфирного asON в пяти-десятикратно сниженной концентрации [68]. Далее было показано, что 80–95 %-ное снижение синтеза белка Bcl-2 под действием тиофосфатного asON увеличивает гибель клеток в результате индукции апоптоза и чувствительность клеток к доксорубицину [69].

Луци с соавторами [184] разработали химически модифицированный рибозим, направленный к мРНК гена *bcl-2*. Липотрансфекция такого препарата в клетки лимфомы человека Раджи (Raji) приводила к пятикратному снижению уровня мРНК гена *bcl-2* и трехкратному снижению количества белка, что сопровождалось достоверным увеличением доли клеток, находящихся в состоянии апоптоза [184].

Фу с соавторами использовали siРНК, направленную к мРНК гена *bcl-2*. Под действием специфической siРНК происходило подавление синтеза белка Bcl-2 на 90 % в клетках рака шейки матки HelaB2 и BGC-823, что способствовало индукции апоптоза [185].

In vivo. Снижение уровня белка Bcl-2 под действием asON, названного G3139, адресованного к мРНК гена, способствовало подавлению онкогенного потенциала клеток лимфомы и полному блокированию роста опухолей у мышей [186]. Применение G3139 в комбинации с цисплатином увеличивало противоопухолевый потенциал химиопрепарата на 70 % [187].

Недавно Моррис и соавторы [188] сообщили о результатах первой фазы клинических испытаний 18-звенного тиофосфатного asON G3139 (Genasense™, США), комплементарного первым 6 кодонам открытой рамки считывания гена *bcl-2*. Показано, что через 7 сут после ежедневного внутривенного введения препарата в дозе 6.9 мг/кг у больных неходжкинской лимфомой отмечались незначительные побочные эффекты, такие как утомляемость и обратимое повышение уровня трансглютаминаз в сыворотке крови. Подкожное введение препарата вызывало выраженную стабилизацию опухолевого процесса у 9 из 21 больного неходжкинской лимфомой и повышение качества жизни у 3 больных (общий объективный ответ у 57 % пациентов). В сентябре 2000 г. открыта фаза III клинических испытаний asON G3139 у больных с хроническим лимфолейкозом и острым миелолейкозом [70]. Продолжаются клинические испытания препарата в комбинациях с химиопрепаратами у больных с меланомой и карциномой предстательной железы, резистентных к гормонотерапии [71, 72]. В феврале 2001 года в 65 онкологических центрах США, Канады и Великобритании была начата фаза III клинических испытаний этого препарата у больных с множественной миеломой.

У мышей-опухоленосителей, получавших лечение bcl-2 siРНК, наблюдалось торможение роста опухоли печени на 66.5 % [185]. У мышей с гетеротрансплантатами опухолей поджелудочной железы отмечалось снижение объема опухолей на 56 % [189].

Raf-1

In vitro. Для подавления активности белка Raf-1 был разработан 20-звенный тиофосфатный asON ISIS 5132, направленный к 3′-нетранслируемому району мРНК гена *c-raf*. Этот олигонуклеотид эффективно ингибировал экспрессию мРНК *c-raf* и снижал количество белка в клетках карциномы легких, толстого кишечника и предстательной железы [190]. Введение 2’-метоксиэтил модификации в структуру олигонуклеотида (asON ISIS 13650), направленного на подавление экспрессии гена *c-raf*, незначительно увеличивало ингибирующий потенциал препарата [191]. В клетках карциномы яичников ISIS 5132 и ISIS 13650 вызывали 100 %-ное подавление белка Raf-1 и 80 %-ное ингибирование пролиферации клеток [192]. Далее потенциал анти-*c-raf* asON ISIS 5132 и ISIS 13650 оценивали на 15 линиях клеток карциномы яичников. Эффективность подавления роста клеток варьировала от 10 до 90 %. Ингибирование роста сопровождалось апоптозом и накоплением клеток в G_2/M и S фазах [193].

При сравнении эффективности подавления экспрессии гена *c-raf* с помощью asON и siРНК, адресованных в один и тот же участок последовательности мРНК, было установлено, что в концентрации 125 нМ олигонуклеотид вызывал снижение белка Raf-1 на 52.4 %, тогда как siРНК лишь на 37.5 % [194].

In vivo. Олигонуклеотид ISIS 5132 проявлял значительный противоопухолевый эффект на мышах с гетеротрансплантатами клеток карциномы яичников [192]. Результаты, полученные в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, позволили перевести исследования противоопухолевой активности ISIS 5132 в клиническую практику. В фазе I клинических испытаний было показано, что препарат достаточно хорошо переносится пациентами, и лишь в некоторых случаях наблюдается кратковременная тромбоцитопения [195]. Была разработана малотоксичная схема лечения: медленное внутривенное введение препарата в дозе 2 мг/кг/день курсом в 21 день с перерывом между курсами в 1 неделю [195]. В фазе II клинических испытаний применение подобранной схемы для лечения пациентов с раком предстательной железы [92], яичников [93] и аденокарциномы толстого кишечника [94] продемонстрировало стабилизацию заболевания приблизительно в 25 % случаев.

DNMT1

In vitro. Для специфического ингибирования фермента ДНК-метилтрансферазы DNMT1 в раковых клетках был разработан 2’-О-метильный тиофосфатный asON MG98. Было показано, что подавление экспрессии DNMT1 под действием asON приводит к деметилированию промотора гена *p16*, восстановлению его активности, накоплению гипометилированной формы гена ретинобластомы и ингибированию пролиферации раковых клеток [107].

In vivo. В экспериментах *in vivo* asON MG98 вызывал существенное замедление роста и регрессию гетеротрансплантатов карциномы кишечника и немелкоклеточного рака легких. Успешные преклинические исследования обеспечили применение MG98 в клинических испытаниях [196]. Фаза I клинических испытаний была направлена на исследование токсичности и фармакологического профиля asON MG98. Внутривенное введение препарата пациентам с различными солидными опухолями в дозе 80 мг/м^2/день в течение 21 дня каждые 4 недели оказалось сравнительно безопасным [196]. Однако какого-либо видимого противоопухолевого эффекта отмечено не было. Более высокие дозы препарата, вводимые по предложенной схеме, плохо переносились пациентами [196, 197]. В фазе II клинических испытаний проводили тестирование усовершенствованной схемы введения препарата пациентам с метастатической почечной карциномой: 360 мг/м^2 дважды в неделю в течение 3 недель [108]. Однако лечение по такой схеме также не дало положительной реакции у пациентов. Исследователи объясняют неудачу неподходящим выбором типа онкологического заболевания [108].

RRR2

In vitro. Исследование тиофосфатного asON GTI-2040, мишенью для которого является мРНК RRR2, показало, что под действием олигонуклеотида мРНК RRR2 практически полностью исчезает в клетках карциномы легких человека и существенно снижается в клетках мочевого пузыря человека и в клетках фибросаркомы мышей [116].

Даксбери с соавторами исследовали способность siРНК увеличивать чувствительность аденокарциномы поджелудочной железы человека, имплантированной мышам, к гемцитабину, подавляя экспрессию субъединицы RRR2. Специфические молекулы siРНК, адресованные к мРНК гена RRR2, существенно повышали гемцитабин-индуцированную цитотоксичность [198].

In vivo. В экспериментах *in vivo* анти-RRR2 siРНК в комбинации с гемцитабином продемонстрировала синергическое противоопухолевое и антиметастатическое действие [198].

Ингибирующий потенциал GTI-2040 был исследован в экспериментах на животных. GTI-2040 подавлял рост опухолей во всех экспериментальных моделях, а максимальный эффект наблюдался на модели карциномы почек, когда отмечалась 95–98 %-ная регрессия опухоли [116]. Исследование asON GTI-2040 в фазе I клинических исследований показало, что рекомендуемой схемой лечения является ежедневное введение препарата в дозе 185 мг/м^2/день в течение 21 дня каждые 4 недели. При подобном способе монотерапии каких-либо серьезных побочных эффектов не наблюдалось [117].

VEGF

In vitro. В экспериментах *in vitro* было показано, что тиофосфатный asON, направленный к мРНК гена *VEGF*, способен подавлять синтез белка на 45–83 % в клеточных линиях рака молочных желез и мочевого пузыря [124].

В качестве эффективного ингибитора экспрессии VEGF была оценена и стратегия РНКи. Векторная доставка siРНК в опухолевые клетки приводила к продолжительному подавлению синтеза VEGF на 33–53 % [125].

Для терапевтического вмешательства в патологический ангиогенез был предложен альтернативный подход, который заключался в выборе в качестве мишени не VEGF непосредственно, а рецепторов VEGFR-1 и VEGFR-2. С этой целью были разработаны рибозимы, комплементарные последовательности мРНК гена *Flt-1*, кодирующего VEGFR-1 и мРНК гена *KDR*, кодирующего VEGFR-2 [199]. Было показано, что эти препараты специфически расщепляют РНК-субстраты *in vitro* и эффективно понижают уровень мРНК в культуре клеток.

Сейчас появляются работы по исследованию ингибирующего действия ДНКазимов на работу рецептора VEGFR-2. Чанг и соавторы продемонстрировали 90 %-ное снижение уровня белка VEGFR-2 и 34–65 % -ное понижение выживаемости клеток карциномы молочных желез за счет индукции апоптоза [200].

In vivo. В экспериментах *in vivo* было показано, что ингибирование VEGF с помощью тиофосфатного asON приводило к пятикратному торможению темпов роста карциномы почек у мышей [201].

Для увеличения продолжительности биологического действия и улучшения проникновения в опухолевые клетки были разработаны модифицированные siРНК, направленные на подавление VEGF: внутриопухолевое введение конъюгата холестерин олигоаргинин-siРНК приводило к десятикратному замедлению роста аденокарциномы толстого кишечника [202], а комплекса siРНК с водорастворимым липополимером – к полуторакратному торможению темпов роста аденокарциномы предстательной железы [203]. При этом наблюдалось значительное снижение васкуляризации опухолей и долговременное подавление экспрессии VEGF.

В ходе преклинических испытаний рибозим, мишенью которого является мРНК *Flt-1*, оказывал противоопухолевый, антиангиогенный и антиметастатический эффект на модели метастазирующего рака легких [199]. Мышам с трансплантированной карциномой легких Льюис хирургически имплантировал минипомпы, содержащие рибозим, таким образом, что животные получали препарат в дозах 12–100 мг/кг/день. Через 18 дней минипомпы извлекали и заменяли на новые. В результате лечения отмечалась 92 %-ная регрессия опухолей и снижение количества метастазов в легких на 70–80 % [199]. А у мышей с трансплантированной карциномой кишечника количество метастазов в печени под действием анти-Flt-1 рибозима снижалось втрое [199]. Этот рибозим получил название ангиозим (Angiozyme, Ribozyme Pharmaceuticals, США) и сейчас проходит клинические испытания фазы I и II с участием пациентов с различными типами опухолей. В фазе I клинических испытаний, завершенных в июне 2001 года, отмечалась хорошая переносимость препарата и стабилизация заболевания у 25 % пациентов [204]. Фаза II клинических испытаний этого препарата у больных со злокачественными опухолями толстого кишечника и молочных желез нацелена на исследование как монотерапии ангиозимом, так и комбинированной терапии в сочетании с использованием традиционных химиопрепаратов [35]. Было показано, что ангиозим снижал сывороточный уровень растворимого VEGFR-1, однако клинического ответа подтверждено не было. Эти данные подчеркивают важность

проведения комбинированной терапии с использованием ген-направленных веществ и стандартных химиопрепаратов. Обнадеживающие результаты были получены в исследованиях, проводимых с участием пациентов, страдающих раком толстого кишечника: одновременное применение ангиозима с режимом Saltz (комбинации болюсного введения 5-фторурацила, лейковорина и иринотекана) приводило к прогрессии заболевания лишь в 12.5 % случаев по сравнению с 25 % случаев при лечении только химиотерапией [35].

Многообещающие результаты получены при исследовании в условиях *in vivo* ДНКазима, комплементарного мРНК гена *KDR*, кодирующего VEGFR-2. При четырехкратном введении мышам ДНКазима, направленного на инактивацию VEGFR2, отмечалась 75 %-ная регрессия опухоли молочных желез [200]. Антиангиогенное действие ДНКазима способствовало сокращению васкуляризации опухолевой ткани и тем самым стимулировало клеточную гибель в периферических слоях опухоли.

neu/HER-2 (ErbB-2)

In vitro. Был создан asON, комплементарный онкогену HER-2/*neu*, и исследовано антисенс-опосредованное подавление экспрессии HER-2 для повышения противоопухолевой эффективности традиционной химиотерапии. В сочетании с доксорубицином asON аддитивно подавлял пролиферацию опухолевых клеток [205].

Рибозим, комплементарный мРНК гена *neu*, в составе экспрессирующей плазмидной конструкции эффективно расщеплял РНК-субстрат *in vitro*, а трансфекция клеток карциномы яичников таким препаратом приводила к 50 %-ному подавлению экспрессии гена и 39–42 %-ному снижению белка HER-2 [131].

In vivo. asON, адресованный к мРНК гена *neu*, совместно с доксорубицином вызывал синергическое противоопухолевое действие [205].

В условиях *in vivo* оценивали эффективность ингибирования активности HER-2 с помощью инъекций рекомбинантного аденовируса, кодирующего специфический рибозим [206]. Через 3 дня после внутриопухолевой инъекции в подкожно привитые гетеротрансплантаты карциномы молочных желез в опухолевой ткани наблюдали снижение мРНК гена *neu* на 59 %. Лечение мышей с такими опухолями еженедельными инъекциями в течение 5 недель приводило к 89 %-ной регрессии опухолей [206]. Предварительные результаты фазы I клинических испытаний с участием пациентов с трудноизлечимыми случаями рака молочных желез рибозим, направленный на подавление синтеза HER-2, названный херзимом (Herzyme, Ribozyme Pharmaceuticals, США), показали стабилизацию заболевания, однако при отсутствии какого-либо частичного или полного положительного ответа пациентов на препарат [132].

ДРУГИЕ ГЕНЫ-МИШЕНИ

Для ингибирования активности IGF-1R был разработан asON, который вызывал митоцин-индуцированную гибель клеток карциномы мочевого пузыря *in vitro* [207], а предварительная инкубация клеток меланомы с этим олигонуклеотидом полностью препятствовала развитию опухолей у мышей [64].

Обработка опухолевых клеток asON, направленных против сурвивина, способствовала увеличению доли клеток в состоянии апоптоза [76, 77], а применение анти-сурвивин рибозимов повышало чувствительность опухолевых клеток к радио- и химиотерапии [79–80].

В экспериментах *in vitro* была продемонстрирована эффективность препаратов на основе asON, siРНК, рибозимов и ДНКазимов специфически подавлять экспрессию химерного белка BCR-ABL [84, 85, 87, 208, 209]. В экспериментах *in vivo* наиболее успешным оказался тиофосфатный asON, комплементарный мРНК гена *BCR-ABL*, внутривенные инъекции которого вдвое увеличивали продолжительность жизни мышей с развивающейся лейкемией [210].

Для подавления экспрессии гена *MDR1* и повышения чувствительности клеток к цитостатикам были разработаны asON [211, 212] конъюгат asON с доксорубицином [213], рибозим [214] и siРНК, направленные в различные районы последовательности мРНК гена [215–218]. Было установлено, что эти препараты с высокой степенью эффективности увеличивали или восстанавливали чувствительность опухолевых клеток *in vitro* к доксорубицину [211, 213], винбластину [215], винкристину [214], дуанорубицину [217] и паклитакселу [218]. *In vivo* при подкожной трансплантации мышам клеток аденокарциномы толстого кишечника, экспрессирующих анти-MDR1 рибозим, и последующего лечения доксорубицином наблюдалась практически полная регрессия роста гетеротрансплантатов [98]. Наши эксперименты показали, что анти-mdr1b siРНК эффективно подавляет экспрессию гена *mdr1b* в клетках высокорезистентной к химиопрепаратам лимфосаркомы RLS_{40} [219] и в комбинации с химиотерапией избирательно стимулирует их гибель *in vitro*, а применение сочетания циклофосфамида и анти-mdr1b siРНК *in vivo* приводит к практически полной регрессии лимфосаркомы RLS_{40} у мышей и повышает эффективность терапии циклофосфамидом более чем в 3 раза по сравнению с использованием единственно химиопрепарата [99].

Для преодоления МЛУ, опосредованной системой глутатиона, был разработан рибозим, адресованный к мРНК гена γ-глутамилцистеин синтетазы. Этот препарат увеличивал чувствительность раковых клеток толстого кишечника к цисплатину, доксорубицину и этопозиду в 1.8, 4.9 и 1.5 раз [101].

Для преодоления hTERT-опосредованной бессмертности раковых клеток были разработаны различные химически модифицированные asON, направленные к мРНК гена *hTERT*, такие как PNA, 2'-O-метильный asON, (2-5A) asON, содержащий 2'5'-олигоаденилат [111, 112]. 2'-O-метильный asON и (2-5A) asON оказались наиболее успешными и вызывали более чем 90 %-ную гибель опухолевых клеток *in vitro* [111, 112], а ежедневное внутриопухолевое введение (2–5 А) asON в течение 14 дней вызывало более чем 50 %-ную регрессию подкожно трансплантированной глиомы [112].

Трансфекция клеток asON против eIF4E снижала уровень не только самого фактора (на 80 %), но и других опухоль-ассоциированных белков, таких как Bcl-2, сурвивин, циклин D1, C-myc и VEGF [136]. Внутривенное введение анти-eIF4E asON мышам-опухоленосителям приводило к десятикратной регрессии опухоли при отсутствии

токсического влияния asON на здоровые ткани и органы животных [136].

Для подавления аномальной экспрессии PTN были предложены рибозимы. В экспериментах *in vivo* было показано, что анти-PTN рибозимы вызывали замедление роста опухолей меланомы у мышей более чем на 65 % и ингибировали ангиогенез на 70–85 % [140]. Более того, непрямое ингибирование сигнального пути PTN посредством рибозимов, направленных к мРНК гена ALK, являющейся рецептором тирозинкиназы для PTN, приводило к замедлению роста опухолей на 50–95 % и к двукратному увеличению средней продолжительности жизни мышей с трансплантатами глиобластомы [143].

Подавление функции металлопротеиназ под действием рибозимов приводило не к полной гибели опухоли, а к ограничению ее роста, подавлению ангиогенеза и метастазирования [147, 220, 221].

Опосредованная рибозимом 80 %-ная супрессия синтеза белка FGF-BP способствовала торможению пролиферации клеток карциномы предстательной железы и толстого кишечника [152, 222]. При подкожной трансплантации мышам клеток карциномы предстательной железы, трансфецированных анти-FGF-BP рибозимом, развития опухолей не наблюдалось [152].

Для подавления активности EGR-1 был создан ДНКазим, адресованный к мРНК транскрипционного фактора EGR-1. Внутриопухолевые инъекции этого препарата вызывали трехкратное уменьшение размеров опухолей [157].

Для подавления гиперфункции FAK в клетках предстательной и молочных желез человека была создана siРНК. Трансфекция клеток разработанной siРНК вызывала ингибирование клеточной адгезии, миграции и пролиферации клеток *in vitro*, а *in vivo* способствовала подавлению роста опухолей у мышей [158].

В экспериментах *in vivo* внутривенные инъекции анти-CXCR4 siРНК не только приводили к снижению уровня мРНК *CXCR4* в пульмонарной ткани до 10 %, практически полностью блокировали метастазирование опухоли в легкие [159], но и подавляли рост первичных опухолей [223].

Стратегия борьбы с онкологическими заболеваниями с помощью препаратов на основе нуклеиновых кислот является одной из перспективных и быстроразвивающихся областей молекулярной онкологии. 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 стоит отметить, что, несмотря на общий механизм действия ген-направленных олигонуклеотидов, заключающийся в «выключении» гена-мишени, эффективность препаратов, направленных на подавление экспрессии одного и того же гена или, более того, гомологичных одному и тому же району мРНК-мишени, может значительно различаться.

Некоторые коммерческие компании уже предприняли попытки разработки и выпуска противоопухолевых препаратов на основе ген-направленных олигонуклеотидов, в частности asON и рибозимов, являющихся заслуженными родоначальниками ген-направленного терапевтического подхода. Как видно из табл. 3, наиболее восприимчивыми к действию asON оказались гены, участвующие в усилении пролиферации и блокировке апоптоза опухолевых клеток, а такие гены-мишени, как *Flt-1* (VEGFR) и *neu* (HER-2), являются более чувствительными к действию рибозимов. asON, направленные на подавление экспрессии генов *H-ras*, *c-myc*, *PKC*-α, кластерина, *bcl-2*, *c-raf,* и рибозимы, разрушающие мРНК генов *Flt-1* и *neu*, в настоящее время находятся в клинических испытаниях. 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. Препараты на основе siРНК для лечения пациентов с возрастной дистрофией сетчатки глаза уже находятся в клинических испытаниях. Однако в качестве противораковых средств малые интерферирующие РНК в клинические испытания пока не введены.

Несмотря на безусловные достижения современной онкологии, проблема повышения эффективности методов воздействия на злокачественные новообразования по-прежнему остается крайне актуальной. Одной из основных задач ген-направленной терапии, которую следует особо отметить, является обеспечение доставки препаратов к клеткам-мишеням, что предполагает транспорт к определенным тканям или органам, пересечение плазматической мембраны и проникновение в определенные компартменты внутри клетки. Очевидно, что олигонуклеотиды сами по себе не обладают этими способностями, в связи с чем разработка транспортных систем, позволяющих повысить эффективность действия этих препаратов, является крайне актуальной. Проблема транспорта интересующей исследователя последовательности РНК или ДНК в опухолевую клетку до сих пор остается нерешенной.

Как уже отмечалось, ключевую роль в онкогенезе играют изменения в экспрессии определенных генов, дисфункция которых приводит к нарушениям регуляции сигнальных путей, контролирующих смену фаз клеточного цикла, пролиферацию, апоптоз, генетическую стабильность, дифференцировку и морфогенетические реакции клетки. Эти процессы в клетке тесно взаимосвязаны и зачастую взаимозаменяемы. В ряде ситуаций с помощью препаратов на основе нуклеиновых кислот, воздействуя на конкретный механизм, удается блокировать то или иное звено регуляции злокачественного роста. Однако не стоит забывать, что важнейшей особенностью онкологических заболеваний является развертывание каскадов регуляции выживаемости клетки, которые позволяют ей ускользать от ген-направленного молекулярного контроля. Приведенное соображение нисколько не умаляет значимости терапии опухолей с использованием препаратов на основе нуклеиновых кислот, ориентированных на конкретный механизм. Однако гибкость, динамичность молекулярного профиля и надежность регулирования функций, важных для выживания опухолевой клетки, требуют дальнейшей многоэтапной оптимизации ген-направленной противоопухолевой терапии. ●

Таблица 3. Применение препаратов на основе нуклеиновых кислот в исследованиях *in vivo*

РНК-мишень	Препарат	Тип опухоли	Эффект	Стадия исследования
H-ras/ K-ras	asON ISIS 2503	Гепатоцеллюлярная карцинома [162, 166]	Снижение веса опухоли у мышей, подавление процессов метастазирования [162, 166]. Низкая токсичность для пациентов, оптимизация схемы лечения [48, 168], совместно с гемцитабином положительный ответ у 10% пациентов, среди них один полный ответ и 4 частичных [48]	II фаза
	Рибозим	Карцинома глотки, поджелудочной железы, мочевого пузыря, меланома	Подавление роста опухоли у мышей в результате увеличения доли опухолевых клеток в состоянии апоптоза, снижение инвазивного потенциала опухоли, увеличение продолжительности жизни животных [43–45, 169]	*In vivo*
	siРНК	Карцинома поджелудочной железы и яичников [163, 164], рак легких [165]	Ингибирование роста опухолей [163–165]	*In vivo*
c-myc	asON AVI-4126 (AVIBioPharma, США)	Рак предстательной и молочных желез [50, 51]	Подавление роста опухоли на 80 % у мышей [50] Умеренная токсичность для пациентов, накопление препарата в опухолевой ткани [51]	II фаза
	siРНК	Карцинома молочных желез [177], лимфома [176]	Препятствие развития опухоли [177]; снижение уровня мРНК *c-myc* в плазме до 15-20% [176]	*In vivo*
PKC-α	asON ISIS 3521 (Affinitak™, США)	Карцинома мочевого пузыря, рак легких, толстого кишечника [55], рак яичников [181], карцинома толстого кишечника [182]	Полное подавление роста опухолей у мышей при дозе ISIS 3521 0.06-0.6 мг/кг [55]. Умеренная токсичность в клинике [180]; 3 объективных ответа на лечение [181]; отсутствие ответа на лечение [182]	II фаза
Кластерин	asON OGX-001	Карцинома почек [59], рак предстательной железы [60]	В сочетании с паклитакселом двукратное уменьшение объема опухолей у мышей [62]. Снижение уровня кластерина в патологических тканях у пациентов [60]	I/II фаза
IGF-1R	asON	Меланома	Трансфецированные asON клетки полностью препятствовали развитию опухолей [64]	*Ex vivo*
bcl-2	asON G3139 (Genasense™, США)	Лимфомы, лимфолейкозы, миелолейкозы [186, 187], меланома [71], лимфомы [188], лимфолейкоз [70], карцинома предстательной железы [72]	Снижение объема опухолей у мышей [186], аддитивное противоопухолевое действие asON G3139 и цисплатина [187]. Умеренная токсичность препарата в клинике, стабилизация опухолевого процесса у пациентов, улучшение качества жизни [188]	III фаза
	siРНК	Мышиные опухолевые клетки печени H22 [185], рак поджелудочной железы [189]	Торможение роста опухоли печени у мышей на 66.5% [185]; снижение объема гетеротрасплантатов опухолей поджелудочной железы на 56% [189]	*In vivo*
bcr-abl	asON	Хронический миелолейкоз	Увеличение средней продолжительности жизни мышей в 2 раза [210]	*In vivo*
c-raf	asON ISIS 5132 (Neopharm, США)	Рак яичников [93, 192] и предстательной железы [92], аденокарцинома толстого кишечника [94]	Подавление роста опухолей у мышей [192]. Умеренная токсичность препарата в клинике [195], стабилизация заболевания более чем в 25% случаев [92, 93]	II фаза
MDR1, mdr1a/ mdr1b	Рибозим	Аденокарцинома толстого кишечника	Практически полная регрессия опухоли у мышей в эксперименте *ex vivo* в комбинации с доксорубицином [98]	*Ex vivo*
	siРНК	лимфосаркома мыши [99, 219]	Практически полная регрессия опухоли у мышей в эксперименте *in vivo* в комбинации с циклофосфамидом [102]	*In vivo*
DNMT1	asON MG98	Немелкоклеточный рак легкого, карцинома толстого кишечника, метастатическая почечная карцинома и другие солидные опухоли [108, 196, 197]	Регрессия опухолей у мышей линии nude [196]. Отсутствие серьезных побочных эффектов, отсутствие клинического ответа у пациентов [108,196, 197]	II фаза
hTERT	asON	Глиома	Более чем 50%-ная регрессия опухоли [112]	*In vivo*
RRR2	asON GTI-2040 (Genasense™, США)	Солидные опухоли	Ингибирование роста опухолей во всех исследованных экспериментальных моделях, максимальный эффект при карциноме почек – 95-98%-ная регрессия [116]. Отсутствие серьезных побочных эффектов, оптимизация схемы лечения [117]	II фаза
	siРНК	Аденокарцинома поджелудочной железы	Синергическая цитотоксичность siРНК и гемцитабина [198]	*In vivo*
VEGF, *Flt-1* (VEGFR1), *KDR* (VEGFR2)	asON	Карцинома почек	5-кратная регрессия опухоли [201]	*In vivo*
	siРНК	Аденокарцинома толстого кишечника и предстательной железы [202, 203]	10-кратное замедление роста аденокарциномы толстого кишечника [202] и 1.5-кратное ингибирование карциномы предстательной железы [203], подавление васкуляризации опухолей [202, 203]	*In vivo*
	Рибозим Ангиозим, Sirna Ther., США	Карцинома легких [199], рак толстого кишечника [35, 204], рак молочных желез [35]	Регрессия роста карциномы легких Льюис у мышей на 92%, 70-80%-ное снижение количества метастазов в легких [199]. Хорошая переносимость препарата пациентами, снижение уровня VEGFR-1 в опухолевых клетках, стабилизация заболевания у 25% больных [35, 204]	II фаза
	ДНКазим	Карцинома молочных желез	Регрессия опухоли на 75% у мышей, сокращение плотности сосудов в опухолях, гибель периферических слоев опухоли [200]	*In vivo*
neu (HER-2/erbB2)	asON	Рак яичников и молочных желез	Совместно с доксорубицином синергическое противоопухолевое действие [205]	*In vivo*
	Рибозим Херзим	Карцинома молочных желез	Регрессия опухолей у мышей на 89% [206]. Хорошая переносимость препарата пациентами, стабилизация заболевания [132]	I фаза
eIF4E	asON LY2275796	Карцинома предстательной железы	10-кратная регрессия опухоли, отсутствие токсического эффекта на здоровые органы и ткани у мышей [136]	
PTN и *ALK*	Рибозим (анти-PTN)	Меланома	Уменьшение размеров опухолей на 65%, ингибирование васкуляризации на 70-85%, индукция апоптоза [140]	*In vivo*
	Рибозим (анти-ALK)	Глиобластома	Замедление роста опухоли, двукратное увеличение продолжительности жизни мышей-опухоленосителей [143]	*In vivo*
MMP9	Рибозим	Метастатические фибробласты [220], рак предстательной железы [147]	8-кратное снижение метастазирования, увеличение средней продолжительности жизни мышей на $^1/_3$, отсутствие влияния на развитие первичной опухоли [147, 220]	*Ex vivo*
FGF-BP	Рибозим	Карцинома предстательной железы	Угнетение развития опухоли [152]	*Ex vivo*
EGR-1	ДНКазим	Карцинома молочных желез	Трехкратное подавление роста опухоли [157]	*In vivo*
FAK	siРНК	Карцинома предстательной и молочных желез	Регрессия опухолей [158]	*In vivo*
CXCR4	siРНК	Карцинома молочных желез	Практически полное ингибирование метастазирования, снижение уровня мРНК *CXCR4* до 10% [159], регрессия опухоли [223]	*In vivo*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Belikova A.M., Zarytova V.F., Grineva N.I. // Tetrahedron Letters. 1967. № 37. P. 3557–3562.
2. Гринёва Н.И., Карпова Г.Г. // Молекулярная биология. 1974. Т. 8. С. 832–844.
3. Гринёва Н.И., Карпова Г.Г., Кузнецова Л.М. и др. // Молекулярная биология. 1976. Т. 10. С. 1260–1271.
4. Zamecnik P.C., Stephenson M.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 1. P. 280–284.
5. Falvey A.K., Kantor J.A., Robert-Guroff M.G. et al. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. № 22. P. 7049–7056.
6. Lee L.K., Roth C.M. // Curr. Opin. Biotechnol. 2003. V. 14. № 5. P. 505–511.
7. Helene C., Toulme J.J. // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1049. № 2. P. 99–125.
8. Boiziau C., Tarrago-Litvak L., Sinha N.D. et al. // Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 1996. V. 6. № 2. P. 103–109.
9. Zelphati O., Imbach J. L., Signoret N. et al. // Nucleic Acids Res. 1994. V. 22. № 20. P. 4307–4314.
10. Jason T.L., Koropatnick J., Berg R.W. // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2004. V. 201. № 1. P. 66–83.
11. Kurreck J. // Eur. J. Biochem. 2003. V. 270. № 8. P. 1628–1644.
12. Pirollo K.F., Rait A., Sleer L.S., Chang E.H. // Pharmacol. Ther. 2003. V. 99. № 1. P. 55–77.
13. Stahel R.A., Zangemeister-Wittke U. // Lung Cancer. 2003. V. 41. P. 81–88.
14. Tafech A., Bassett T., Sparanese D. et al. // Curr. Med. Chem. 2006. V. 13. № 8. P. 863–881.
15. Matsukura M., Shinozuka K., Zon G. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 21. P. 7706–7710.
16. Brown D.A., Kang S.H., Gryaznov S.M. et al. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. № 43. P. 26801–26805.
17. Guvakova M.A., Yakubov L.A., Vlodavsky I. et al. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. № 6. P. 2620–2627.
18. Zamaratski E., Pradeepkumar P.I., Chattopadhyaya J. // J. Biochem. Biophys. Methods. 2001. V. 48. № 3. P. 189–208.
19. Nielsen P.E., Egholm M., Berg R.H. et al. // Science. 1991. V. 254. № 5037. P. 1497–100.
20. Larsen H.J., Bentin T., Nielsen P.E. // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1489. № 1. P. 159–166.
21. Elayadi A.N., Corey D.R. // Curr. Opin. Investig. Drugs. 2001. V. 2. № 4. P. 558–561.
22. Gryznov S.M., Lloyd D.H., Chen J.K. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. № 13. P. 5798–5802.
23. Heasman J. // Dev. Biol. 2002. V. 243. № 2. P. 209–214.
24. Nasevicius A., Ekker S.C. // Nat. Genet. 2000. V. 26. № 2. P. 216–220.
25. Koshkin A.A., Wengel J. // J. Org. Chem. 1998. V. 63. № 8. P. 2778–2781.
26. Obika S., Morio K., Hari Y. et al. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1999. V. 9. № 4. P. 515–518.
27. Wahkestedt C., Salmi P., Good L. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 10. P. 5633–5638.
28. Fire A., Xu S., Montgomery M K. et al. // Nature. 1998. V. 391. № 6669. P. 806–811.
29. Downward J. // Brit. Med. J. 2004. V. 328. № 7450. P. 1245–1248.
30. Lingel A., Izaurralde E. // RNA. 2004. V. 10. № 11. P. 1675–1679.
31. Leung R.K., Whittaker P.A. // Pharmacol. Ther. 2005. V. 107. № 2. P. 222–239.
32. Rand T.A., Ginalski K., Grishin N.V. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. № 40. P. 14385–14389.
33. Hannon G.J., Rossi J.J. // Nature. 2004. V. 431. № 7006. P. 371–378.
34. Kruger K., Grabowski P.J., Zaug A.J. et al. // Cell. 1982. V. 31. № 1. P. 147–157.
35. Bagheri S., Kashani-Sabet M. // Curr. Mol. Med. 2004. V. 4. № 5. P. 489–506.
36. Schubert S., Kurreck J. // Curr. Drug Targets. 2004. V. 5. № 8. P. 667–681.
37. Kore A.R., Vaish N.K., Kutzke U. et al. // Nucleic Acids Res. 1998. V. 26. № 18. P. 4116–4120.
38. Ferré-D'Amaré A.R. // Biopolymers. 2004. V. 73. № 1. P. 71–78.
39. Santoro S.W., Joyce G.F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. № 9. P. 4262–4266.
40. Копнин Б.П. // Биохиимия. 2000. Т. 65. № 1. С. 5–33.
41. Barbacid M. // Annu. Rev. Biochem. 1987. V. 56. P. 779–827.
42. Campbell S.L., Khosravi-Far R., Rossman K.L. et al. // Oncogene. 1998. V. 17. № 11. P. 1395–1413.
43. Wang C.H., Tsai L.J., Tsao Y.P. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. V. 298. № 5. P. 805–814.
44. Tone T., Kashani-Sabet M., Funato T. et al. // In Vivo. 1993. V. 7. № 6A. P. 471–476.
45. Kashani-Sabet M., Funato T., Tone T. et al. // Antisense Res. Dev. 1992. V. 2. № 1. P. 3–15.
46. Ohta Y., Kijima H., Ohkawa T. et al. // Nucleic Acids Res. 1996. V. 24. № 5. P. 938–942.
47. Ohta Y., Kijima H., Kashani-Sabet M., Scanlon K.J. // J. Invest. Dermatol. 1996. V. 106. № 2. P. 275–280.
48. Alberts S.R., Schroeder M., Erlichman C. et al. // J. Clin. Oncol. 2004. V. 22. № 24. P. 4944–4950.
49. Bishop J.M. // Adv. Cancer Res. 1982. № 37. P. 1–32.
50. Iversen P.L., Arora V., Acker A.J. et al. // Clin. Cancer Res. 2003. V. 9. P. 2510–2519.
51. Devi G.R., Beer T.M., Corless C.L. et al. // Clin. Cancer Res. 2005. V. 11. № 10. P. 3930–3938.
52. Kipshidze N., Iversen P., Overlie P. et al. // Cardiovasc. Revasc. Med. 2007. V. 8. № 4. P. 230–235.
53. Jaken S. // Curr. Opin. Cell Biol. 1996. V. 8. № 2. P. 168–173.
54. Deacon E.M., Pongracz J., Griffiths G., Lord J.M. // Mol. Pathol. 1997. V. 50. № 3. P. 124–131.
55. Dean N.M., McKay R., Condon T.P., Bennett C.F. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. № 23. P. 16416–16424.
56. Blaschuk O., Burdzy K., Fritz I.B. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. № 12. P. 7714–7720.
57. Rosenberg M.E., Silkensen J. // Int. J. Biochem. Cell Biol. 1995. V. 27. № 7. P. 633–645.
58. Humphreys D.T., Carver J.A., Easterbrook-Smith S.B., Wilson M.R. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. № 11. P. 6875–6881.
59. Zellweger T., Miyake H., July L.V. et al. // Neoplasia. 2001. V. 3. № 4. P. 360–367.
60. Chi K.N., Siu L.L., Hirte H. et al. // Clin. Cancer Res. 2008. V. 14. № 3. P. 833–839.
61. Blakesley V.A., Stannard B.S., Kalebic T. et al. // J. Endocrinol. 1997. V. 152. № 3. P. 339–344.
62. Guo Y.S., Jin G.F., Houston C.W. et al. // J. Cell Physiol. 1998. V. 175. № 2. P. 141–148.
63. Singleton J.R., Dixit V.M., Feldman E.L. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. № 50. P. 31791–31794.
64. Resnicoff M., Coppola D., Sell C. et al. // Cancer Res. 1994. V. 54. № 18. P. 4848–4850.
65. Tsujimoto Y., Cossman J., Jaffe E., Croce C.M. // Science. 1985. V. 228. № 4706. P. 1440–1443.
66. Dive C. // J. Intern. Med. 1997. № 740. P. 139–145.
67. Decaudin D., Geley S., Hirsch T. et al. // Cancer Res. 1997. V 57. № 1. P. 62–67.
68. Reed J.C., Stein C., Subasinghe C. et al. // Cancer Res. 1990. V. 50. № 20. P. 6565–6570.
69. Chi K.C., Wallis A.E., Lee C.H. et al. // Breast Cancer Res. Treat. 2000. V. 63. № 3. P. 199–212.
70. O'Brien S., Moore J.O., Boyd T.E. et al. // Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 2005. V. 13. № 1. P. 6–13.
71. Bedikian A.Y., Millward M., Pehamberger H. et al. // J. Clin. Oncol. 2006. V. 24. № 29. P. 4738–4745.
72. Tolcher A.W., Chi K., Kuhn J. et al. // Clin. Cancer Res. 2005. V. 11. № 10. P. 3854–3861.
73. Altieri D.C. // Trends Mol. Med. 2001. V. 7. № 12. P. 542–547.
74. Altieri D.C., Marchisio P.C. // Lab. Invest. 1999. V. 79. № 11. P. 1327–1333.
75. Li F., Ambrosini G., Chu E.Y. et al. // Nature. 1998. V. 396. № 6711. P. 580–584.
76. Xia C., Xu Z., Yuan X. et al. // Mol. Cancer Ther. 2002. V. 1. № 9. P. 687–694.
77. Du Z.X., Zhang H.Y., Gao da X. et al. // Exp. Mol. Med. 2006. V. 38. № 3. P. 230–240.
78. Pennati M., Colella G., Folini M. et al. // J. Clin. Invest. 2002. V. 109. № 2. P. 285–286.
79. Pennati M., Binda M., Colella G. et al. // J. Invest. Dermatol. 2003. V. 120. № 4. P. 648–654.
80. Choi K.S., Lee T.H., Jung M.H. // Cancer Gene Ther. 2003. V. 10. № 2. P. 87–95.
81. Rowley J.D. // Nature. 1973. V. 243. № 5405. P. 290–293.
82. Lugo T.G., Pendergast A.M., Muller A.J., Witte O.N. // Science. 1990. V. 247. № 4946. P. 1079–1082.
83. Dobrovic A., Morley A.A., Seshadri R., Januszewicz E.H. // Leukemia. 1991. V. 5. № 3. P. 187–190.
84. Kuwabara T., Warashina M., Tanabe T. et al. // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. № 15. P. 3074–3081.
85. Kuwabara T., Warashina M., Tanabe T. et al. // Mol. Cell. 1998. V. 2. № 5. P. 617–627.
86. Druker B.J., Talpaz M., Resta D.J. et al. // N. Engl. J. Med. 2001. V. 344. № 14. P. 1031–1037.
87. Wohlbold L., van der Kuip H., Miething C. et al. // Blood. 2003. V. 102. № 6. P. 2236–2239.
88. Daum G., Eisenmann-Tappe I., Fries H.W. et al. // Trends Biochem. Sci. 1994. V. 19. № 11. P. 474–480.
89. Mayo M.W., Baldwin A.S. // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1470. № 2. P. M55–62.
90. Downward J. // Nat. Cell Biol. 1999. V. 1. № 2. P. E33–35.
91. Bos J.L. // Cancer Res. 1989. V. 49. № 17. P. 4682–4689.
92. Tolcher A.W., Reyno L., Venner P.M. et al. // Clin. Cancer Res. 2002. V. 8. № 8. P. 2530–2535.
93. Oza A.M., Elit L., Swenerton K. et al. // Gynecol. Oncol. 2003. V. 89. № 1. P. 129–133.
94. Cripps M.C., Figueredo A.T., Oza A.M. et al. // Clin. Cancer Res. 2002. V. 8. № 7. P. 2188–2192.
95. Ставровская А. // Биохимия. 2000. Т. 65. № 1. С. 95–106.
96. Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E. // Nat. Rev. Cancer. 2002. V. 2. № 1. P. 48–58.
97. Ambudkar S.V., Kimchi-Sarfaty C., Sauna Z.E. // Oncogene. 2003. V. 22. № 47. P. 7468–7485.
98. Gao Z., Gao Z., Fields J.Z., Boman B.M. // Int. J. Cancer. 1999. V. 82. № 3. P. 346–352.
99. Шкляева О.А. Дис. канд. биол. наук. ИХБФМ СО РАН. Новосибирск. 2009.
100. Tew K.D. // Cancer Res. 1994. V. 54. № 16. P. 4313–4320.
101. Nagata J., Kijima H., Hatanaka H. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001. V. 286. № 2. P. 406–413.
102. Szyf M. // Drug Resist. Updat. 2003. V. 6. № 6. P. 341–353.
103. Adams R.L., McKay E.L., Craig L.M., Burdon R.H. // Biochim. Biophys. Acta. 1979. V. 563. № 1. P. 72–81.
104. Kautiainen T.L., Jones P.A. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 4. P. 1594–1598.
105. Wu J., Issa J.P., Herman J. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. № 19. P. 8891–8895.
106. Strathdee G., MacKean M.J., Illand M., Brown R. // Oncogene. 1999. V. 18. № 14. P. 2335–2341.
107. Fournel M., Sapieha P., Beaulieu N. et al. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. № 34. P. 24250–24256.
108. Winquist E., Knox J., Ayoub J.P. et al. // Invest. New Drugs. 2006. V. 24. № 2. P. 159–167.
109. Bryan T.M., Cech T.R. // Curr. Opin. Cell Biol. 1999. V. 11. № 3. P. 318–324.
110. Artandi S.E., DePinho R.A. // Curr. Opin. Genet. Dev. 2000. V. 10. № 1. P. 39–46.
111. Pitts A.E., Corey D.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. № 20. P. 11549–11554.
112. Kondo S., Kondo Y., Li G. et al. // Oncogene. 1998. V. 16. № 25. P. 3323–3330.
113. Engström Y., Eriksson S., Jildevik I. et al. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 16. P. 9114–9116.
114. Fan H., Villegas C., Huang A., Wright J.A. // Cancer Res. 1998. V. 58. № 8. P. 1650–1653.
115. Fan H., Villegas C., Wright J.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. № 24. P. 14036–14040.
116. Lee Y., Vassilakos A., Feng N. et al. // Cancer Res. 2003. V. 63. № 11. P. 2802–2811.

117. Desai A.A., Schilsky R.L., Young A. et al. // Ann. Oncol. 2005. V. 16. P. 958–965.
118. Folkman J. // N. Engl. J. Med. 1971. V. 285. № 21. P. 1182–1186.
119. Dvorak H.F., Brown L.F., Detmar M., Dvorak A.M. // Am. J. Pathol. 1995. V. 146. № 5. P. 1029–1039.
120. Zachary I., Gliki G. // Cardiovasc. Res. 2001. V. 49. № 3. P. 568–581.
121. Houck K.A., Ferrara N., Winer J. et al. // Mol. Endocrinol. 1991. V. 5. № 12. P. 1806–1814.
122. Poltorak Z., Cohen T., Sivan R. et al. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. № 11. P. 7151–7158.
123. Petrova T.V., Makinen T., Alitalo K. // Exp. Cell Res. 1999. V. 253. № 1. P. 117–130.
124. Förster Y., Meye A., Krause S., Schwenzer B. // Cancer Lett. 2004. V. 212. № 1. P. 95–103.
125. Zhang L., Yang N., Mohamed-Hadley A. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003. V. 303. № 4. P. 1169–1178.
126. Ferrara N., Heinsohn H., Walder C.E. et al. // Ann. NY. Acad. Sci. 1995. V. 752. № 246–256.
127. Stern D.F., Heffernan P.A., Weinberg R.A. // Mol. Cell Biol. 1986. V. 6. № 5. P. 1729–1740.
128. Di Fiore P.P., Pierce J.H., Fleming T.P. et al. // Cell. 1987. V. 51. № 6. P. 1063–1070.
129. Gusterson B.A. // Eur. J. Cancer. 1992. V. 28. № 1. P. 263–267.
130. Baselga J., Norton L., Albanell J. et al. // Cancer Res. 1998. V. 58. № 13. P. 2825–2831.
131. Lui V.W., He Y., Huang L. // Mol. Ther. 2001. V. 3. № 2. P. 169–177.
132. Tafech A., Bassett T., Sparanese D., Lee C.H. // Curr. Med. Chem. 2006. V. 13. № 8. P. 863–881.
133. De Benedetti A., Graff J.R. // Oncogene. 2004. V. 23. № 18. P. 3189–3199.
134. Mamane Y., Petroulakis E., Rong L. et al. // Oncogene. 2004. V. 23. № 18. P. 3172–3179.
135. Gingras A.C., Kennedy S.G., O'Leary M.A. et al. // Genes Dev. 1998. V. 12. № 4. P. 502–513.
136. Graff J.R., Konicek B.W., Vincent T.M. et al. // J. Clin. Invest. 2007. V. 117. № 9. P. 638–2648.
137. Li Y.S., Milner P.G., Chauhan A.K. et al. // Science. 1990. V. 250. № 4988. P. 1690–1694.
138. Wellstein A., Fang W.J., Khatri A. et al. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. № 4. P. 2582–2587.
139. Kojima S., Inui T., Muramatsu H. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995. V. 216. № 2. P. 574–581.
140. Czubayko F., Schulte A.M., Berchem G.J., Wellstein A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. № 25. P. 14753–14758.
141. Morris S.W., Kirstein M.N., Valentine M.B. et al. // Science. 1994. V. 263. № 5151. P. 1281–1284.
142. Stoica G.E., Kuo A., Aigner A. et al. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 20. P. 16772–16779.
143. Powers C., Aigner A., Stoica G.E. et al. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. № 16. P. 14153–14158.
144. Ochieng J., Fridman R., Nangia-Makker P. et al. // Biochemistry. 1994. V. 33. № 47. P. 14109–14114.
145. Sires U.I., Griffin G.L., Broekelmann T.J. et al. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. № 3. P. 2069–2074.
146. Bernhard E.J., Muschel R.J., Hughes E.N. // Cancer Res. 1990. V. 50. № 13. P. 3872–3877.
147. Sehgal G., Hua J., Bernhard E.J. et al. // Am. J. Pathol. 1998. V. 152. № 2. P. 591–596.
148. Gospodarowicz D., Ferrara N., Schweigerer L. et al. // Endocr. Rev. 1987. V. 8. № 2. P. 95–114.
149. Yan G., Fukabori Y., McBride G. et al. // Mol. Cell Biol. 1993. V. 13. № 8. P. 4513–4522.
150. Czubayko F., Smith R.V., Chung H.C., Wellstein A. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. № 45. P. 28243–28248.
151. Okamoto T., Tanaka Y., Kan M. et al. // In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 1996. V. 32. № 2. P. 69–71.
152. Aigner A., Renneberg H., Bojunga J. et al. // Oncogene. 2002. V. 21. № 37. P. 5733–5742.
153. Khachigian L.M., Collins T. // J. Mol. Med. 1998. V. 76. № 9. P. 613–616.
154. Huang R.P., Fan Y., de Belle I. et al. // Int. J. Cancer. 1997. V. 72. № 1. P. 102–109.
155. Gill P.K., Gescher A., Gant T.W. // Eur. J. Biochem. 2001. V. 268. № 15. P. 4151–4157.
156. Gu Z., Lee R.Y., Skaar T.C. et al. // Cancer Res. 2002. V. 62. № 12. P. 3428–3437.
157. Mitchell A., Dass C.R., Sun L.Q. et al. // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32. № 10. P. 3065–3069.
158. Tsutsumi K., Kasaoka T., Park H.M. et al. // Int. J. Oncol. 2008. V. 33. № 1. P. 215–224.
159. Liang Z., Yoon Y., Votaw J. et al. // Cancer Res. 2005. V. 65. № 3. P. 967–971.
160. Bouchard C., Staller P., Eilers M. // Trends Cell Biol. 1998. V. 8. № 5. P. 202–206.
161. Monia B.P., Johnston J.F., Ecker D.J. et al. // J. Biol. Chem.1992. V. 267. № 28. P. 19954–19962.
162. Liao Y., Tang Z.Y., Liu K.D. et al. // J. Cancer Res. Clin. Oncol. 1997. V. 123. № 1. P. 25–33.
163. Yang G., Thompson J.A., Fang B., Liu J. // Oncogene. 2003. V. 22. № 36. P. 5694–5701.
164. Brummelkamp T.R., Bernards R., Agami R. // Cancer Cell. 2002. V. 2. № 3. P. 243–247.
165. Zhang Z., Jiang G., Yang F., Wang J. // Cancer Biol. Ther. 2006. V. 5. № 11. P. 1481–1486.
166. Liao Y., Tang Z.Y., Ye S.L. et al. // Hepatogastroenterology. 2000. V. 47. № 32. P. 365–370.
167. Fluiter K., Frieden M., Vreijling J. et al. // Chembiochem. 2005. V. 6. № 6. P. 1104–1109.
168. Adjei A.A., Dy G.K., Erlichman C. et al. // Clin. Cancer Res. 2003. V. 9. № 1. P. 115–123.
169. Kijima H., Yamazaki H., Nakamura M. et al. // Int. J. Oncol. 2004. V. 24. № 3. P. 559–564.
170. Wickstrom E.L., Bacon T.A., Gonzalez A. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 4. P. 1028–1032.
171. Watson P.H., Pon R.T., Shiu R.P. // Cancer Res. 1991. V. 51. № 15. P. 3996–4000.
172. Hudziak R.M., Summerton J., Weller D.D., Iversen P.L. // Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 2000. V. 10. № 3. P. 163–176.
173. Cheng J., Luo J., Zhang X. et al. // Cancer Gene Ther. 2000. V. 7. № 3. P. 407–412.
174. Kabilova T.O., Chernolovskaya E.L., Vladimirova A.V., Vlassov V.V. // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2004. V. 23. № 6-7. P. 867–872.
175. Kabilova T.O., Chernolovskaya E.L., Vladimirova A.V., Vlassov V.V. // Oligonucleotides. 2006. V. 16. № 1. P. 15–25.
176. Shen L., Zhang C., Ambrus J.L. et al. // Oligonucleotides. 2005. V. 15. № 1. P. 23–35.
177. Wang Y.H., Liu S., Zhang G. et al. // Breast Cancer Res. 2005. V. 7. № 2. P. 220–228.
178. Leirdal M., Sioud M. // Br J Cancer. 1999. V. 80. № 10. P. 1558–1564.
179. Orlandi L., Binda M., Folini M. et al. // Prostate. 2003. V. 54. № 2. P. 133–143.
180. Nemunaitis J., Holmlund J.T., Kraynak M. et al. // J. Clin. Oncol. 1999. V. 17. № 11. P. 3586–3595.
181. Yuen A.R., Halsey J., Fisher G.A. et al. // Clin. Cancer Res. 1999. V. 5. № 11. P. 3357–3363.
182. Marshall J.L., Eisenberg S.G., Johnson M.D. et al. // Clin. Colorectal Cancer. 2004. V. 4. № 4. P. 268–74
183. Kitada S., Miyashita T., Tanaka S., Reed J.C. // Antisense Res. Dev. 1993. V. 3. № 2. P. 157–169.
184. Luzi E., Papucci L., Schiavone N. et al. // Cancer Gene Ther. 2003. V. 10. № 3. P. 201–208.
185. Fu G.F., Lin X.H., Han Q.W. et al. // Cancer Biol. Ther. 2005. V. 4. № 8. P. 822–829.
186. Cotter F.E., Johnson P., Hall P. et al. // Oncogene. 1994. V. 9. № 10. P. 3049–3055.
187. Wacheck V., Heere-Ress E., Halaschek-Wiener J. et al. // J. Mol. Med. 2001. V. 79. № 10. P. 587–593.
188. Morris M.J., Tong W.P., Cordon-Cardo C. et al. // Clin. Cancer Res. 2002. V. 8. № 3. P. 679–683.
189. Ocker M., Neureiter D., Lueders M. et al. // Gut. 2005. V. 54. № 9. P. 1298–1308.
190. Monia B.P., Johnston J.F., Geiger T. et al. // Nat. Med. 1996. V. 2. № 6. P. 668–675.
191. Monia B.P. // Anticancer Drug Des. 1997. V. 12. № 5. P. 327–339.
192. McPhillips F., Mullen P., Monia B.P. et al. // Br. J. Cancer. 2001. V. 85. № 11. P. 1753–1758.
193. Mullen P., McPhillips F., MacLeod K. et al. // Clin. Cancer Res. 2004. V. 10. № 6. P. 2100–2108.
194. Lou T.F., Gray C.W., Gray D.M. // Oligonucleotides. 2003. V. 13. № 5. P. 313–324.
195. Cunningham C.C., Holmlund J.T., Schiller J.H. et al. // Clin. Cancer Res. 2000. V. 6. № 5. P. 1626–1631.
196. Davis A.J., Gelmon K.A., Siu L.L. et al. // Invest. New Drugs. 2003. V. 21. № 1. P. 85–97.
197. Stewart D.J., Donehower R.C., Eisenhauer E.A. et al. // Ann. Oncol. 2003. V. 14. P. 766–774.
198. Duxbury M.S., Ito H., Zinner M.J. et al. // Oncogene. 2004. V. 23. № 8. P. 1539–1548.
199. Pavco P.A., Bouhana K.S., Gallegos A.M. et al. // Clin. Cancer Res. 2000. V. 6. № 5. P. 2094–2103.
200. Zhang L., Gasper W.J., Stass S.A. et al. // Cancer Res. 2002. V. 62. № 19. P. 5463–5469.
201. Shi W., Siemann D.W. // Anticancer Res. 2004. V. 24. № 1. P. 213–218.
202. Kim W.J., Christensen L.V., Jo S. et al. // Mol. Ther. 2006. V. 14. № 3. P. 343–350.
203. Kim W.J., Chang C.W., Lee M., Kim S.W. // J. Control. Release. 2007. V. 118. № 3. P. 357–363.
204. Weng D.E., Masci P.A., Radka S.F. et al. // Mol. Cancer Ther. 2005. V. 4. № 6. P. 948–955.
205. Roh H., Hirose C.B., Boswell C.B. et al. // Surgery. 1999. V. 126. № 2. P. 413–421.
206. Suzuki T., Anderegg B., Ohkawa T. et al. // Gene Ther. 2000. V. 7. № 3. P. 241–248.
207. Sun H.Z., Wu S.F., Tu Z.H. // Cell Res. 2001. V. 11. № 2. P. 107–115.
208. Smetsers T.F., Skorski T., van de Locht L.T. et al. // Leukemia. 1994. V. 8. № 1. P. 129–140.
209. Takamori K., Kubo T., Zhelev Z. et al. // Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf). 2005. V. 49. P. 333–334.
210. Skorski T., Nieborowska-Skorska M., Nicolaides N.C. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. № 10. P. 4504–4508.
211. Bertram J., Palfner K., Killian M. et al. // Anticancer Drugs. 1995. V. 6. № 1. P. 124–134.
212. Kostenko E.V., Laktionov P.P., Vlassov V.V., Zenkova M.A. // Biochim. Biophys. Acta. 2002. V. 1576. № 1–2. P. 143–147.
213. Ren Y., Zhan X., Wei D., Liu J. // Biomed. Pharmacother. 2004. V. 58. № 9. P. 520–526.
214. Wang H., Chen X.P., Qiu F.Z. // World J. Gastroenterol. 2003. V. 9. № 7. P. 1444–1449.
215. Логашенко Е.Б., Черноловская Е.Л., Владимирова А.В. и др. // ДАН. 2002. № 386. С. 296–297.
216. Logashenko E.B., Vladimirova A.V., Repkova M.N. et al. // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2004. V. 23. № 6–7. P. 861–866.
217. Nieth C., Priebsch A., Stege A., Lage H. // FEBS Lett. 2003. V. 545. № 2–3. P. 144–150.
218. Duan Z., Brakora K.A., Seiden M.V. // Mol. Cancer Ther. 2004. V. 3. № 7. P. 833–838.
219. Mironova N., Shklyaeva O., Andreeva E. et al. // Ann. NY. Acad. Sci. 2006. V. 91. P. 490–500.
220. Hua J., Muschel R.J. // Cancer Res. 1996. V. 56. № 22. P. 5279–5284.
221. Sanceau J., Truchet S., Bauvois B. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. № 38. P. 36537–36546.
222. Czubayko F., Liaudet-Coopman E.D., Aigner A. et al. // Nat. Med. 1997. V. 3. № 10. P. 1137–1140.
223. Lapteva N., Yang A.G., Sanders D.E. et al. // Cancer Gene Ther. 2005. V. 12. № 1. P. 84–89.
224. Yeo M., Rha S.Y., Jeung H.C. et al. // Int. J. Cancer. 2005. V. 114. № 3. P. 484–489.
225. Chen Y., Stamatoyannopoulos G., Song C.Z. // Cancer Res. 2003. V. 63. № 16. P. 4801–4804.