

На правах рукописи

ЧИГЛИНЦЕВА ДАРЬЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**МикроРНК-НАПРАВЛЕННЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИД-ПЕПТИДНЫЕ
КОНЬЮГАТЫ (миРНКазы): КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И
ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ**

1.5.4. – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научный руководитель:

Патутина Ольга Александровна, к.б.н.

Официальные оппоненты:

Грайфер Дмитрий Маратович, д.х.н., доцент,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, в.н.с.

Ажикина Татьяна Леодоровна, д.б.н.,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, зав. лабораторией

Сорокина Ирина Васильевна, д.б.н.,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии имени Н.Н. Ворожцова СО РАН, в.н.с.

Защита диссертации состоится « » месяца 2026 г. в :00 часов

на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИХБФМ СО РАН и на сайте ИАС www.niboch.nsc.ru.

Автореферат разослан « _ » _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
к.х.н.

Пестряков П.Е.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В последние десятилетия наблюдается значительный рост интереса к созданию высокоселективных терапевтических средств, нацеленных на клинически значимые РНК. Наряду с белок-кодирующими транскриптами особое внимание уделяется коротким некодирующим РНК, включая микроРНК (миРНК), РІWІ-взаимодействующие РНК (ріРНК) и короткие фрагменты тРНК (tsРНК), которые играют важную роль в регуляции экспрессии генов, а их дисрегуляция ассоциирована с развитием различных заболеваний.

Зрелые миРНК представляют собой эндогенные одноцепочечные молекулы длиной 18–25 нуклеотидов, которые контролируют посттранскрипционные этапы экспрессии генов и являются ключевыми регуляторами клеточного гомеостаза. Нарушение экспрессии миРНК ассоциировано с развитием множества патологий, включая онкологические заболевания. В зависимости от роли в канцерогенезе миРНК подразделяют на онкосупрессорные и онкогенные. Гиперэкспрессия онкогенных миРНК, приводящая к подавлению онкосупрессорных генов-мишеней определяет их клиническую значимость для разработки противоопухолевых стратегий.

Существующие подходы к ингибированию миРНК базируются на подавлении их биогенеза или блокировании функции и часто обеспечивают обратимое стерическое блокирование, уступая по эффективности методам, основанным на необратимой деградаци миРНК.

Перспективным направлением в развитии анти-миРНК терапии является разработка и применение сиквенс-специфических искусственных рибонуклеаз, адресованных к миРНК – миРНКаз. миРНКазы представляют собой конъюгаты, состоящие из адресующего олигонуклеотида и ковалентно присоединенной к нему группы, катализирующей расщепление РНК-мишени. В отличие от действия большинства миРНК-направленных олигонуклеотидов, вызывающих стерическое блокирование мишени, миРНКазы обеспечивают необратимую инактивацию миРНК. Несмотря на достигнутые успехи в области разработки сиквенс-специфических искусственных рибонуклеаз, примеры их эффективного применения для ингибирования клинически значимых миРНК в эукариотических клетках пока единичны. В связи с этим, создание миРНКаз для эффективного подавления гиперэкспрессированных онкогенных миРНК, представляет собой актуальную задачу.

Целью данной работы являлась разработка и исследование биологических свойств миРНК-направленных искусственных рибонуклеаз (миРНКаз) - эффективных инструментов инактивации онкогенных миРНК.

В ходе работы решали следующие задачи:

1. Дизайн различных структурных вариантов миРНКаз и исследование их способности связываться с миРНК-мишенями (миРНК-21, миРНК-17, миРНК-155, миРНК-18a);
2. Сравнительный анализ каталитической активности разработанных серий миРНКаз и установление зависимости скорости расщепления миРНК от структуры миРНКазы;
3. Оценка потенцирующего действия РНКазы H1 на скорость расщепления миРНК-мишеней под действием комбинации миРНКазы/РНКазы H1;
4. Исследование биологической активности и терапевтического потенциала миРНКаз *in vitro* и *in vivo*, включая анализ эффективности и специфичности подавления миРНК-мишеней, функциональный ответ клеток на инактивацию определённых миРНК и изучение противоопухолевого действия миРНКаз на ксенографтных моделях у мышей.

Научная новизна полученных результатов и практическая значимость

Впервые разработаны миРНКазы нескольких структурных типов, нацеленные на различные функциональные области миРНК, и установлены структурно-функциональные закономерности, определяющие их активность: наибольшей эффективностью обладают конъюгаты с каталитическими пептидами (LRLRG)₂, присоединёнными к концевым фосфатам, и формирующие непрерывные гетеродуплексы с миРНК. Впервые показано, что введение двух каталитических пептидов в структуру миРНКазы многократно увеличивает скорость расщепления миРНК-мишени, а синергизм действия определяется их пространственным расположением в структуре конъюгата.

Впервые показано, что синергическое действие миРНКаз всех структурных типов с РНКазой H1 обеспечивает многократное повышение скорости расщепления миРНК по всем функциональным областям.

Впервые установлена прямая корреляция между рибонуклеазной активностью миРНКаз, степенью подавления миРНК в опухолевых клетках и противоопухолевым эффектом *in vivo*, что подтверждает перспективность миРНКаз как платформы для создания высокоселективных противоопухолевых препаратов.

Практическая значимость работы заключается в разработке миРНКаз – препаратов нового класса, обеспечивающих эффективное подавление онкогенных миРНК за счёт их каталитического расщепления и проявляющих высокую противоопухолевую активность. Разработанные подходы могут быть адаптированы для создания эффективных препаратов, направленных на ингибирование других классов РНК, включая piРНК, tsRNAs, мРНК и длинные некодирующие РНК.

Основные положения, выносимые на защиту

- Включение каталитических пептидов (LRLRG)₂ в структуру миРНКаз путем их присоединения к 5'- и/или 3'-концевым фосфатам олигонуклеотида обеспечивает высокую рибонуклеазную активность и многооборотное расщепление миРНК.
- Введение двух каталитических пептидов (LRLRG)₂ в структуру миРНКаз путем их присоединения к 5'- и 3'-концевым фосфатам, либо к С1'-положению остатков дезоксирибозы обеспечивает многократное увеличение скорости расщепления миРНК-мишени за счет синергического действия пептидов.
- Степень синергического взаимодействия миРНКаз с РНКазой Н1 определяется структурой конъюгата: наибольший синергический эффект наблюдается для конструкций, формирующих два сайта связывания фермента, однако наибольшая скорость расщепления миРНК в присутствии РНКазы Н1 достигается для миРНКаз с высокой собственной каталитической активностью.
- МиРНКазы, направленные к миРНК-21 и миРНК-17, в которых каталитический пептид присоединен к 5'- и/или 3'-концу олигонуклеотида, обеспечивают эффективное и специфическое снижение уровней миРНК-мишеней в опухолевых клетках, что сопровождается снижением пролиферативной и миграционной активности клеток.
- Разработанные миРНКазы проявляют значительную противоопухолевую активность на экспериментальных опухолевых моделях MCF-7 и KB-8-5 *in vivo*, при этом степень подавления роста опухоли напрямую коррелирует с рибонуклеазной активностью конструкций.

Апробация работы и публикации

По материалам диссертации опубликовано 4 публикации в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Результаты работы были представлены на 12 конференциях.

Личный вклад автора

Экспериментальные данные получены автором лично или при его непосредственном участии. Планирование экспериментов, анализ и обсуждение результатов проведены под руководством к.б.н. Патугиной О. А., концепция работы разработана совместно с чл.-корр. РАН, д.б.н., проф. Зенковой М.А. Синтез и характеристика миРНКаз выполнена к.б.н. Патугиной О. А., д-ром Амирло Б. и д-ром Хейман Т. под руководством к.х.н. Биченковой Е. В. (Университет Манчестера, Великобритания). МиРНК синтезированы к.х.н. Мещаниновой М. И., олигодезоксирибонуклеотиды – в Лаборатории биомедицинской химии (ИХБФМ СО РАН). Катионные липосомы F предоставлены д.х.н. Масловым М. А. (РТУ МИРЭА). Эксперименты по динамике роста опухоли

проведены совместно с к.б.н. Патутиной О. А. и к.м.н. Сеньковой А. В. Гистологический анализ, анализ биораспределения и конфокальная микроскопия проведены к.м.н. Сеньковой А. В., Гладких Д. В. и к.б.н. Марковым О. В., соответственно (ИХБФМ СО РАН).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы. Текст изложен на 182 страницах, иллюстрирован 53 рисунками, включает 6 таблиц, список литературы содержит 338 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Дизайн миРНК-направленных искусственных рибонуклеаз

В данной работе были сконструированы и исследованы четыре серии миРНКаз, направленных к различным функциональным областям миРНК. Олигонуклеотидные компоненты миРНКаз были адресованы к онкогенным миРНК миРНК-21, миРНК-17, миРНК-18а и миРНК-155, ассоциированным с развитием онкологических заболеваний. В качестве каталитического компонента миРНКаз использован ранее исследованный пептид (LRLRG)₂.

1.1. Дизайн двойных миРНКаз

Двойные миРНКазы (DC) представляли собой конъюгаты, состоящие из двух адресующих олигонуклеотидов, разделенных каталитическим пептидом, которые при связывании с миРНК формируют одноцепочечный участок длиной 5 н. в её центральной области (Рис. 1, Табл. 1). Пептид был присоединен к олигонуклеотидам, используя тиогексильный и 6-амино-2-(гидроксиметил)гексильный линкеры. Для повышения сродства коротких олигонуклеотидных «плечей» (7 – 10 н.) аденины были заменены на 2-аминоаденины. Серия DC включала конъюгаты, направленные к миРНК-17, миРНК-18а, миРНК-21 и миРНК-155.

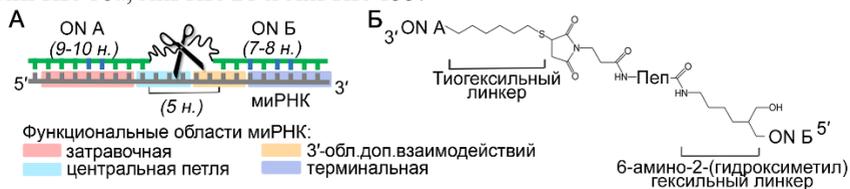


Рис. 1. Дизайн DC. А – схематичная структура комплекса DC с миРНК. Б – схематичная структура DC. Синим выделены основания 2-аминоаденинов. Пеп/ножицы – Mal-(LRLRG)₂-COOH. ON – адресующие олигонуклеотиды.

1.2. Дизайн петлеобразующих миРНКаз

Петлеобразующие миРНКазы (BC) представляли собой конъюгаты, состоящие из олигонуклеотида и одного или двух пептидов,

присоединенных через аминоксильный линкер к С1' атому дезоксирибозы в α - или β -конфигурации (Рис. 2, Табл. 1). При связывании ВС с миРНК в её центральной области формируется тринуклеотидная петля. Серия ВС включала моно- (ВС- α и ВС- β) и бис-пептидные (ВС- $\alpha\alpha$ и ВС- $\beta\beta$) конъюгаты, направленные к миРНК-17 и миРНК-21.

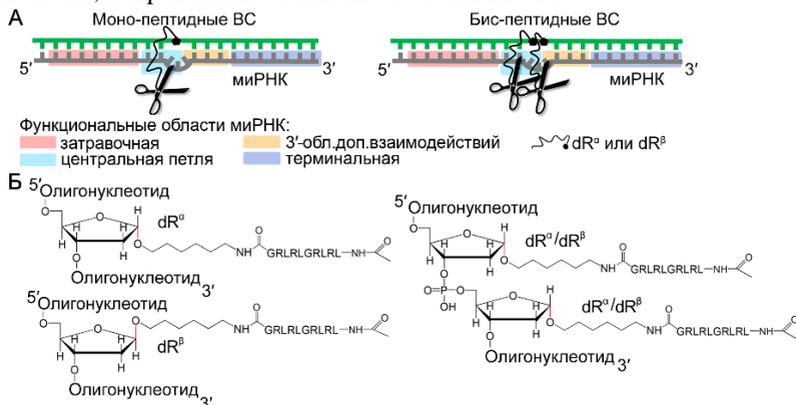


Рис. 2. Дизайн ВС. А – схематичная структура комплексов моно- и бис-пептидных ВС с миРНК. Б – схема присоединения пептидов к олигонуклеотиду через аминоксильный линкер посредством остатка дезоксирибозы в альфа (dR^α) (миРНКазы ВС- α и ВС- β) или бета (dR^β) конфигурации (миРНКазы ВС- β и ВС- $\beta\beta$). Ножницы – Acetyl-(LRLRG)₂-COOH.

1.3. Дизайн краболоподобных миРНКаз

Краболоподобные миРНКазы (СС) состояли из олигонуклеотида, комплементарного центральной области мишени, и двух пептидов, присоединенных к 5'- и 3'-концам адресующего домена (Рис. 3, Табл. 1).

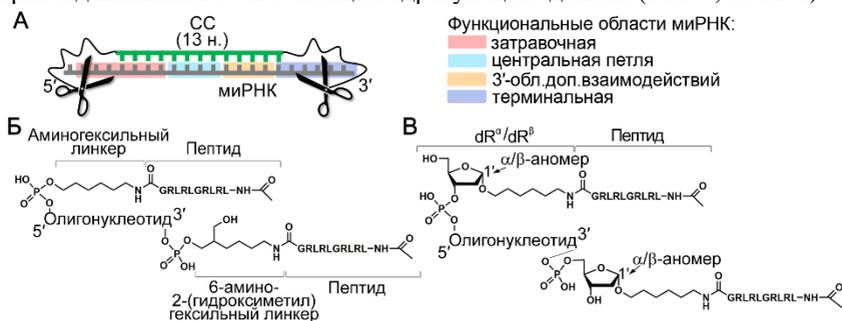


Рис. 3. Дизайн СС. А – схематичная структура комплекса СС с миРНК. Б и В – структуры миРНКаз типа СС- $\beta\beta$ (Б) и СС- $\alpha\alpha$ или СС- $\beta\beta$ (В). dR^α и dR^β – аминоксильный линкер, присоединенный к аномерному атому С1' остатка дезоксирибозы в α - или β -конфигурации. Ножницы – Acetyl-(LRLRG)₂-COOH.

21-BC-β1	TCAACATCAGT – dR ^β (II) – ATAAGCTA	0 ^(1, I) 0.87±0.05 ^(1, II)	0 ^(1, I) 221.97±6.98 ^(1, II)
21-BC-β2	TCAACATCAG – dR ^β (II) – GATAAGCTA	0 ^(1, I) 0.57±0.03 ^(1, II)	0 ^(1, I) 337.43±10.35 ^(1, II)
17-BC-α	CTACCTGCAC – dR ^α (II) – AAGCACTTTG	1.31±0.08 ^(1, I) 1.48±0.12 ^(1, II)	147.90±5.23 ^(1, I) 130.25±5.89 ^(1, II)
17-BC-β	CTACCTGCAC – dR ^β (II) – AAGCACTTTG	1.13±0.06 ^(1, I) 1.19±0.03 ^(1, II)	170.22±5.46 ^(1, I) 161.97±2.58 ^(1, II)
17-BC-αα	CTACCTGCAC – [dR ^α (II)] ₂ – AAGCACTTTG	4.86±0.27 ^(1, II)	39.65±1.05 ^(1, II)
17-BC-ββ	CTACCTGCAC – [dR ^β (II)] ₂ – AAGCACTTTG	13.9±3.26 ^(1, II)	14.41±1.97 ^(1, II)
21-CC-αα	Π-dR ^α -ATCAGTCTGATAA- dR ^α -Π	4.50±0.56 ⁽²⁾ 2.56±0.10 ^(3, I)	44.14±5.26 ⁽²⁾ 75.36±1.65 ⁽³⁾
21-CC-ββ	Π-dR ^β -ATCAGTCTGATAA – dR ^β -Π	6.07±0.29 ⁽²⁾ 4.64±0.12 ⁽³⁾	31.90±1.58 ⁽²⁾ 41.52±0.58 ⁽³⁾
21-CC-pp	Π-Л3-p-ATCAGTCTGATAA – p-Л1-Π	20.08±1.73 ⁽²⁾ 22.34±2.92 ⁽³⁾	9.59±0.51 ⁽²⁾ 8.72±0.65 ⁽³⁾
21-CC-5'p	Π-Л3-p-ATCAGTCTGATAA	0.61±0.05 ⁽²⁾	317.02±13.60 ⁽²⁾
21-CC-3'p	ATCAGTCTGATAA-p-Л1-Π	1.91±0.02 ⁽²⁾	100.58±0.57 ⁽²⁾
21-CC-5'α/ 21-CC-3'α [#]	Π-dR ^α -ATCAGTCTGATAA-dR ^α dR ^α -ATCAGTCTGATAA-dR ^α -Π	0.67±0.04 ⁽²⁾	286.39±10.65 ⁽²⁾
17-CC-αα	Π-dR ^α -TGCAGTCTGATAAGCA- dR ^α -Π	88.55±4.43 ⁽²⁾ 49.08±7.01 ⁽³⁾	2.18±0.11 ⁽²⁾ 3.98±0.32 ⁽³⁾
17-CC-5'α/ 17-CC-3'α [#]	Π-dR ^α -TGCAGTCTGATAAGCA-dR ^α dR ^α -TGCAGTCTGATAAGCA-dR ^α -Π	3.17±0.36 ⁽²⁾	61.17±3.90 ⁽²⁾
21-FC-αp	Π-(Π-Л3)-dR ^α -AGTCTGATAA GCTAGTCAGCGAAAGCTGAC	8.5±1.3 ^(1, I) 14.6±3.3 ⁽³⁾	21.73±1.97 ^(1, I) 12.55±1.64 ⁽³⁾
21-FC-βp	Π-(Π-Л3)-dR ^β -AGTCTGATAAG CTAGTCAGCGAAAGCTGAC	4.6±0.3 ^(1, I) 5.0±0.3 ⁽³⁾	41.37±1.14 ^(1, I) 38.11±1.16 ⁽³⁾
21-FC-α/ 21-FC-p [#]	Π-(Л3)-dR ^α -AGTCTGATAAGCT AGTCAGCGAAAGCTGAC и (Π- Л3)-dR ^α -AGTCTGATAAGCTA GTAGTCAGCGAAAGCTGAC	7.9±0.7 ^(1, I)	23.72±1.18 ^(1, I)
21-FC-β/ 21-FC-p [#]	Π-(Л3)-dR ^β -AGTCTGATAAGCT AGTCAGCGAAAGCTGAC и (Π-Л3)-dR ^β -AGTCTGATAAGCT AGTCAGCGAAAGCTGAC	5.2±0.5 ^(1, I)	36.56±1.57 ^(1, I)

Π – каталитический пептид (LRLRG)₂. Л1 – 3'-6-амино-2-(гидроксиметил) гексильный линкер, Л2 – тиогексильный линкер, Л3 – аминоксильный линкер. dR^α и dR^β – остаток рибозы, к которому в С1' положении через Л3 присоединён каталитический пептид в α или β конфигурации. p – фосфатная группа олигонуклеотида. A – 2-аминодезоксиаденозин. Последовательность, выделенная курсивом – шпильчатая структура. [#] побочные продукты синтеза, представляющие собой смесь двух конъюгатов с одним пептидом. k_{obs} – наблюдаемая константа скорости гидролиза РНК-мишени. t_{1/2} – время полурасщепления мРНК. ^(1, I) и ^(1, II) однооборотный режим реакции (миРНК/миРНКазы = 1/20 мкМ) в буфере I и II, соответственно; ⁽²⁾ однооборотный режим реакции (миРНК/миРНКазы = 1/5 мкМ) в

буфере I; ⁽³⁾ многооборотный режим реакции (миРНК/миРНКаза = 10/5 мкМ) в буфере I. Буфер I: 50 мМ Трис-НСl рН 7.0, 200 мМ КСl, 0.1 мМ EDTA. Буфер II: 20 мМ Трис-НСl рН 7.8, 40 мМ КСl, 8 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT.

2. Исследование гибридизационных свойств разработанных миРНКаз

Методом задержки в геле установлено, что разработанные миРНКазы способны эффективно связываться с мишенями, при этом оптимальные условия связывания определяются их структурной организацией (Рис. 5). DC и BC связываются с миРНК с эффективностью 70-100%, достигая плато преимущественно при эквимольном соотношении миРНК/миРНКаза (Рис. 5). CC и FC связываются с миРНК менее эффективно: степень связывания CC с миРНК достигала 84-89% при 5-кратном избытке конъюгатов, а FC связывались с эффективностью 65-75% при 2.5-кратном избытке по отношению к миРНК (Рис. 5).

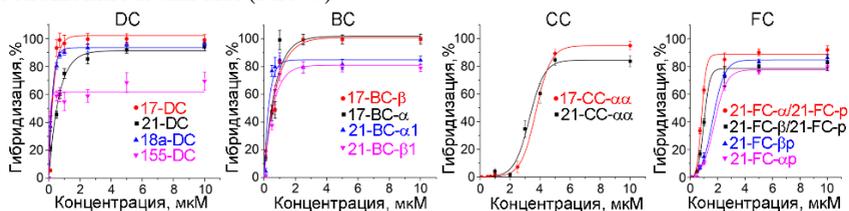


Рис. 5. Концентрационные зависимости связывания миРНКаз с миРНК-мишенями. 5'-[³²P]-меченые миРНК (1 мкМ) инкубировали с миРНКазами (0.1 – 10 мкМ) в буфере I при 37 °С 45 мин и анализировали методом задержки в 15%-ном нативном ПААГ. Ср. знач ± ст. ошибка.

3. Исследование каталитической активности и нуклеотидной специфичности разработанных миРНКаз

3.1. Исследование рибонуклеазной активности двойных миРНКаз

Рибонуклеазную активность DC исследовали в условиях однооборотной реакции в двух буферных системах (Табл. 1). Установлено, что состав буфера влияет на эффективность и профиль расщепления миРНК-мишеней. В буфере I DC проявляли преимущественно пиримидин-А специфическое расщепление с низкими значениями k_{obs} , тогда как в буфере II наблюдалось расщепление по всем сайтам одноцепочечного участка миРНК с увеличением k_{obs} в 3–10 раз (Табл. 1, Рис. 6 А-В): степень расщепления миРНК-21, миРНК-17, миРНК-18а и миРНК-155 за 48 ч возрастала с 0 до 30%, с 2 до 32%, с 7 до 23% и с 16 до 57%, соответственно. Низкая активность 21-DC в буфере I определяется отсутствием чувствительных пиримидин-А связей в одноцепочечном участке миРНК-21. Замена нуклеотидов в последовательности миРНК-21 с введением С-А и U-А мотивов приводила к расщеплению миРНК-21_1 на 18% и 63% в буферах I и II, соответственно (Рис. 6 А-В).

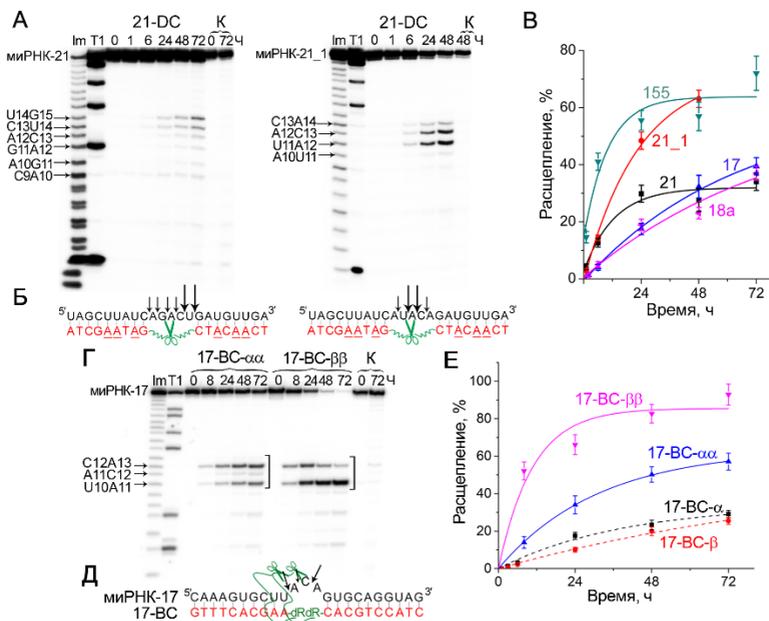


Рис. 6. Расщепление 5'-[³²P]-миРНК-21 и миРНК-17 под действием DC и BC. А, Г – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-21 и миРНК-21_1 под действием 21-DC (А) и миРНК-17 под действием бис-пептидных BC (Г). миРНК (1 мкМ) и миРНКазы (20 мкМ) инкубировали в буфере II при 37 °С 72 ч. Дорожки Im и T1 – имидазольный и T1-лэддер, соответственно. К – 5'-[³²P]-миРНК инкубировали в отсутствие миРНКаз. Б, Д – сайты расщепления (стрелки) миРНК миРНКазами. В, Е – кинетические зависимости расщепления миРНК под действием DC и BC. А – 2-аминоаденин.] – область выпетливания РНК.

3.2. Исследование рибонуклеазной активности петлеобразующих миРНКаз

Рибонуклеазную активность BC исследовали в условиях однооборотной реакции в двух буферных системах (Табл. 1). Установлено, что способ присоединения пептида и состав буфера влияют на эффективность расщепления миРНК-мишеней. Моно-пептидные миРНКазы 17-BC-α и 17-BC-β расщепляли миРНК-17 в области тринуклеотидной петли с сопоставимой эффективностью, составляющей 25–30% за 72 ч, независимо от состава буфера (Табл. 1, Рис. 6 Е). Сайты расщепления были представлены преимущественно С-А и U-А связями. МиРНКазы, направленные к миРНК-21, были неактивны в буфере I, тогда как в буфере II наблюдалось расщепление по всем связям в петле, при этом

β -изомеры 21-BC- β 1 и 21-BC- β 2 показали вдвое более высокие значения k_{obs} по сравнению с α -изомерами 21-BC- α 1 и 21-BC- α 2 (Табл. 1).

Рибонуклеазная активность бис-пептидных BC значительно превосходила активность моно-пептидных аналогов: 17-BC- $\alpha\alpha$ демонстрировала двукратное увеличение степени расщепления миРНК-17 (57% за 72 ч), тогда как 17-BC- $\beta\beta$ обеспечивала количественную деградацию мишени к этому времени, а значения k_{obs} возросли в 2 и 3 раза, соответственно (Табл. 1, Рис. 6 Г-Е).

3.3. Исследование рибонуклеазной активности крабоподобных миРНКаз

Рибонуклеазную активность CC исследовали в условиях однооборотной и многооборотной реакции. Установлено, что тип присоединения пептида существенно влияет на каталитическую активность конъюгатов. Среди миРНК-21-направленных бис-пептидных CC наибольшую активность продемонстрировал 21-CC-pp: степень расщепления миРНК-21 составила 84% и 94% через 24 и 48 ч, соответственно ($k_{\text{obs}} = 20.08 \times 10^{-6}$, с^{-1} , $t_{1/2} = 9.59$ ч), что в 3–5 раз превышало активность 21-CC- $\beta\beta$ ($t_{1/2} = 31.9$ ч) и 21-CC- $\alpha\alpha$ ($t_{1/2} = 44.14$ ч) (Рис. 7 А и Б, Табл. 1). Введение второго каталитического пептида обеспечивало синергическое усиление активности с увеличением k_{obs} в 5–12 раз и сокращением $t_{1/2}$ более чем в 10 раз (Табл. 1, Рис. 7 Б). Аналогичные закономерности наблюдались для миРНКазы 17-CC- $\alpha\alpha$, обеспечивавшей 98% расщепление миРНК-17 за 24 ч ($k_{\text{obs}} = 88.55 \times 10^{-6}$, с^{-1} , $t_{1/2} = 2.18$) в сравнении с 32% для моно-пептидных аналогов ($t_{1/2} = 61.2$ ч). Наиболее активные бис-пептидные CC (21-CC-pp и 17-CC- $\alpha\alpha$) осуществляли расщепление РНК-мишени в многооборотном режиме с эффективностью, сопоставимой с однооборотным режимом (Табл. 1, Рис. 7 Б). Сайты расщепления были сосредоточены в 5'- и 3'-концевых областях миРНК и представлены преимущественно пиримидин-А связями (Рис. 7 В).

3.4. Исследование рибонуклеазной активности вилкоподобных миРНКаз

Рибонуклеазную активность FC исследовали в условиях однооборотной и многооборотной реакции. Установлено, что бис-пептидные FC проявляют активность, сопоставимую с моно-пептидными аналогами: 21-FC- $\alpha\alpha$ и 21-FC- $\beta\beta$ демонстрировали сопоставимые значения k_{obs} и $t_{1/2}$ в сравнении с моно-пептидными формами (Рис. 7 Г и Д, Табл. 1). Вместе с тем ориентация пептида оказывала заметное влияние на эффективность расщепления миРНК: α -изомеры превосходили β -аналоги, обеспечивая 55% и 38% расщепление миРНК-21 за 24 ч, соответственно ($k_{\text{obs}} = 8.5$ и 4.6×10^{-6} , с^{-1} , соответственно). Анализ паттерна расщепления показал, что основными сайтами расщепления миРНК-21 являются преимущественно U-N связи

доменов, количеством и взаимным позиционирование каталитических пептидов, способом их присоединения, ориентацией каталитического домена относительно функциональных участков миРНК, а также нуклеотидной последовательностью миРНК-мишени.

4. Исследование эффективности расщепления миРНК-мишеней под действием комбинации миРНКаз и РНКазы Н1

Исследование расщепления миРНК при совместном действии миРНКаз и РНКазы Н1 проводили в буфере II: для DC и BC в условиях однооборотного режима при 20-кратном избытке конъюгатов, а для CC и FC, обладающих высокой рибонуклеазной активностью, в условиях многооборотного режима при 2-кратном избытке миРНК (Рис. 8).

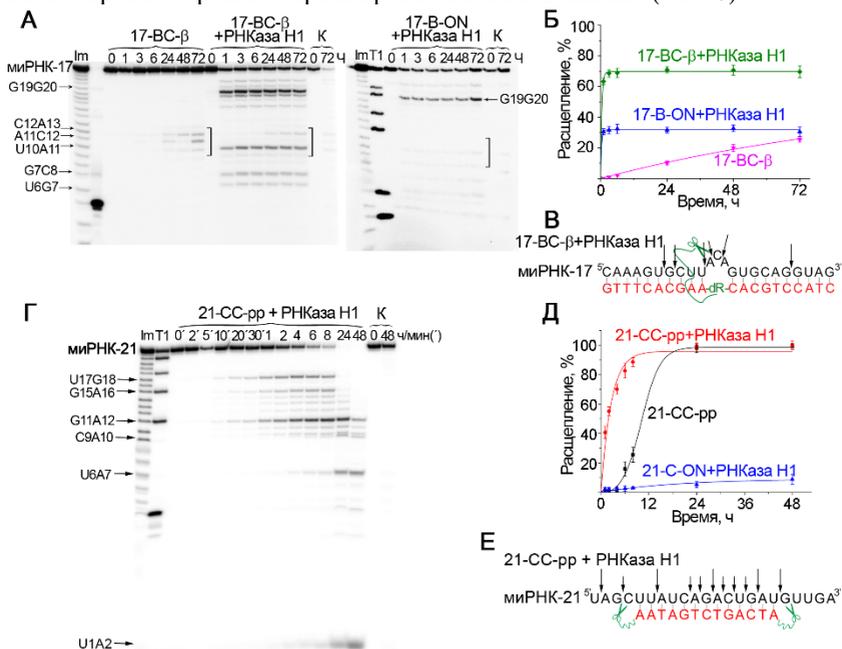


Рис. 8. Расщепление миРНК при совместном действии миРНКаз и РНКазы Н1. А, Г – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления 5'-[³²P]-миРНК-17 (А) и 5'-[³²P]-миРНК-21 (Г). миРНК-17 (1 мкМ) и 17-BC-β или 17-В-ON (20 мкМ), миРНК-21 (10 мкМ) и 21-CC-pp (5 мкМ) инкубировали в присутствии РНКазы Н1 (5 ед.акт./мл) в буфере II при 37 °С. Дорожки Im и T1 – имидазольный и T1-лэддер, соответственно. К – 5'-[³²P]-миРНК инкубировали в присутствии РНКазы Н1 и в отсутствие олигонуклеотида и миРНКазы. Б, Д – кинетические зависимости расщепления миРНК. В, Е – сайты расщепления (стрелки) миРНК при совместном действии миРНКаз и РНКазы Н1.] – область выпетливания РНК.

Показано, что в условиях, близких к внутриклеточным, все разработанные миРНКазы способны формировать гетеродуплексы с миРНК-мишенями, являющиеся субстратами для РНКазы Н1. При совместном действии миРНКаз и РНКазы Н1 наблюдалось взаимное усиление действия фермента и конъюгата: скорость деградации микроРНК возрастала в 3 – 120 раз в зависимости от типа конъюгата. Наиболее выраженный синергический эффект на начальных этапах реакции (1 ч) наблюдался для менее активных конструкций DC и BC; так, при совместном действии моно-пептидных BC с РНКазой Н1 наблюдалось наибольшее увеличение кратности расщепления – в 120 раз (Рис. 8 А и Б). Однако наибольшую скорость расщепления в комбинации с РНКазой Н1 продемонстрировали бис-пептидные BC, CC и FC, обеспечивающие количественное расщепление мишени к 8-24 ч (Рис. 8 Г и Д). Тогда как для менее активных миРНКаз (DC и моно-пептидные BC) кинетические кривые расщепления достигали предельных значений при 40-65%, не достигая полной деградации РНК даже к 72 ч. Важным преимуществом разработанных конструкций является их способность при совместном применении с РНКазой Н1 обеспечивать деградацию миРНК по всей длине молекулы: одноцепочечные области расщепляются миРНКазой, а области гетеродуплекса – РНКазой Н1 (Рис. 8 В и Е). Такой механизм обеспечивает эффективную инактивацию миРНК вследствие её полного разрушения.

5. Исследование биологической активности и терапевтического потенциала миРНКаз на опухолевых моделях *in vitro* и *in vivo*

Биологическую активность и терапевтический потенциал исследовали для наиболее активных крабоподобных и вилкоподобных миРНКаз.

5.1. Исследование биологической активности крабоподобных миРНКаз на линиях опухолевых клеток *in vitro*

Методом stem-loop ПЦР выявлено, что CC вызывают эффективное и специфическое снижение уровней миРНК-мишеней в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, превосходя действие соответствующих олигонуклеотидов в 1.5-2 раза (Рис. 9 А и Б). Наибольший ингибирующий эффект продемонстрировал 21-CC-pp, обеспечивающий подавление миРНК-21 на 65%, и 17-CC-aa, вызывающий снижение миРНК-17 на 58%. При этом миРНКазы не оказывали влияния на уровень некомплементарной миРНК let-7g. Дополнительно специфичность миРНКаз была подтверждена анализом уровней белков-мишеней этих миРНК методом Вестерн-блот анализа: подавление миРНК-21 сопровождалось двукратным повышением уровня белка PDCD4, а ингибирование миРНК-17 приводило к увеличению E2F1 и Е-кадгерина в 2.2 и 1.5 раза, соответственно (Рис. 9 В-Д). Следствием подавления уровня

онкогенных миРНК являлось снижение пролиферации опухолевых клеток (Рис. 10).

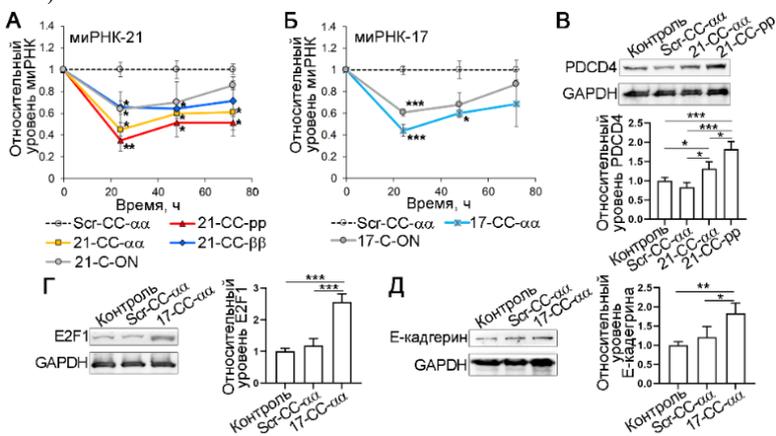


Рис. 9. Биологическая активность СС в клетках MCF-7. А, Б – уровни миРНК-21 и миРНК-17 после воздействия специфических миРНКаз. Результаты stem-loop ПЦР. Уровень миРНК нормировали на мРНК U6. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ и *** $p \leq 0.001$ по сравнению с Scr-CC-αα. В, Г, Д – уровни белков PDCD4, E2F1 и E-кадгерина. Результаты Вестерн-блот анализа, 72 ч. Нормализация на уровень GAPDH. Контроль – интактные клетки. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ и *** $p \leq 0.001$. Транфекцию клеток проводили с использованием Lipofectamine™ 2000 при концентрации соединений 1 мкМ. Ср. знач ± ст. ошибка (t тест).

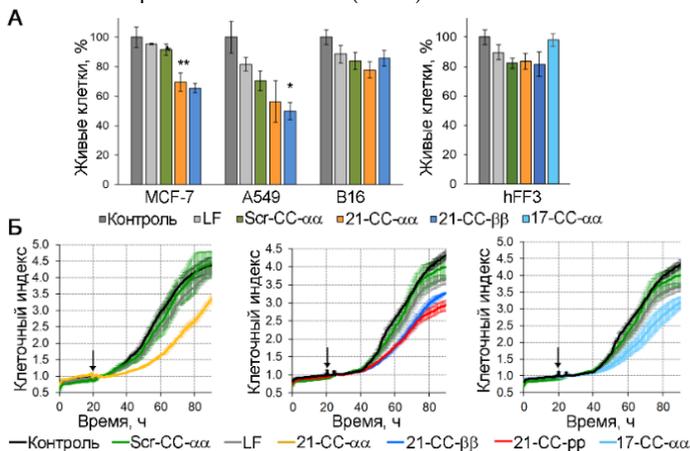


Рис. 10. Влияние СС на пролиферацию клеток. А – пролиферация опухолевых клеток MCF-7, A549 и B16 и нормальных фибробластов человека hFF3 под действием миРНКаз. Результаты WST-анализа, 72 ч. Ср. знач ± ст. ошибка. * $p \leq 0.05$ и ** $p \leq 0.01$ по сравнению с Scr-CC-αα (t тест). Б – пролиферативная активность клеток MCF-7 после трансфекции (стрелка) СС. Анализ в реальном времени

(xCelligence). Трансфекцию клеток проводили с использованием Lipofectamine™ 2000 (LF) при концентрации соединений 1 мкМ. Контроль – интактные клетки.

Исследование влияния СС на рост опухолевых клеток показало, что среди клеточных линий MCF-7, A549 и В16 наибольшую чувствительность к специфическому антипролиферативному действию миРНКаз проявили клетки MCF-7, выживаемость которых снижалась на 40-50% (Рис. 10). При этом СС не оказывали значимого эффекта на пролиферацию нетрансформированных клеток фибробластов человека линии hFF3.

5.2. Исследование биологической активности вилкоподобных миРНКаз на линиях опухолевых клеток *in vitro*

Скрининговое исследование биологической активности FC, проведенное на панели клеточных линий, включающей клетки KB-8-5, KB-3-1, A549, MCF-7, показало, что трансфекция клеток 21-FC-βр приводит к снижению пролиферации опухолевых клеток на 45–70%, при этом наибольшую специфическую восприимчивость к действию миРНКаз показали клетки KB-8-5 и MCF-7 (Рис.11 А). FC не оказывали значимого влияния на пролиферацию фибробластов hFF3.

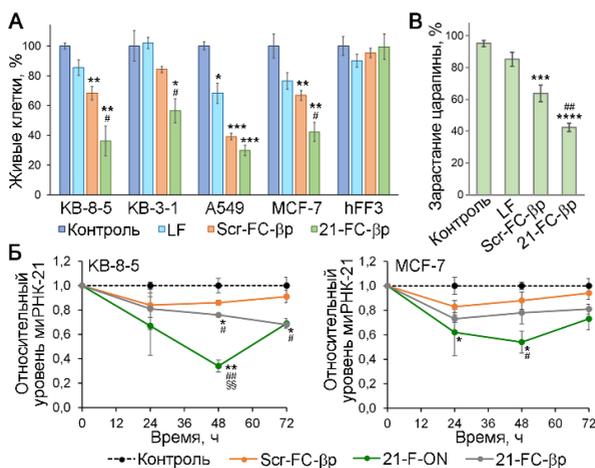


Рис. 11. Биологическая активность FC в опухолевых клетках. А – изменение пролиферации клеток KB-8-5, KB-3-1, A549, MCF7 и hFF3 под действием FC. Результаты МТТ-теста, 48 ч. Б – уровни миРНК-21 в клетках KB-8-5 и MCF-7 под действием FC. Результаты stem-loop ПЦР. Уровень миРНК нормировали на мяРНК U6. В – миграционная активность клеток KB-8-5 под действием FC. Результаты scratch теста, 96 ч. Трансфекцию проводили с помощью Lipofectamine™ 2000 (LF) при концентрации соединений 50 нМ. Контроль – интактные клетки. Ср. знач ± ст. ошибка. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ и **** $p \leq 0.0001$ по сравнению с контролем; # $p \leq 0.05$ и ## $p \leq 0.01$ по сравнению с Scr-FC-βр; §§ $p \leq 0.01$ по сравнению с 21-F-ON (t тест).

На примере наиболее чувствительных линий клеток KB-8-5 и MCF-7 методом stem-loop ПЦР подтверждено, что антипролиферативный эффект FC ассоциирован с подавлением экспрессии миРНК-21 (Рис.11 Б). В клетках KB-8-5 уровень миРНК-21 снижался на 60% через 48 ч после трансфекции миРНКазой, а в клетках MCF-7 подавление составило 40% через 24 ч, при этом эффект сохранялся в течение 48 ч. МиРНК-21-направленный антисмысловый олигонуклеотид 21-F-ON снижал уровень мишени лишь на 35%. Результаты scratch теста на клетках KB-8-5 показали, что 21-FC-βp ингибирует и миграционную активность клеток на 60% через 72 ч (Рис.11 В).

Проведенные *in vitro* исследования биологической активности показали, что разработанные крабоподобные и вилкоподобные миРНКазы обеспечивают эффективное и селективное подавление онкогенных миРНК, результатом которого является значительное снижение пролиферативных и миграционных свойств опухолевых клеток.

5.3. Исследование противоопухолевой активности крабоподобных миРНКаз на опухолевой модели у мышей.

Изучение противоопухолевого потенциала миРНК-21-направленных СС проводили на ксенографтной модели аденокарциномы MCF-7 на мышах *ex vivo*. Ключевой целью эксперимента было выявление корреляции между рибонуклеазной активностью СС различной структуры и выраженностью противоопухолевого эффекта. Для оценки прямого противоопухолевого эффекта и минимизации ограничений, связанных с недостаточностью эффективной доставкой соединений *in vivo*, клетки MCF-7 трансфицировали миРНКазами в комплексе с Lipofectamine™ 2000 *in vitro* для достижения наибольшего уровня трансфекции, а затем имплантировали иммунодефицитным мышам линии nude (Рис.12).

Анализ динамики роста опухоли показал, что наиболее каталитически активная миРНКазы 21-СС-pp ингибировала рост опухоли на 85%, тогда как менее активная миРНКазы 21-СС-aa снижала объем опухоли на 50 %, что указывает на прямую зависимость противоопухолевого эффекта от рибонуклеазной активности соединений (Рис. 12 А).

Гистологический анализ срезов опухолей показал, что подавление миРНК-21 под действием 21-СС-pp приводит к трехкратному снижению численной плотности митозов и количества Ki-67-положительных клеток, что указывает на выраженный антипролиферативный эффект (Рис.12 Б). При этом количество каспаза-3 положительных клеток увеличивалось в 1.5 раза, что свидетельствует об индукции апоптоза в опухолевой ткани.

Полученные данные свидетельствуют о выраженном противоопухолевом потенциале миРНКаз и подтверждает перспективность их дальнейшего изучения *in vivo*.

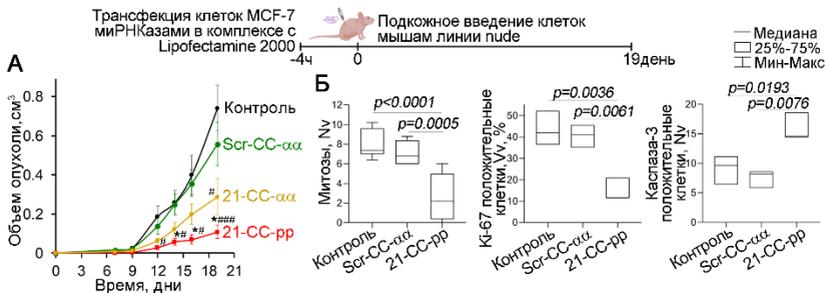


Рис. 12. Противоопухолевое действие миРНК-21-направленных СС на модели аденокарциномы MCF-7. Клетки MCF-7 трансфицировали *in vitro* миРНКазами СС (1 мкМ, Lipofectamine™ 2000) и подкожно имплантировали мышам линии nude (n = 7). А – динамика роста опухоли MCF-7. Контроль – мыши с ксенотрансплантатами интактных клеток MCF-7. Ср. знач ± ст. ошибка. * $p \leq 0.05$ по сравнению с группой Scr-CC-αα; # $p \leq 0.05$, ### $p \leq 0.001$ по сравнению с группой контроля. Б – численная плотность (Nv) митотических событий (морфометрический анализ), а также объемная плотность (Vv) Ki-67-положительных клеток и Nv каспаза-3-положительных клеток (иммуногистохимическое окрашивание) в опухоли на 19-й день. Анализ данных проведен с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки.

5.4. Исследование противоопухолевой активности вилкоподобных миРНКаз на опухолевой модели у мышей.

Противоопухолевый потенциал миРНК-21-направленной FC исследовали при непосредственном введении соединений мышам *in vivo*. Для определения оптимального режима введения миРНКазы предварительно анализировали биораспределение и кинетику накопления Су-5.5-меченого шпилечного олигонуклеотида Су5.5-21-F-ON на ксенографтной модели эпидермоидной карциномы KB-8-5 (Рис. 13).

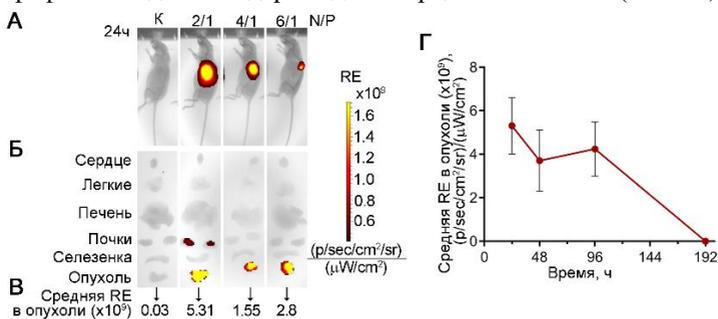


Рис. 13. Биораспределение Су5.5-меченого олигонуклеотида Су5.5-21-F-ON в мышам линии nude с опухолью KB-8-5. А, Б – демонстрационные изображения флуоресцентной визуализации мышей линии nude с опухолью KB-8-5 в боковой проекции (А) и извлеченных органов (Б) через 24 ч после перитуморального

введения Су5.5-21-F-ON в комплексе с липосомами F при соотношении N/P 2/1, 4/1 и 6/1. Контроль – интактные мыши. (В) Средняя радиантная эффективность (RE) в опухоли. Г – динамика относительной флуоресценции в опухоли KB-8-5 у мышей в течение 192 ч после перитуморального введения Су5.5-21-F-ON в комплексе с липосомами F (N/P = 2/1). Ср. знач ± ст. ошибка.

Для этого мышам с подкожно-имплантированными опухолями перитуморально вводили олигонуклеотид (10 мкг/мышь) в комплексе с фолат-содержащими катионными липосомами F. Методом флуоресцентной визуализации *in vivo* выяснили, что липopleксы с соотношением N/P = 2/1 обеспечивают наибольшее накопление олигонуклеотида в опухоли, сохраняющееся на высоком уровне до 96 ч (Рис. 13).

На основании полученных данных был выбран протокол, включающий три перитуморальные инъекции FC в комплексе с липосомами F с интервалом в три дня (Рис. 14 А). Анализ динамики роста опухоли KB-8-5 показал, что введение 21-FC-βр (5 мкг/мышь) приводит к замедлению роста опухоли на 50% (Рис. 14 Б).

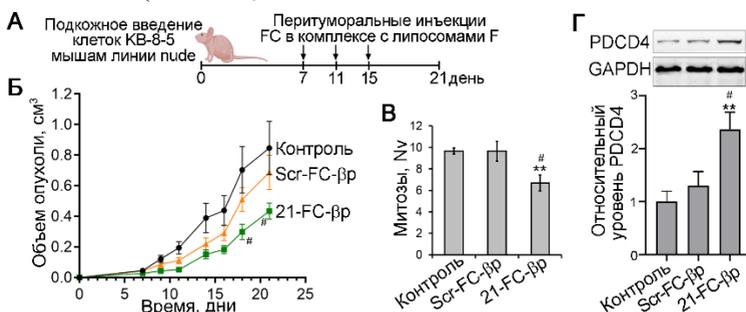


Рис. 14. Противоопухолевое действие миРНК-21-направленной FC. А – схема эксперимента, включающая подкожную трансплантацию клеток KB-8-5 мышам линии nude (n=5) и перитуморальные инъекции 21-FC-βр и Scr-FC-βр (5 мкг/мышь) в комплексе с липосомами F (N/P =2/1) на 7, 11 и 15 дни после трансплантации клеток. Б – динамика роста опухоли. Контроль – мыши, получавшие инъекции среды Орти-МЕМ без липopleксов. В – численная плотность митозов (Nv) в опухолевой ткани после терапии FC (морфометрический анализ). Г – уровень белка PDCD4 в лизате опухоли KB-8-5 после терапии FC. Результаты Вестерн-блот анализа. Уровень PDCD4 нормировали на белок GAPDH. Ср. знач ± ст. ошибка. **p ≤ 0.01 и #p ≤ 0.05 по сравнению с группой контроля и Scr-FC-βр, соответственно (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Тьюки).

Гистологический анализ срезов опухоли выявил снижение митотической активности клеток на 30% в ответ на терапию миРНК-21-направленной миРНКазой 21-FC-βр (Рис. 14 В). Кроме того, методом Вестерн- блот анализа показано повышение уровня белка PDCD4, являющегося прямой мишенью миРНК-21, в опухолевой ткани (Рис. 14 В). Гистологический анализ печени и почек мышей после завершения терапии

показал, что ни развитие карциномы, ни введение миРНКаз не вызывало патологических изменений морфологии этих органов.

Заключение

В работе разработаны и исследованы миРНКазы нового дизайна, предназначенные для селективного подавления онкогенных миРНК. Показано, что миРНКазы обладают автономной каталитической активностью и способны к расщеплению миРНК-мишеней в условиях многооборотной реакции, а также эффективно реализуют деградацию миРНК с привлечением эндогенной РНКазы H1.

Комплексный анализ рибонуклеазной активности структурных вариантов миРНКаз позволил сформулировать ключевые принципы их рационального конструирования, включающие формирование неразрывного гетеродуплекса с миРНК-мишенью, присоединение каталитических пептидов через 5'-фосфатную группу посредством аминоксильного линкера, введение двух каталитических доменов с их пространственным разграничением, а также наличие чувствительных сайтов в последовательности миРНК. Установлено, что совместное действие миРНКаз и РНКазы H1 сопровождается выраженным синергическим эффектом, приводящим к многократному ускорению деградации миРНК-мишеней, причем их разрушение происходит по всей длине молекулы.

Исследования биологической активности продемонстрировали, что наиболее активные миРНКазы обеспечивают селективное снижение уровней онкогенных миРНК, что приводит к подавлению пролиферативной и миграционной активностей опухолевых клеток *in vitro* и выраженному противоопухолевому эффекту *in vivo* на ксенографтных моделях на мышах. Совокупность полученных результатов подтверждает высокий терапевтический потенциал миРНКаз и обосновывает перспективность их дальнейшей оптимизации в качестве противоопухолевых агентов.

Выводы

1. Разработано четыре серии миРНКаз на основе конъюгатов адресующего олигонуклеотида с пептидом (LRLRG)₂: двойные (DC), петлеобразующие (BC), крабоподобные (CC) и вилкоподобные (FC), различающиеся структурой адресующего домена, количеством и способом присоединения каталитических пептидов и их позиционированием относительно функциональных доменов миРНК-мишени. Показано, что эффективность комплексообразования миРНКаз с мишенью определяется структурой олигонуклеотидного домена: миРНКазы с прерывистыми гетеродуплексами, формирующие 5-нуклеотидный гзп (DC) или 3-нуклеотидную петлю (BC) достигают эффективного связывания при введении 2-аминоаденинов и/или увеличении суммарной длины

гетеродуплекса до 17-20 нуклеотидов, тогда как миРНКазы с непрерывными гетеродуплексами (СС и FC) обеспечивают высокую аффинность при длине комплементарного участка 13-14 нуклеотидов.

2. Анализ рибонуклеазной активности миРНКаз различной структуры показал:

- миРНКазы с концевым расположением каталитических пептидов (СС и FC) расщепляют миРНК на 1-2 порядка эффективнее, чем конструкции с внутренним расположением пептидов (BC и DC);

- наиболее активные структурные варианты миРНКаз (СС и FC) функционируют в многооборотном режиме;

- введение в структуру второго каталитического пептида (СС и BC) увеличивает рибонуклеазную активность миРНКаз;

- конъюгирование пептида посредством аминоксильного линкера к 5'- и 3'-фосфату олигонуклеотида обеспечивает более высокую рибонуклеазную активность конъюгата, чем присоединение к С1'-положению дезоксирибозы;

- наличие в последовательности миРНК С-А и U-А связей в области, доступной для каталитической атаки пептидов, увеличивает скорость расщепления мишени.

3. Установлено синергическое взаимодействие разработанных миРНКаз с РНКазой H1, приводящее к расщеплению миРНК-мишени по всем функциональным доменам:

- для миРНКаз, формирующих пространственно разделенные сайты связывания с РНКазой H1 (DC и моно-пептидных BC), наблюдается максимальное увеличение скорости расщепления миРНК – до 120 раз, однако количественная деградация мишени не достигается даже за 72 ч;

- для миРНКаз с собственной высокой рибонуклеазной активностью (СС, FC и бис-пептидные BC) наблюдается наибольшая скорость расщепления, обеспечивающая количественное разрушение мишени за 8–24 ч.

4. МиРНКазы с высокой каталитической активностью (СС и FC), направленные к миРНК-21 и миРНК-17, обеспечивают селективное снижение уровней миРНК-мишеней в опухолевых клетках MCF-7 и KB-8-5, что приводит к подавлению пролиферативной и миграционной активностей клеток, а также ингибированию роста опухолей у мышей *ex vivo* и *in vivo* на 50-85%. Установлена прямая корреляция между рибонуклеазной активностью миРНКаз, степенью подавления онкогенных миРНК в опухолевых клетках *in vitro* и уровнем торможения роста опухоли *in vivo*.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. Patutina O.A., Chiglintseva D.A., Bichenkova E.V., Gaponova S.K., Mironova N.L., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Dual miRNases for triple incision of miRNA target: design concept and catalytic performance // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – № 10. – P. 2459. DOI: 10.3390/molecules25102459.
2. Patutina O.A.*, Chiglintseva D.A.*, Amirloo B., Clarke D.J., Gaponova S.K., Vlassov V.V., Bichenkova E.V., Zenkova M.A. Bulge-forming miRNases cleave oncogenic miRNAs at the central loop region in a sequence-specific manner // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23. – № 12. – P. 6562. DOI: 10.3390/ijms23126562. * – авторы внесли равный вклад в работу.
3. Chiglintseva D.A., Clarke D. J., Sen'kova A.V., Heyman T., Miroshnichenko S.K., Shan F., Vlassov V.V., Zenkova M.A., Patutina O.A., Bichenkova E.V. Engineering supramolecular dynamics of self-assembly and turnover of oncogenic microRNAs to drive their synergistic destruction in tumor models // *Biomaterials*. – 2024. – Vol. 309. – P. 122604. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2024.122604.
4. Chiglintseva D.A., Patutina O.A., Zenkova M.A. Endogenous ribonucleases: therapeutic targeting of the transcriptome through oligonucleotide-triggered RNA inactivation // *Biomolecules*. – 2025. – Vol. 15. – №7. – P. 965. DOI: 10.3390/biom15070965.

Работа выполнена при поддержке бюджетного финансирования ИХБФМ СО РАН (проект № 121031300044-5) и грантов РФФ № 19-14-00250, № 19-14-00250 П и № 19-74-30011