



Использование микроРНК в медицинской практике

Проф. Е.Н.Офицеров
РХТУ им.Д.И.Менделеева
г.Москва

III Международная
конференция

12-13 ноября 2020 года
Вологда

**БИОТЕХНОЛОГИИ –
ДРАЙВЕР РАЗВИТИЯ
ТЕРРИТОРИЙ**

Biotechnology is a Driver
of Territorial Development

12-13 November 2020
Vologda

**80-летию со дня рождения
выдающегося ученого
проф. Винтера В.Г.**

**МикроРНК (miRNA): открытие,
образование, функционирование
и многое другое, связанное с
проф. В.Винтером.**

**К 55-летию открытия МикроРНК
1966-2021**



- **Новая эра
в фармацевтике, медицине и
сельском хозяйстве**

Интервенция

интерференции

уже началась!

Первое лекарство на основе РНК-интерференции

- В 2018 году в мире появилось [первое лекарство](#) на основе РНК-интерференции. Тогда аналитики говорили о том, что эта технология прижилась на удивление быстро: с момента открытия самого механизма у беспозвоночных прошло всего 20 лет, с момента присуждения за это открытие Нобелевской премии — 12. И вот развитие продолжается: та же компания, которая дебютировала в прошлом году, Alnylam Pharmaceuticals, получила одобрение на свой новый препарат

В США одобрили второе лекарство, в основе которого лежит РНК-интерференция

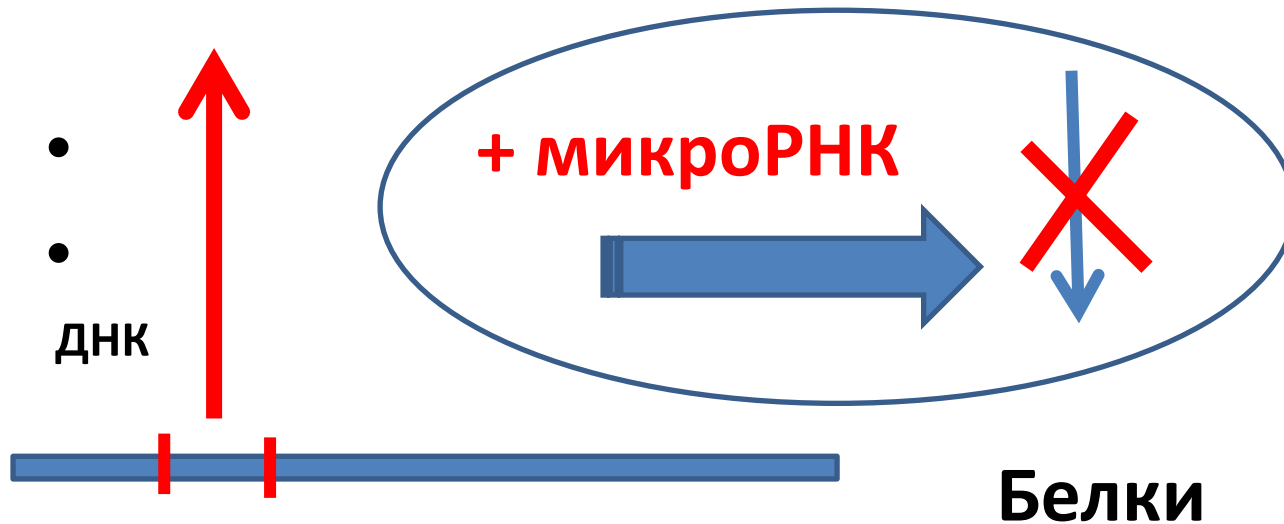
- Новый препарат предназначен для людей с острой печеночной порфирией — генетической болезнью, в ходе которой в тканях копятся предшественники гемоглобина.
- Пациентов, которым лекарство могло бы помочь, в США не так много, поэтому его стартовая стоимость — **почти полмиллиона долларов**. Но если оно окажется эффективным для более широкого круга больных, производитель обещал снизить цену.

Таблица 1. Антисенсы, находящиеся на фазе 3 клинических исследований

| Название | Тип | Мишень | Показание | Компания |
|--------------|---|----------------|--|-----------------------|
| alicaforsen | PS-ДНК | ICAM1 | Резервуарный илеит | Atlantic Healthcare |
| aganirsen | PS-ДНК | IRS-1 | Неоваскуляризация роговицы | Gene Signal |
| mongersen | PS-ДНК | Smad7 | Болезнь Крона | Celgene |
| trabedersen | PS-ДНК | TGF- β 2 | Глиобластома, меланома, рак поджелудочной железы | Autotelic |
| volanesorsen | 2'-МОЕ-ДНК | АpoCIII | Наследственная гиперлипопротеинемия | Akcea Therapeutics |
| QPI-1002 | Двухцепочечная 2'-МОЕ-РНК | p53 | Отторжение почечного транспланта | Quark Pharmaceuticals |
| QPI-1007 | Двухцепочечная 2'-МОЕ-РНК | каспаза-2 | Оптическая нейропатия | Quark Pharmaceuticals |
| inotersen | 2'-МОЕ-ДНК | TTR | Наследственные амилоидные нейропатии | Ionis |
| patisiran | Двухцепочечная РНК в липидной наночастице | TTR | Наследственные амилоидные нейропатии | Amylam |
| SYL-1001 | Двухцепочечная РНК | TRPV1 | Синдром сухого глаза | Sylentis |

Было, есть и ... не будет!

• мРНК + белки \longrightarrow 1 Рибосома



ингибиторы \longrightarrow
ингибиторы \longrightarrow
ингибиторы \longrightarrow
ингибиторы \longrightarrow

10^3 - 10^4 ферментов

10^5 - 10^6 молекул ГЛС

Существующая схема

К истории открытия

1966 год. Токио. IX Международный конгресс по онкологии. Аспирант Казанского университета Виктор Винтер делает доклад о том, что целые клетки опухоли Эрлиха выделяют или секретируют в асцитную жидкость определенное количество РНК и ДНК, причем в первые дни роста количества РНК существенно преобладают над ДНК. На 4-5 день роста при массовой гибели опухолевых клеток количества РНК резко уменьшалось, а количества ДНК возрастало.



- Исходя из этих данных был сделан вывод и доказан, что РНК выделяется неповрежденными опухолевыми клетками, а не является продуктом метаболизма внутриклеточных РНК. И это не транспортные РНК.
- *[Belyaeva M.I., Wylegzanin N.I., Vinter V.G., Balaban N.P. On secretion of nucleic acids by cancer cells//Proceedings of the iX International Cancer Congress. Tokio. 1966].*

Продолжение истории

А началось всё немного раньше в 1965 году, когда В.Г. в кн. *Методы и некоторые результаты изучения нуклеиновых кислот и ферментов нуклеинового обмена.*- Казань: 1965. С.76-80., опубликовал статью **«Исследование нуклеиновых кислот и нуклеаз асцитной жидкости карциномы Эрлиха»**, в которой впервые отметил образование клетками карциномы Эрлиха нуклеиновых кислот.

После **IX Международного конгресса по онкологии в Токио** сотрудники и руководитель лаборатории отказались принимать участие в работах по РНК и ВГ продолжает работать в одиночестве до появления собственных учеников. В это время (1967-1969 гг) им **были опубликованы следующие работы:**

- 1967. Винтер В.Г. Действие РНК карциномы Эрлиха на перевиваемость и рост этой опухоли.**//Вопросы онкологии.-1967.-Т.13, №3. С.58-62.
- 1968. Винтер В.Г. Об участии РНК в создании опухолевыми клетками «микросреды».**-Вопросы онкологии.-1968. –Т.14. № 6. С. 64-67. Сейчас мы знаем, что **микроРНК образуют экзосомы**, что приводит к структурированию среды. И здесь В.Г. был первооткрывателем. Сейчас это отдельное направление в науке об мРНК
- 1969. Винтер В.Г. Нуклеиновые кислоты опухолевых клеток. (Обзор) - В кн. Бактериальные нуклеазы и их действие на опухолевый рост. Казань. 1969. С.3-27. (Обзор, подведение итогов интенсивных работ за 1965-1968 гг)**

Обнаружение двуспиральной РНК

- Диссертация В.Г.Винтера – подведение итогов открытия микроРНК и её регуляторной роли...
- В.Г. всегда понимал важность сделанного им и как только стал самостоятелен в выборе тематики и появились ученики, он вернулся к теме микроРНК, но это произошло 10 лет спустя в 1978 г.
- Винтер В.Г. Аглиуллина Д.Г., Андреева И.Н. **Специфичность действия РНК, выделяемой клетками карциномы Эрлиха, на прививаемость и рост гомологичной опухоли**//Вопросы онкологии.-1978.-Т.24. №10.-С.38-41. Подтверждение регуляторной роли микроРНК.
- **А в 1982 году опубликовал вообще с т.з. науки тех дней крамольный, недопустимый материал, о том, что РНК может быть двуспиральной:**

Винтер В.Г., Алимова Ф.К., Зоткина Н.Л. Обнаружение двуспиральной РНК в асцитной жидкости гепатомы Зайдела//Экспериментальная онкология.- 1982.-Т.4 . №1.-С.28-32.
- Да, это то же было открытие. До В.Г. считалось, что максимально, что могут позволить РНК, это образовывать «шпильки», а тут целый дуплекс. Конечно, с т.з. мирового сообщества реакция однозначная – русские грязно работают.
- **И только через двадцать лет стало понятно, что микроРНК транспортируются из ядра в виде дуплекса, так называемой пре-микроРНК .**
-

Через 27 лет после Винтера

- МикроРНК были **повторно** открыты в 1993 году [Виктором Амбросом](#)¹, Розалиндой Ли и Родой Фейнбраум при изучении гена *lin-14*, задействованного в развитии у [нематоды *Caenorhabditis elegans*](#). Они обнаружили, что количество белка LIN-14 регулировалось коротким РНК-продуктом гена *lin-4*. Предшественник из 61 нуклеотида, транскрибируемый с гена *lin-4*, созревал в 22-нуклеотидную молекулу РНК.
- Эта короткая молекула РНК содержала **последовательности, частично комплементарные некоторым последовательностям 3'-нетранслируемой области (3'-UTR) мРНК, транскрибированной с *lin-14*. Комплементарность оказалась необходимым и достаточным условием для подавления трансляции мРНК *lin-14* в белок LIN-14.**
Таким образом, малая РНК *lin-4* была **первой** обнаруженной микроРНК, хотя в то время считали, что наличие таких РНК является особенностью нематоды Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (December 1993). “The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*”. *Cell*. **75** (5): 843—54.
- Отклонения в экспрессии микроРНК были показаны при многих болезненных состояниях. Исследуются также возможности микроРНК-терапии.

XXI век. Осознание через 35 лет

- 3 A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. Yi, R., Poy, M. N., Stoffel, M. & Fuchs, E. **Nature** 452, 225–229 (2008)
- 8 SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. Davis, B. N., Hilyard, A. C., Lagna, G. & Hata, A. **Nature** 454, 56–61 (2008)
- 14 Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. Selbach, M. et al. **Nature** 455, 58–63 (2008)
- 20 MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. Umbach, J. L. et al. **Nature** 454, 780–783 (2008)
- 24 MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. Tay, Y., Zhang, J. Q., Thomson, A. M., Lim, B. & Rigoutsos, I. **Nature** 455, 1124–1128 (2008)
- 29 Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. Tavazoie, S. F. et al. **Nature** 451, 147–152 (2008)
- 35 MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development. Yoo, A. S., Staahl, B. T., Chen, L. & Crabtree, G. R. **Nature** 460, 642–646 (2009)
- 40 LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. Elmén, J. et al. **Nature** 452, 896–899 (2008)
- 44 MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. Thum, T. et al. **Nature** 456, 980–984 (2008)
- **8 статей в самом престижном журнале «NATURE» только за один 2008 год!!!**

Экзосомальные миРНК и прогрессирование рака.

- **Экзосомы**, внеклеточные везикулы диаметром от 30 до 150 Нм, широко присутствуют в различных жидкостях организма. В последнее время в экзосомах были выявлены микроРНК (миРНК), биогенез, высвобождение и поглощение которых может включать эндосомальный сортирующий комплекс, необходимый для транспорта (комплекс ESCRT) и соответствующих белков. ...
- Таким образом, **экзосомальные миРНК** выполняют важную функцию в регуляции прогрессирования рака.
- Последние данные, касающиеся опухолевых **экзосом**, включая механизм сортировки и доставки РНК. ...
- Sun Z, Shi K, Yang S, Liu J, Zhou Q, Wang G, Song J, Li Z, Zhang Z, Yuan W. Sun Z, et al. Мол Рак. 2018 Oct 11; 17 (1):147. doi: 10.1186 / s12943-018-0897-7-да. PMID: 30309355 **Свободная статья РМС. Обзор.**

Начало новой эры борьбы с паразитами в с/хозяйстве или закат эпохи химических ХСЗР?

- Ученые также разработали проекты **РНК-интерференции** для растений, в частности, спрей, который помог бы им справиться **с вирусами**.
- В 2017 году в США разрешили выращивать ГМО-кукурузу, которая с помощью РНК-интерференции борется с насекомыми-паразитами

Как оказалось, В.Г. Винтером
были сделаны четыре **открытия мирового
нобелевского уровня:**

- **секреция микроРНК,**
- **регуляторная активность микроРНК,**
- **образование микроРНК экзосом,**
- **двухспиральность РНК**

НУ и что?



... и было ему всего 26 лет!

Спасибо за внимание!

HELLO, GOODBYE...

The Beatles in Tokyo 1966



Токио было не до Конгресса!
В столице Японии гастролировали Битлы.
Пресс-конференция в Хилтоне. 1966

Токио сегодня



Реакция биологов и онкологов

Эти сенсационные данные были восприняты мировым научным сообществом, скажем мягко, крайне неоднозначно, так как в то время еще не было известно такое явление как секреция нуклеиновых кислот интактными клетками (кроме тРНК и мРНК), а тем более не была известна регуляторная роль РНК, которую установил В.Г.Винтер в течение 1967-1968 гг.

Научный мир посчитал, что В.Винтер метаболиты тРНК и мРНК принял за новый тип РНК. «Русские работают грязно».

Однако В.Г. было показано, что выделенные из асцитной жидкости молекулы РНК обладают регуляторной активностью – стимулируют прививаемость и рост опухоли.

А это вообще посчитали несерьёзным заявлением.

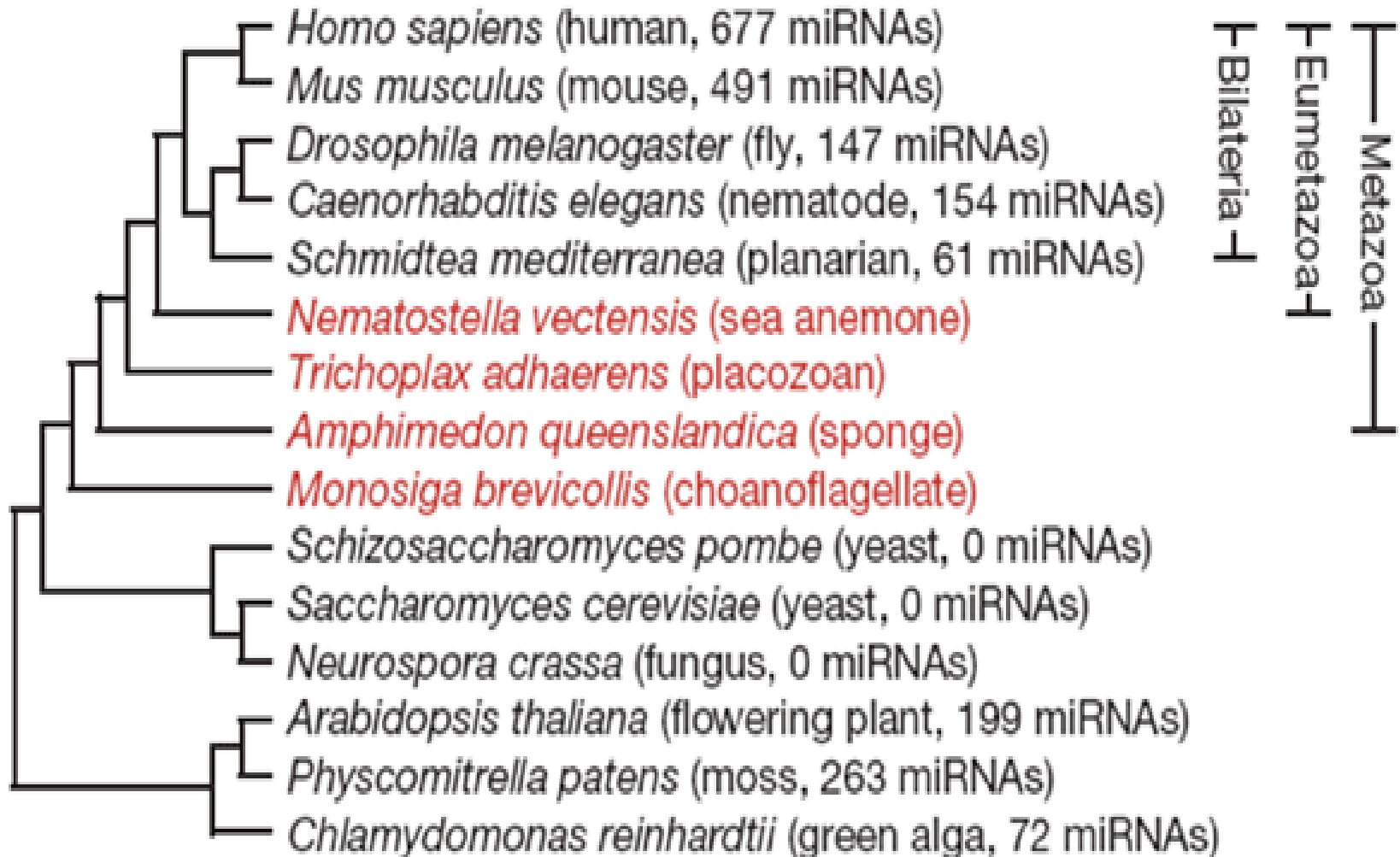
И ещё через семь лет...

- Только в 2000 году была описана вторая микроРНК — let-7, подавлявшая экспрессию *lin-41*, *lin-14*, *lin-28*, *lin-42* и *daf-12* во время переходных этапов в развитии *Caenorhabditis elegans*.
- Впоследствии была показана консервативность let-7 у многих видов^{[42][43]}, что свидетельствовало о более широком распространении этого феномена.
- После открытия let-7 последовало бурное исследование нового класса некодирующих малых РНК — микроРНК.
- К настоящему моменту описаны тысячи микроРНК человека и других видов, разработаны различные методы их изучения, созданы онлайн-базы данных последовательностей микроРНК (например, [miRBase](#))^[44].

125 новых MiRNA в год!

- К 2014 году известно более 1800 микроРНК человека. Однако эта цифра может существенно возрасти с улучшением методов поиска. Разные клетки и ткани синтезируют разные наборы микроРНК, поэтому их исследование может привести к открытию новых молекул. По разным оценкам, мишенями микроРНК являются от 30 до 60 % генов человека, кодирующих белок.
- Фантастические перспективы для создания лекарств нового уровня, например, не создавать лекарства для уничтожения раковых клеток, не устраняя причины заболевания, а проводить коррекцию на ранних стадиях изменения метаболизма организма.
-

В каких организмах и сколько нашли



Номенклатура

- **mir, MIR, miR.**
- Согласно общепринятым правилам номенклатуры, названия присваиваются экспериментально выявленным и подтверждённым микроРНК до публикации сообщения об их открытии [\[45\]](#)[\[46\]](#). Приставка «mir» отделяется дефисом, вслед за ней следует номер, говорящий о порядке именования. Например, mir-122 была открыта и названа раньше, чем mir-456.
- Приставка «mir-» используется для обозначения пре-микроРНК, «**MIR-» гена, кодирующего микроРНК**, а «miR-» — для обозначения зрелой формы. К названию микроРНК с последовательностями, отличающимися на один или два нуклеотида, приписывается дополнительная строчная буква. Так, miR-123a находится в близком родстве с miR-123b. Пре-микроРНК, дающие начало на 100 % идентичным микроРНК, но локализованные в разных местах генома, имеют в названии дополнительную цифру, отделенную дефисом. Например, пре-микроРНК hsa-mir-194-1 и hsa-mir-194-2 **дают начало идентичным микроРНК (hsa-miR-194), однако они располагаются в разных участках генома.**

Клиническое значение

- Поскольку микроРНК участвуют в нормальном функционировании эукариотической клетки, нарушения в их работе могут приводить к болезненным состояниям или заболеваниям.
- В публично доступной базе данных [miR2Disease](#) собрана информация о связи между нарушениями в работе микроРНК и различными заболеваниями.

Антисенсы

- **Антисенсы** (*antisense oligonucleotides*, антисмысловые олигонуклеотиды) — это класс лекарственных препаратов, представляющих собой относительно короткие нуклеотидные цепочки (как правило, 16–20 нуклеотидов).
- Это могут быть как немодифицированные РНК и ДНК, так и олигонуклеотиды, содержащие всевозможные модификации самих звеньев или концов цепочки.
- Антисмысловыми они называются потому, что комплементарны смысловой последовательности нуклеотидов, кодирующей белковую цепь, то есть последовательности мРНК.

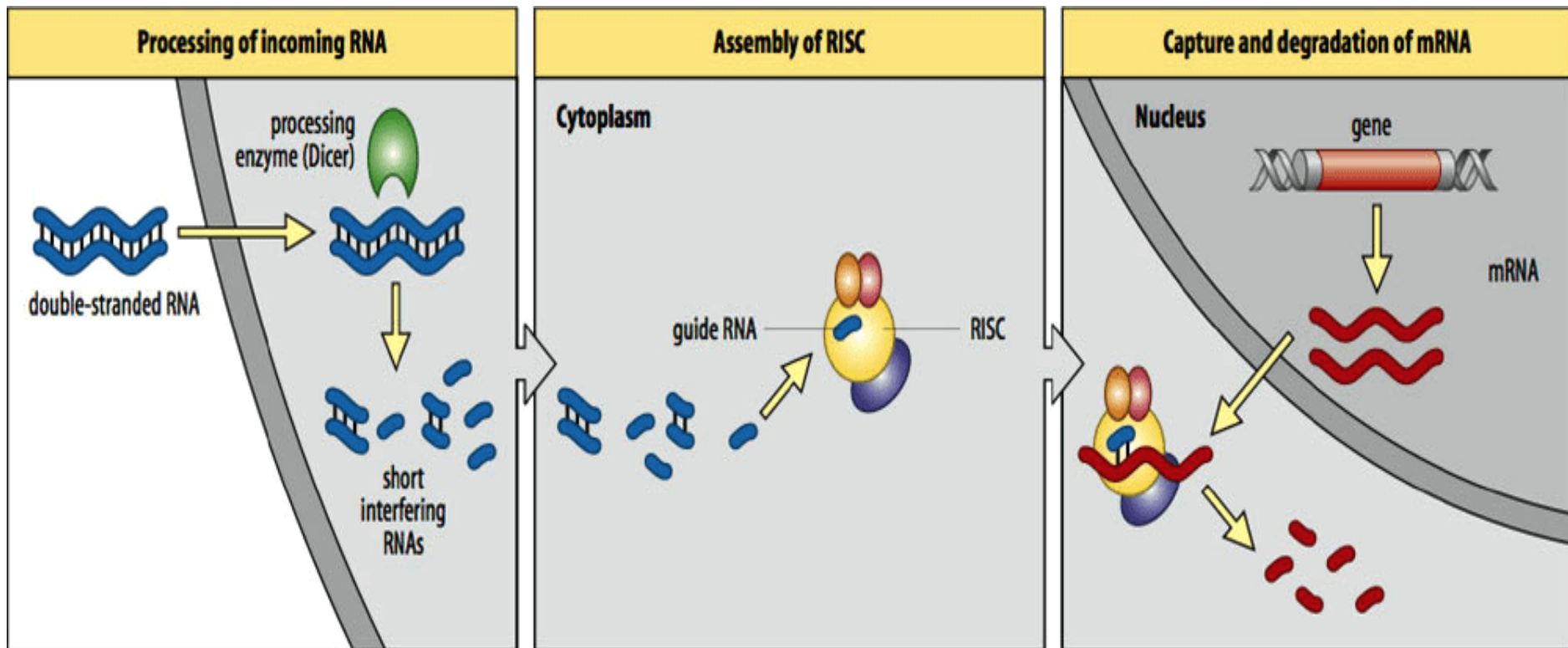
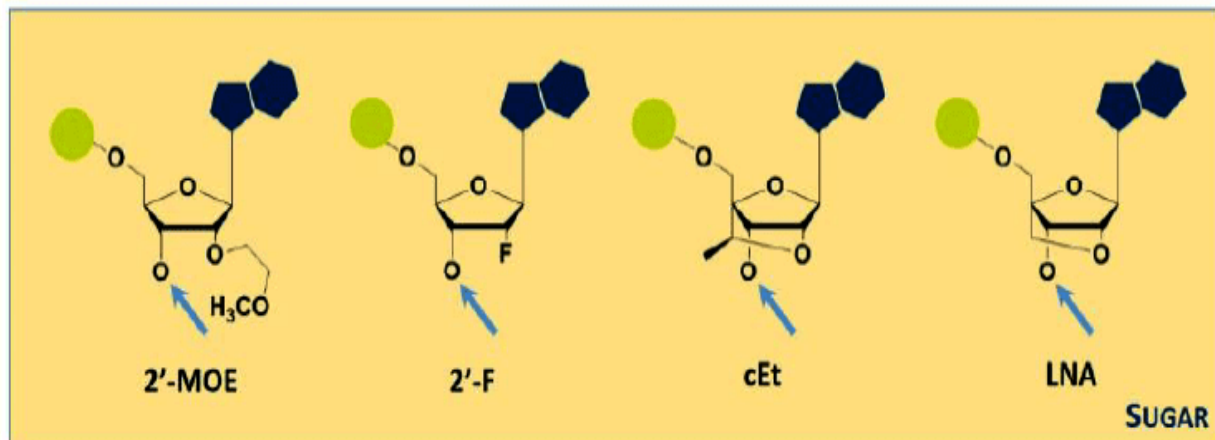
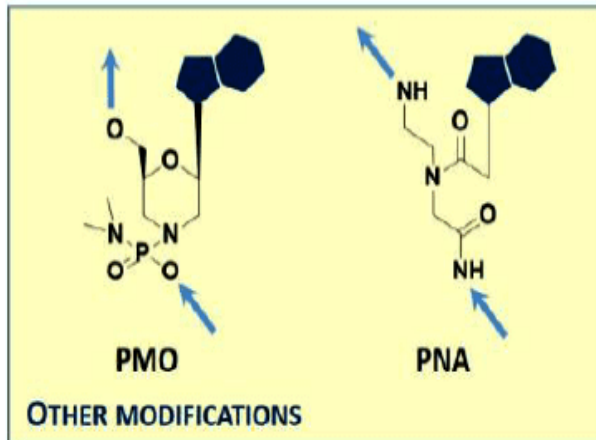
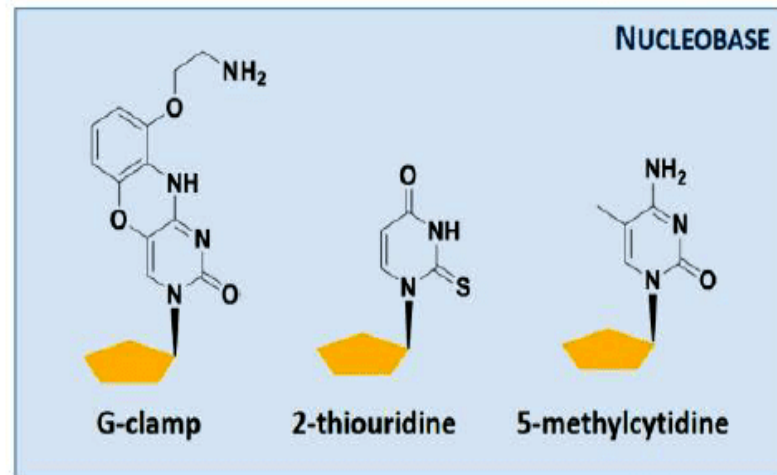
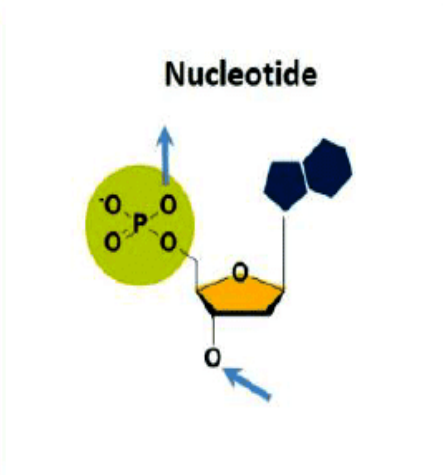
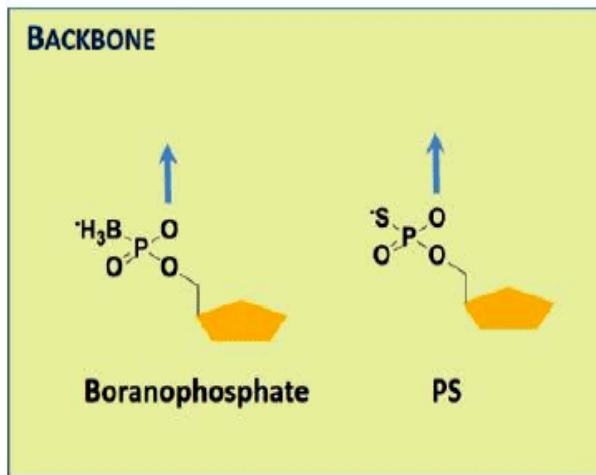


Рис. 1. Схема РНК-интерференции.

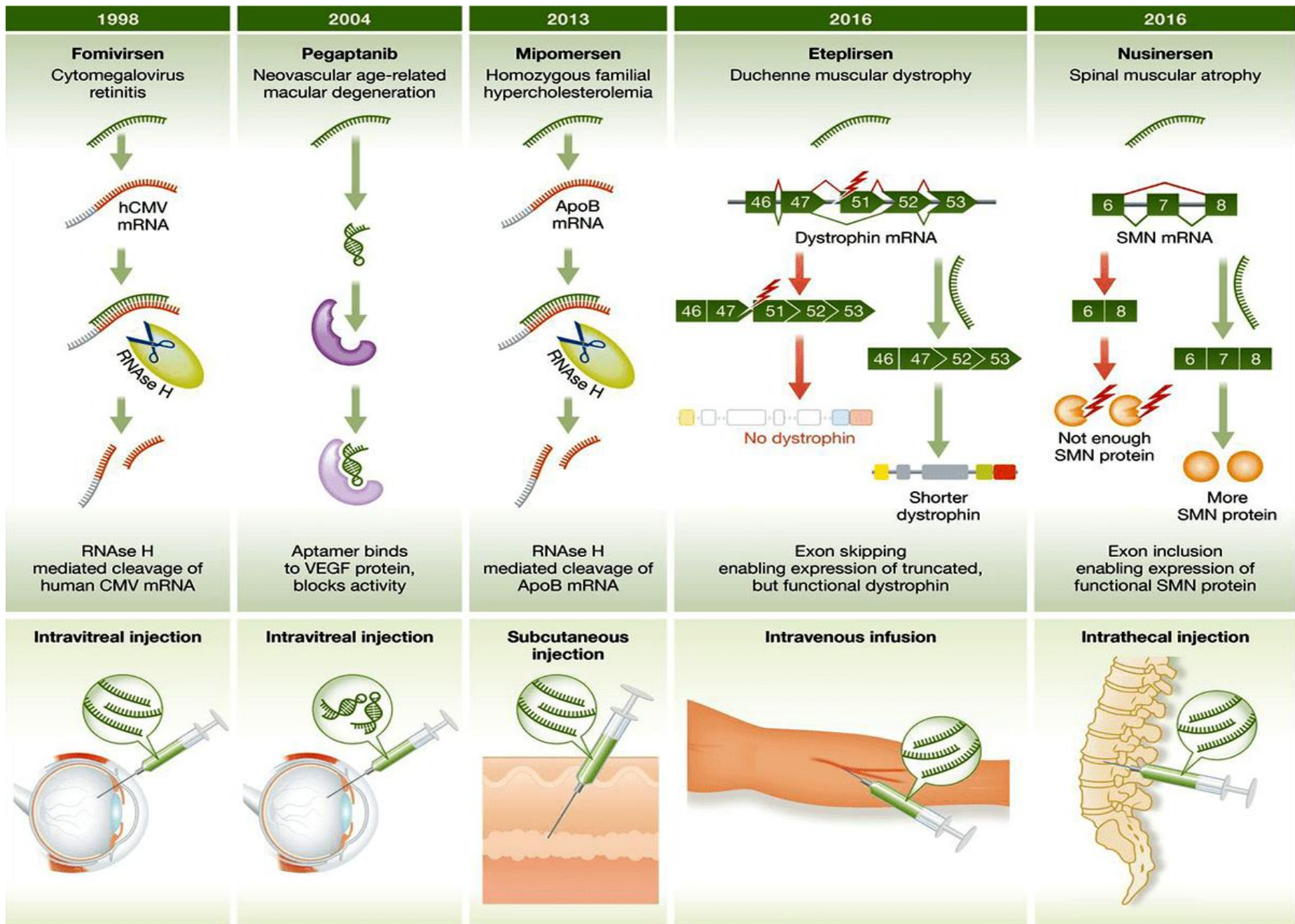
Двухцепочечная РНК процессируется ферментом Dicer, затем короткие фрагменты включаются в нуклеопротеиновый комплекс RISC, который разрушает мРНК, содержащую участки, комплементарные РНК в составе комплекса.


Перспективы развития нового направления создания лекарств

- Завершен первый этап исследования микроРНК (выделение и установление функций)
- Второй этап был связан с химической модификацией микроРНК, обеспечивающей защиту от РНКаз, и клиническими исследованиями. Он успешно преодолён.
- Третий этап – завершение клинических испытаний и вывод препаратов на рынок
-



Примеры модификаций олигонуклеотидов. Голубыми стрелками показано положение элонгации цепи. Условные обозначения: **PS** — фосфотиоатная связь; **PMO** — фосфоролиамидатно-морфолиновые олигонуклеотиды; **PNA** — пептидные нуклеиновые кислоты; **MOE** — метоксиэтил; **cEt** — «связанный» этил; **LNA** — «скрепленная» нуклеиновая кислота (*locked nucleic acid*).



 Antisense oligonucleotides (AONs)
  Aptamers

Экзосомальные миРНК и прогрессирование рака.

- **Экзосомы**, внеклеточные везикулы диаметром от 30 до 150 Нм, широко присутствуют в различных жидкостях организма. В последнее время в экзосомах были выявлены микроРНК (миРНК), биогенез, высвобождение и поглощение которых может включать эндосомальный сортирующий комплекс, необходимый для транспорта (комплекс ESCRT) и соответствующих белков. ...
- Таким образом, **экзосомальные миРНК** выполняют важную функцию в регуляции прогрессирования рака.
- Последние данные, касающиеся опухолевых **экзосом**, включая механизм сортировки и доставки РНК. ...
- Sun Z, Shi K, Yang S, Liu J, Zhou Q, Wang G, Song J, Li Z, Zhang Z, Yuan W. Sun Z, et al. Мол Рак. 2018 Oct 11; 17 (1):147. doi: 10.1186 / s12943-018-0897-7-да. PMID: 30309355 **Свободная статья РМС. Обзор.**