РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины

На правах рукописи

Гапонова Светлана Константиновна

СИКВЕНС-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИД-ПЕПТИДНЫЕ КОНЪЮГАТЫ И N-(МЕТАНСУЛЬФОНИЛ)ФОСФОРАМИДНЫЕ АНАЛОГИ АНТИСМЫСЛОВЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ КАК ИНГИБИТОРЫ ОНКОГЕННЫХ миРНК *IN VITRO* И *IN VIVO*

03.01.04 - Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

> Научный руководитель к.б.н. Патутина О.А.

Новосибирск – 2020

Содержание

Список сокращений	7
Введение	9
Глава 1. Направленная регуляция активности опухоль-ассоциированных миРНК под дет различных вариантов олигонуклеотидных конструкций (Обзор литературы)	і́ствием 16
1.1 Различные сценарии биогенеза миРНК	16
1.2 Внутриклеточные механизмы утилизации миРНК	
1.3 Роль миРНК при онкологических заболеваниях	20
1.4 Стратегии управления активностью миРНК, основанные на применении терапевти нуклеиновых кислот	іческих 26
1.5 Препараты на основе нуклеиновых кислот для терапии миРНК-ассоциированных онкологических заболеваний, находящиеся в клинических испытаниях	
1.6 Комбинации препаратов на основе нуклеиновых кислот для модуляции активност миРНК в опухолевых клетках	и 33
1.6.1 Комбинации миРНК-направленных олигонуклеотидов для одновременного подавления нескольких событий канцерогенеза	
1.6.2 Комбинации миРНК-мимиков для терапевтического воздействия на определен функцию клеток	аную 37
1.6.3 Комбинации препаратов, направленных на модуляцию опухолеассоциированн миРНК, и цитостатиков для преодоления лекарственной устойчивости опухолевых	ых клеток 39
1.7 Заключение	
Глава 2. Экспериментальная часть	
2.1 Материалы	
2.1.1 Реактивы и препараты	
2.1.2 Оборудование	
2.1.3 Олигонуклеотиды и олигонуклеотид-пептидные конъюгаты	
2.1.4 Буферы и растворы	49
2.1.5 Трансфицирующие агенты	49
2.1.6 Клеточные культуры	49
2.1.7 Лабораторные животные	50
2.2 Методы	50
2.2.1 Гель-Электрофорез	50
2.2.1.1 Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в нативных условиях	50
2.2.1.2 Электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях	50

2.2.2 Введение радиоизотопной метки по 5'-концу миРНК с использованием полинуклеотидкиназы	51
2.2.3 Исследование гибридизационных свойств олигонуклеотидов и олигонуклеотид- пептидных конъюгатов методом задержки в геле	51
2.2.4 Анализ термостабильности комплексов олигонуклеотидов с миРНК	51
2.2.5 Исследование эффективности расщепления миРНК олигонуклеотид-пептидными конъюгатами	52
2.2.6 Исследование эффективности расщепления миРНК в гетеродуплексах с олигонуклеотид-пептидными конъюгатами и химически модифицированными олигонуклеотидами в присутствии РНКазы Н	52
2.2.6.1 Исследование эффективности расщепления миРНК под действием РНКазы Н в гетеродуплексе с олигонуклеотид-пептидными конъюгатами	52
2.2.6.2 Исследование эффективности расщепления миРНК под действием РНКазы Н в гетеродуплексе с антисмысловыми олигонуклеотидами	53
2.2.7 Частичный гидролиз РНК в денатурирующих условиях	53
2.2.7.1 Частичное расщепление 5'-[³² Р]-миРНК-21 РНКазой Т1	53
2.2.7.2 Частичное расщепление 5'-[³² P]-миРНК-21 в имидазольном буфере	53
2.2.8. Анализ эффективности гибридизации и расщепления миРНК	54
2.2.9 Исследование стабильности химически модифицированных олигонуклеотидов и олигонуклеотид-пептидных конъюгатов в ростовой среде и сыворотке крови мышей	54
2.2.9.1 Приготовление сыворотки крови мышей	54
2.2.9.2 Исследование нуклеазоустойчивости олигонуклеотидов и олигонуклеотид-	
пептидных конъюгатов	54
2.2.10 Приготовление комплексов катионных липосом и нуклеиновых кислот	55
2.2.11 Трансфекция опухолевых клеток олигонуклеотидами и олигонуклеотид-пептидным конъюгатами	ми 55
2.2.12 Выделение суммарной клеточной РНК из опухолевых клеток и ткани	56
2.2.13 Исследование влияния олигонуклеотид-пептидных конъюгатов и химически модифицированных олигонуклеотидов на пролиферацию опухолевых клеток в режиме реального времени с помощью системы xCelligence	57
2.2.14 Исследование влияния олигонуклеотид-пептидных конъюгатов на инвазивные свойства опухолевых клеток с использованием матригеля и системы xCelligence	57
2.2.15 Исследование влияния олигонуклеотид-пептидных конъюгатов и химически модифицированных олигонуклеотидов на миграционную активность опухолевых клеток методом зарастания царапины (scratch теста)	58
2.2.16 Исследование индукции апоптоза в опухолевых клетках под действием олигонуклеотид-пептидных конъюгатов и химически модифицированных одигонуклеотидов методом окращивания клеток Appexip V-FITC/PI	58
у · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	

2.2.17 Исследование противоопухолевой активности олигонуклеотид-пептидных конъюгатов <i>ex vivo</i>	59
2.2.18 Исследование биораспределения химически модифицированных олигонуклео	тидов 59
2.2.19 Исследование противоопухолевой активности модифицированных олигонукл <i>in vivo</i>	еотидов 60
2.2.20 Определение уровня миРНК в опухолевых клетках и опухолевой ткани метод количественной ОТ-ПЦР	ом 60
2.2.20.1 Обратная транскрипция	60
2.2.20.2 ПЦР в режиме реального времени	61
2.2.21 Определение уровня белков-мишеней миРНК в опухолевых клетках и опухол ткани методом Вестерн блот гибридизации	евой 61
2.2.21.1 Приготовление лизата из опухолевых клеток и опухолевой ткани	61
2.2.21.2 Вестерн блот гибридизация	61
2.2.22 Гистологический анализ опухолевых тканей и внутренних органов мышей постерапии химически модифицированными олигонуклеотидами	сле 62
2.2.23 Статистический анализ данных	63
Глава 3. Сиквенс-специфические олигонуклеотид-пептидные конъюгаты и N- (метансульфонил)фосфорамидные аналоги антисмысловых олигонуклеотидов как ингиб онкогенных миРНК <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> (Результаты и их обсуждение)	биторы 64
3.1 Разработка миРНК-направленных олигонуклеотид-пептидных конъюгатов и иссле, их биологических свойств	дование 64
3.1.1 Исследование биологических свойств миРНК-направленных искусственных рибонуклеаз, содержащих в качестве адресующей компоненты немодифицированны олигодезоксирибонуклеотиды	ıe 65
3.1.1.1 Дизайн олигонуклеотидов, выступающих в качестве адресующей компонен миРНК-направленных иРНКаз	_{іты} 65
3.1.1.2 Исследование гибридизационных и термодинамических свойств олигонуклеотидов. Скрининг и выбор перспективных кандидатов для синтеза иРНК	аз 66
3.1.1.3 Дизайн миРНК-направленных иРНКаз	71
3.1.1.4 Исследование гибридизационных свойств иРНКаз	
3.1.1.5 Исследование рибонуклеазной активности иРНКаз в условиях однооборотн многооборотной реакций	юй и 74
3.1.1.5.1. Исследование рибонуклеазной активности иРНКаз в условиях однообор	ротной
реакции	74
3.1.1.5.2. Исследование рибонуклеазной активности иРНКаз в условиях многооборотной реакции	79
3.1.1.6 Исследование каталитической активности иРНКаз в присутствии РНКазы Н	I 80

3.1.1.7 Исспедование биодогической активности миРНК-направлении и иРНКаз на
культурах опухолевых клеток
3.1.1.7.1 Исследование нуклеазоустойчивости миРНК-направленных иРНКаз в ростовой среде в присутствии сыворотки
3.1.1.7.2 Исследование рибонуклеазной активности некомплементарного контрольного контольного 86
3.1.1.7.3 Влияние миРНК-направленных иРНКаз на уровень миРНК и её белков мишеней в клетках лимфосаркомы RLS ₄₀
3.1.1.7.4 Влияние миРНК-направленных иРНКаз на пролиферацию опухолевых клеток лимфосаркомы RLS ₄₀
3.1.1.7.5 Влияние миРНК-направленных иРНКаз на инвазию и апоптоз клеток меланомы В16
3.1.1.8 Влияние миРНК-направленных иРНКаз на рост лимфосаркомы RLS ₄₀ у мышей 92
3.1.2 Влияние модификаций рибозофосфатного остова адресующего олигонуклеотида на биологические свойства миРНК-направленных искусственных рибонуклеаз
3.1.2.1 Дизайн миРНК-направленных иРНКаз, содержащих различный паттерн 2'ОМе- модификаций в области связывания с миРНК
3.1.2.2 Исследование гибридизационных свойств миРНК-направленных 2'ОМе-иРНКаз 96
3.1.2.3. Исследование рибонуклеазной активности миРНК-направленных 2'ОМе-иРНКаз в условиях однооборотной и многообротной реакций
3.1.2.4. Исследование нуклеазоустойчивости миРНК-направленных 2'ОМе-иРНКаз в ростовой среде и в сыворотке крови мышей 101
3.1.2.5 Исследование биологической активности миРНК-направленных 2'ОМе-иРНКаз на культуре клеток эпидермоидной карциномы человека КВ-8-5
3.2 миРНК-направленные олигонуклеотиды, содержащие N- (метансульфонил)фосфорамидные (µ-) модификации межнуклеотидных связей. Сравнение с фосфотиоатными олигонуклеотидами
3.2.1 Дизайн миРНК-направленных µ-олигонуклеотидов 109
3.2.2 Исследование гибридизационных свойств µ-олигонуклеотидов
3.2.3 Исследование РНКаза Н-активирующей способности µ-олигонуклеотидов 111
3.2.4 Исследование нуклеазоустойчивости µ-олигонуклеотидов в ростовой среде 112
3.2.5 Исследование биологической активности µ-олигонуклеотидов на культуре клеток меланомы В16 мыши
3.2.5.1 Влияние µ-олигонуклеотидов на уровень миРНК в опухолевых клетках: концентрационные и кинетические параметры подавления онкогенных миРНК
3.2.5.2 Влияние μ-олигонуклеотидов на пролиферативный потенциал опухолевых клеток 116
3.2.5.3 Исследование индукции апоптоза в опухолевых клетках под действием µ- олигонуклеотидов

3.2.5.4 Влияние µ-олигонуклеотидов на миграционные свойства опухолевых клеток 118
3.2.5.5 Исследование биораспределения µ-олигонуклеотидов у мышей-опухоленосителей 120
3.2.6 Исследование биологической активности µ-олигонуклеотидов <i>in vivo</i> на модели
эпидермоидной карциномы человека КВ-8-5 121
3.2.6.1 Влияние µ-олигонуклеотидов на скорость роста опухоли КВ-8-5 у мышей 121
3.2.6.2 Определение уровня миРНК-21 и её белков-мишеней в опухолевой ткани после
терапии μ-олигонуклеотидами
3.2.7 Гистологический анализ опухолей KB-8-5 после терапии µ-олигонуклеотидами 125
3.2.8 Оценка токсичности µ-олигонуклеотидов 127
Заключение
Выводы
Список литературы 141
Приложение

2'F	_	2'-фтор модификация
2'MOE	-	2'метоксиэтильная модификация
2'OMe	_	2'О-метильная модификация
μ	_	N-(метансульфонил)фосфорамидная модификация
asON	_	антисмысловой олигонуклеотид
CRISPR	_	короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные
		группами (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)
Cy5.5	_	флуорофор Cyanine 5.5
DEPC	_	диэтилпирокарбонат
DMEM	_	культуральная среда Дульбекко в модификации Игла (Dulbecco's
		Modified Eagle Medium)
DTT	_	дитиотреитол
EDTA	_	этилендиаминтетрауксусная кислота
FBS	_	бычья эмбриональная сыворотка
FITC	_	флуоресцеин изотиоционат
IMDM	_	культуральная среда Дульбекко в модификации Искова (Iscove's
		Modified Dulbecco's Medium)
LNA	_	замкнутая нуклеиновая кислота (locked nucleic acid)
LSM	_	среда для разделения лимфоцитов (lymphocyte separation medium)
miRISC	_	миРНК-индуцируемый комплекс выключения гена (microRNA-
		induced silencing complex)
Mtg-AMO	_	мультитаргетный анти-миРНК олигонуклеотид
MTT	_	3-(4,5-диметилтиазолил)-2,5-дифенилтетразолиум бромида
ON	_	олигонуклеотид
PBS	_	фосфатно-солевой буфер
PI	_	йодид пропидия
PNA	_	пептидил-нуклеиновая кислота (peptide nucleic acid)
PS	_	фосфотиоатная модификация
PSA	_	персульфат аммония
Pyr	_	пиримидин
SDS	_	додецил натрия
siPHK	_	малая интерфирирующая рибонуклеиновая кислота
TBE	_	трис-борат-EDTA буфер

Список сокращений

TDMD	_	РНК-направленная миРНК деградация (target RNA-directed miRNA
		degradation)
TEMED		N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин
TGB	_	трис-глициновый буфер
АЛТ	_	аланинаминотрансфераза
ACT	_	аспартатаминотрансфераза
БОЕ	_	бляшкообразующая единица
БЭС	_	бычья эмбриональная сыворотка
ВЭЖХ	_	высокоэффективная жидкостная хроматография
ΓΤΦ	_	гуанозинтрифосфат
Д.	_	дорожка
ДЭТА	_	диэтилентриамин
ДНК	_	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	_	дезоксирибонуклеаза
иРНКаза	_	искусственная рибонуклеаза
кПЦР	_	количественная полимеразная цепная реакция
мРНК	-	матричная рибонуклеиновая кислота
миРНК	_	микрорибонуклеиновая кислота, микроРНК
мяРНК	_	малая ядерная рибонуклеиновая кислота
Н.	_	нуклеотид
нкРНК	-	некодирующая рибонуклеиновая кислота
ОПК	-	олигонуклеотид-пептидный конъюгат
OT	_	обратная транскрипция
П.Н.	_	пара нуклеотидов
ΠΑΑΓ	_	полиакриламидный гель
ПЦР	_	полимеразная цепная реакция
РНК	_	рибонуклеиновая кислота
РНКаза	_	рибонуклеаза
Трис	_	трис-(гидроксиметил)-аминометан
тРНК	_	транспортная рибонуклеиновая кислота

Введение

Актуальность темы исследования и степень её разработанности

Одним из важнейших открытий в биологии прошлого столетия является выявление некодирующих РНК (нкРНК) – РНК-транскриптов, последовательности которых не транслируются в белки, а выполняют в клетках и организме регуляторные функции и являются важнейшими участниками основных клеточных процессов [1]. В результате многочисленных исследований было обнаружено около десяти разных типов нкРНК, среди которых особое внимание заслужили микроРНК (миРНК) - короткие регуляторные молекулы РНК длиной 18-25 нуклеотидов, которые посредством формирования с мРНК-мишенью полностью комплементарного или частично комплементарного комплекса, контролируют её процессинг и функционирование путём деградации мишени или блокирования её трансляции [2-4]. Многочисленные исследования выявили, что мишенями миРНК являются ключевые участники таких фундаментальных физиологических процессов как пролиферация, дифференциация, апоптоз, миграция, адгезия и ангиогенез [5–7], иными словами, миРНК отведена весомая роль в регуляции и управлении жизнедеятельностью не только клеток, но и целого организма [8]. Нарушение баланса в экспрессии миРНК приводит к глобальной реорганизации процессов, определяющих нормальное функционирование клетки, и, нередко, способствует инициации и прогрессированию целого ряда трудноизлечимых заболеваний, включая диабет, сердечнососудистые, нейродегенеративные и онкологические заболевания [9,10]. При развитии неоплазий в зависимости от роли миРНК исследователи выделяют онкогенные миРНК, способствующие прогрессированию заболевания путём подавления генов-супрессоров опухолей, и онкосупрессорные миРНК, препятствующие формированию злокачественных образований, путем подавления экспрессии онкогенов [11,12]. В большинстве случаев, развитие неоплазий ассоциировано с повышением экспрессии ряда онкогенных миРНК И одновременным снижением уровня онкосупрессорных миРНК [13–15].

Учитывая важную роль миРНК в развитии широкого спектра патологий человека, учеными прилагаются значительные усилия в направлении создания различных средств регуляции активности миРНК. Такие миРНК-регулирующие препараты направлены либо на подавление гиперфункции излишних миРНК, либо восполнение активности утраченных миРНК [7,16,17]. Эффективным способом терапии миРНК-ассоциированных заболеваний может служить регуляция уровня и активности миРНК в клетке с помощью терапевтических нуклеиновых кислот. Такие специфические ингибиторы способны подавлять функции патогенных миРНК либо за счёт непосредственного связывания с ними, либо путём блокирования взаимодействия между миРНК и её мРНК-мишенью [18–20]. За последние два десятилетия разработано несколько типов миРНК-направленных олигонуклеотидных конструкций, среди которых наиболее широкое применение получили антисмысловые олигонуклеотиды (asON). asON, являясь одноцепочечными фрагментами ДНК, комплементарно связываются с миРНК и либо блокируют её функции, либо вызывают деградацию миРНК под действием внутриклеточной РНКазы Н [6,17,21].

Первые миРНК-направленные антисмысловые олигонуклеотиды представляли собой обычные олигодезоксирибонуклеотиды, эффективность действия которых как в клетках *in vitro*, так и на опухолевых моделях *in vivo* была невысокой вследствие их быстрой деградации внутриклеточными нуклеазами [17]. Для увеличения эффективности миРНК-направленных asON исследователями были разработаны различные химические модификации сахарофосфатного остова, что позволило многократно повысить биологическую активность олигонуклеотидов за счёт улучшения нуклеазоустойчивости, гибридизационных свойств и проникать в клетки. В частности, использование фосфотиоатной (PS) способности модификации (полной или частичной) обеспечивает высокую нуклеазоустойчивость олигонуклеотидов и способность проникать в клетки в отсутствие доставляющих агентов [22,23]. Кроме того, несомненным достоинством PS-модификации является способность при связывании с РНК-мишенью активировать РНКазу Н, то есть, не только блокировать миРНК за счет связывания с ней, но и вызывать ее деградацию [24]. Введение в структуру asON 2'ОМетильных групп или звеньев, представленных, так называемыми, замкнутыми (LNA) или пептидил нуклеиновыми кислотами (PNA) многократно улучшают гибридизационные свойства олигонуклеотидов и обеспечивают их повышенную нуклеазоустойчивость. Несмотря на ряд полезных свойств, введение в asON модификаций нередко вызывает и нежелательные эффекты. Так, например, фосфотиоатные олигонуклеотиды менее эффективно связываются с мишенями по сравнению с олигодезоксирибонуклеотидами и обладают сравнительно высокой токсичностью из-за неспецифического связывания с клеточными белками [25]. Гетеродуплексы миРНК с полностью модифицированными 2'ОМетильными, LNA и PNA олигонуклеотидами не способны рекрутировать РНКазу Н в клетке и инактивируют миРНК-мишень только за счет прочного связывания с ней [26]. Таким образом, поиск новых модификаций asON, объединяющих в себе наибольшее количество благоприятных характеристик для создания эффективных миРНК-направленных препаратов на основе олигонуклеотидов, обладающих терапевтически значимой биологической активностью, остаётся актуальной и важной задачей на сегодняшний день.

Помимо антисмысловой технологии, перспективным подходом к регуляции уровня миРНК может стать создание миРНК-направленных искусственных рибонуклеаз (иРНКаз),

способных распознавать миРНК-мишень с помощью адресующего олигонуклеотидного домена и вызывать её избирательную деградацию с помощью присоединенной к адресующему олигонуклеотиду каталитической группы. Данный подход представляет большой научный и практический интерес, поскольку может обеспечить необратимую селективную деградацию патогенных миРНК.

В настоящее время в области создания сиквенс-специфических иРНКаз уже получены интересные результаты, указывающие на перспективность данного направления [27-32]. Однако большинство сконструированных на сегодняшний день иРНКаз направлено на расщепление искусственно созданных РНК-субстратов или модельных РНК, тогда как иРНКаз, ориентированных на инактивацию терапевтически значимых мишеней практически не описано [28,31–34]. К моменту начала данной работы было опубликовано лишь две статьи, описывающие эффективную деградацию синтетических миРНК под действием сиквенсспецифических иРНКаз на основе PNA олигонуклеотида и пептида [His(Gly)₂] [27] и конъюгата РNА олигонуклеотида и трис(2-аминобензимидазола) [29]. Ранее в ЛБНК ИХБФМ СО РАН были всесторонне исследованы конъюгаты олигонуклеотидов, комплементарных фенилаланиновой тРНК, и пептидов [LeuArg]₄Gly-NH₂ или [(LeuArg)₂Gly]₂, и была показана высокая эффективность расщепления РНК-мишени под их действием [31,32]. Принимая во внимание высокую каталитическую активность этих олигонуклеотид-пептидных конъюгатов, представлялось интересным создать подобные сиквенс-специфические иРНКазы для подавления онкогенных миРНК в опухолевых клетках и in vivo.

Цели и задачи

Целью настоящей работы являлась разработка и исследование биологических свойств двух типов миРНК-направленных препаратов на основе олигонуклеотидов: олигонуклеотидпептидных конъюгатов и антисмысловых олигонуклеотидов, содержащих новую N-(метансульфонил)фосфорамидную (µ-) модификацию.

В ходе работы решались следующие задачи:

- Разработка структуры миРНК-направленных олигонуклеотид-пептидных конъюгатов путем отбора адресующих олигодезоксирибонуклеотидов по эффективности их связывания с миРНК-мишенью и анализ их гибридизационных свойств.
- Исследование рибонуклеазной активности олигонуклеотид-пептидных конъюгатов *in vitro* в условиях однооборотной и многооборотной реакции, а также в присутствии РНКазы Н. Выяснение факторов, определяющих эффективное расщепление миРНК-мишени под действием конъюгатов.

- 3. Исследование биологической активности способности эффективно и селективно подавлять миРНК-21, олигонуклеотид-пептидных конъюгатов. Изучение терапевтического потенциала олигонуклеотид-пептидных конъюгатов в культивируемых опухолевых клетках *in vitro* и на опухолевой модели у мышей.
- 4. Исследование влияния модификации олигонуклеотидной компоненты олигонуклеотидпептидных конъюгатов на их рибонуклеазную активность и биологические свойства.
- гибридизационных свойств, нуклеазоустойчивости H-5. Исследование И РНКаза активирующей способности миРНК-направленных олигонуклеотидов, содержащих N-(метансульфонил)фосфорамидную модификацию, В сравнении с природными И фосфотиоатными олигонуклеотидами.
- Исследование биологической активности N-(метансульфонил)фосфорамидных антисмысловых олигонуклеотидов. Изучение биораспределения и терапевтического потенциала миРНК-21-направленных N-(метансульфонил)фосфорамидных олигонуклеотидов в культивируемых опухолевых клетках *in vitro* и на опухолевой модели у мышей.

Научная новизна полученных результатов

В рамках работы впервые сконструированы и исследованы олигонуклеотид-пептидные конъюгаты, осуществляющие сиквенс-специфическое расщепление биологически значимой миРНК-мишени – миРНК-21. Продемонстрировано, что миРНК-направленные искусственные рибонуклеазы обладают высокими гибридизационными свойствами и нуклеазоустойчивостью, а также расщепляют миРНК в каталитическом режиме. Установлено, что скорость и миРНК эффективность деградации мишени под действием миРНК-направленных искусственных рибонуклеаз многократно возрастает в присутствии РНКазы Н, указывая на синергизм действия ферментов. Впервые показано, что введение 2'ОМе-модификаций в состав олигонуклеотидной компоненты миРНК-направленных улучшает конъюгатов гибридизационные свойства и рибонуклеазную активность конъюгатов и не влияет на их способность подавлять пролиферацию и миграцию опухолевых клеток. Установлено, что за счёт специфического подавления миРНК-21 олигонуклеотид-пептидные конъюгаты снижают пролиферативный и инвазивный потенциал опухолевых клеток, а также способствуют переходу опухолевых клеток в состояние апоптоза. Выявлено, что даже однократная обработка опухолевых клеток разработанными олигонуклеотид-пептидными конъюгатами обеспечивает многократное снижение скорости опухолевого роста у мышей.

В рамках работы впервые созданы и исследованы свойства миРНК-направленных антисмысловых олигонуклеотидов, содержащие новую N-(метансульфонил)фосфорамидную

модификацию межнуклеотидных связей. Впервые показано, что олигонуклеотиды, несущие µмодификацию на каждом межнуклеотидном атоме фосфора, обладают исключительной нуклеазоустойчивостью и высокими гибридизационными свойствами, которые многократно превышают эти характеристики для фосфотиоатных аналогов. Впервые установлено, что гетеродуплексы миРНК с µ-олигонуклеотидами являются субстратом РНКазы H. Продемонстрировано, что за счёт специфического снижения уровня миРНК-21 μолигонуклеотиды обеспечивают значительное снижение пролиферации и миграции опухолевых клеток, а также стимулируют переход опухолевых клеток в состояние апоптоза. Впервые показано, что при перитюморальном введении ц-олигонуклеотиды не оказывают токсического эффекта на организм животных, эффективно накапливаются в опухоли и обеспечивают многократное снижение скорости роста опухоли у мышей.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Впервые разработаны миРНК-направленные олигонуклеотид-пептидные конъюгаты и всесторонне исследованы их биологические свойства *in vitro* и *in vivo*. Показана способность миРНК-направленных искусственных рибонуклеаз расщеплять миРНК в каталитическом режиме и работать синергически с РНКазой Н. Полученные данные позволили сформулировать принципы дизайна миРНК-направленных олигонуклеотид-пептидных конъюгатов на основе немодифицированной ДНК и 2'ОМе-олигонуклеотидов.

Впервые исследованы биологические свойства антисмысловых олигонуклеотидов, содержащих новую N-(метансульфонил)фосфорамидную модификацию межнуклеотидных связей. Установлено, что олигонуклеотиды с µ-модификацией многократно превосходят по эффективности связывания, нуклезоустойчивости, РНКаза H-активирующей способности, а также противоопухолевому действию *in vivo* широко применяемые фосфотиоатные олигонуклеотиды.

Установлено, что µ-модификация, вводимая в состав препаратов на основе нуклеиновых кислот, является перспективным кандидатом для преклинических исследований и выступает в качестве многообещающей альтернативы фосфотиоатной модификации при создании гапмерных и полностью модифицированных олигонуклеотидных конструкций.

Показана перспективность использования N-(метансульфонил)фосфорамидных антисмысловых олигонуклеотидов и олигонуклеотид-пептидных конъюгатов, направленных к онкогенной миРНК-21, в качестве прототипов лекарственных препаратов для терапии миРНК-ассоциированных заболеваний, в частности, онкологических.

13

Основные положения, выносимые на защиту

- Для эффективного связывания шпилечных олигонуклеотид-пептидных конъюгатов (ОПК) с миРНК-21 длина участка, комплементарного миРНК, в олигонуклеотидной компоненте должна быть 14-16 нуклеотидов.
- ОПК с пептидом [(LeuArg)₂Gly]₂, присоединенным по 5'-концу адресующего олигонуклеотида, осуществляют эффективное металл-независимое расщепление миРНК-21 преимущественно по связям после остатков гуанина. Скорость расщепления миРНК-21 5'-ОПК возрастает в присутствии РНКазы Н. Разработанные 5'-ОПК и РНКаза Н действуют синергически.
- 5'-ОПК проявляют высокий антипролиферативный, про-апоптотический и противоинвазивный эффект на клетках лимфосаркомы RLS₄₀ и меланомы B16 *in vitro* и обеспечивают многократное снижение скорости роста лимфосаркомы RLS₄₀ *in vivo*.
- Частичная 2'ОМе-модификация олигонуклеотидной компоненты 5'-ОПК в области связывания с миРНК способствует улучшению их гибридизационных свойств и рибонуклеазной активности, но не влияет на способность ОПК подавлять пролиферацию и миграцию клеток эпидермоидной карциномы человека КВ-8-5.
- N-(метансульфонил)фосфорамидные (μ-) олигонуклеотиды эффективно связываются с миРНК-21, обладают высокой нуклеазоустойчивостью и в гетеродуплексе с миРНК активируют РНКазу Н.
- миРНК-21-направленные μ-олигонуклеотиды обладают высоким антипролиферативным, про-апоптотическим и антимиграционным потенциалом на клетках меланомы B16. При перитюморальном введении μ-олигонуклеотиды эффективно накапливаются в опухоли и многократно снижают скорость роста опухоли эпидермоидной карциномы человека KB-8-5 у мышей линии SCID за счёт длительного специфического снижения уровня миРНК-21 в опухоли, не оказывая токсического эффекта на организм животных.

Апробация работы и публикации

По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ. Результаты работы представлены на 10 международных конференциях: "МНСК-2015" (Новосибирск, 2015), "МНСК-2016" (Новосибирск, 2016), "Химическая биология-2016" (Новосибирск, 2016), международном семинаре "Targeting RNA world" (Санкт-Петербург, 2016), международной конференции "Ломоносов-2017" (Москва, 2017), "МНСК-2017" (Новосибирск, 2017), 43-м конгрессе FEBS и 18-м форуме молодых ученых FEBS (Прага, 2018), 5-м международном семинаре "Targeting RNA world" (Санкт-Петербург, 2018), научной конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов "Open Bio 2018" (Новосибирск,

2018) и всероссийской мультиконференции с международным участием "Биотехнология – медицине будущего" (Новосибирск, 2019).

Личный вклад автора

Представленные в работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследования, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов. Планирование, анализ и обсуждение результатов работы проведено под руководством к.б.н. О.А. Патутиной. Идеологическое планирование работы проведено совместно с д.б.н., проф. М.А. Зенковой. Термодинамический анализ проведён к.ф.-м.н. А.А. Ломзовым (Лаборатория биомедицинской химии, ИХБФМ СО РАН). Разработка протокола синтеза и синтез олигонуклеотид-пептидных коньюгатов проведены Dr. А. Вильямсом и проф. Е.В. Биченковой в Университете Манчестера в Великобритании (the University of Manchester, School of Health Sciences, Division of Pharmacy& Optometry). Синтез химически модифицированных олигонуклеотидов был проведён к.х.н. Е.А. Бураковой (ЛХНК, ИХБФМ СО РАН). Анализ биораспределения олигонуклеотидов и гистологический анализ проведён Д.В. Гладких и к.м.н. А.В. Сеньковой, соответственно (Лаборатория биохимии нуклеиновых кислот, ИХБФМ СО РАН).

Объём и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Текст изложен на 170 страницах, иллюстрирован 33 рисунками, включает 13 таблиц и 1 приложение, список литературы содержит 294 библиографических источника.

Глава 1. Направленная регуляция активности опухоль-ассоциированных миРНК под действием различных вариантов олигонуклеотидных конструкций (Обзор литературы)

1.1 Различные сценарии биогенеза миРНК

Биогенез миРНК представляет собой сложный процесс, который осуществляется последовательно несколькими комплексами ферментов. В отличие от siPHK, которая попадает в клетку извне, миРНК синтезируется эндогенно либо с индивидуальных промоторов, либо совместно с белок-кодирующими последовательностями посредством РНК полимеразы II [35] (Рисунок 1). Образующийся транскрипт называется при-миРНК и содержит несколько копий миРНК, закодированных в шпилечных структурах. Каждая шпилька состоит из стебля длиной 33-35 п.н. и терминальной петли, которая распознается и специфически процессируется комплексом ферментов Drosha/DGCR8 (Рисунок 1 А). В результате действия Drosha/DGCR8 образуется короткая шпилечная РНК с 2-нуклеотидным выступающим 3'-концом – премиРНК, которая в дальнейшем транспортируется из ядра белковым комплексом EXP5/Ran и высвобождается в цитоплазме с использованием энергии гидролиза ГТФ. Дальнейшее превращение **пре-миРНК** осуществляется ферментом Dicer и включает распознавание 3'выступающего конца пре-миРНК и вырезание линейного дуплекса миРНК из структуры шпильки (Рисунок 1). В образовавшемся дуплексе цепи отличаются по степени стабильности, что определяет, какая из цепей будет ведущей и ответственной за выполнение регуляторной функции, а какая – пассажирской, в дальнейшем разрушаемой внутриклеточными экзонуклеазами. На последнем этапе биогенеза, белки семейства Адо распознают цепи и инициируют плавление дуплекса с последующей сборкой миРНК-индуцируемого комплекса выключения гена (microRNA-induced silencing complex, miRISC) и деградацией пассажирской цепи, таким образом способствуя окончательному созреванию миРНК. Далее регуляторную активность миРНК в составе комплекса miRISC контролируют белки семейства Ago [36].

Описанная выше каноническая схема биогенеза характерна для большинства миРНК, однако, некоторые молекулы формируются альтернативными путями, которые характеризуются отсутствием одного или нескольких этапов процессинга.

При Dicer-независимом пути биогенеза канонически редактированная в ядре пре-миРНК после транспортировки в цитоплазму уклоняется от процессинга белком Dicer и напрямую взаимодействует с белком Ago2 [36]. Ago2 вносит одноцепочечный разрыв в области шпильки пре-миРНК, и инициирует экзонуклеазную деградацию пассажирской цепи пре-миРНК с образованием зрелой миРНК (Рисунок 1 Б).



Рисунок 1. Биогенез, функционирование и деградация миРНК в клетках. (**A**) каноническая схема биогенеза миРНК. (**Б**) – (Γ) – неканонические пути биогенеза: (**Б**) Dicer-независимый, (**B**) Drosha-независимый и (Γ) Drosha/Dicer-независимый путь.

Другим альтернативным путём созревания миРНК является Drosha/DGCR8-независимый путь (Рисунок 1 В), в котором процессингу подвергается так называемый «миртрон» – последовательность, содержащая одну копию целевой миРНК, фланкированную донорными и акцепторными сайтами сплайсинга. В этом случае процессинг «миртрона» происходит путём сплайсинга с образованием пре-миРНК, дальнейшее созревание которой происходит по канонической схеме биогенеза [36] (Рисунок 1 В).

В литературе описан ещё один путь бионегеза, в котором отсутствуют этапы процессинга как комплексом Drosha/DGCR8, так и белком Dicer (Рисунок 1 Г). Участниками такого пути являются специфические последовательности – «аготроны», которые после транскрипции подвергаются сплайсингу в ядре клетки, а затем переносятся в цитоплазму и связываются напрямую с белками Ago, в комплексах с которыми регулируют экспрессию генов [36]. Структура и механизм действия «аготронов» до сих пор подробно не изучены, однако, предполагается, что такие последовательности либо функционируют подобно миРНК, связываясь со специфическими мишенями, либо обеспечивают стабилизацию и специфичность действия белка Ago2 в составе комплекса miRISC.

Все пути биогенеза оканчиваются образованием зрелых молекул миРНК и последующей сборкой комплекса miRISC. Такой рибонуклеопротеиновый комплекс служит каталитическим

17

мотором посттранскрипционной регуляции экспрессии генов. В состав комплекса miRISC входит несколько белков, включая TNRC6, формирующий структурный остов комплекса, а также белки Ago(1-4), Snd1 и MTDH, которые катализируют ингибирование трансляции или деградацию мPHK мишеней, находящихся в комплексе с миPHK, а также обеспечивают её защиту от действия внутриклеточных нуклеаз, определяя время жизни и функциональный период зрелой миPHK [37]. Показано, что деградация мPHK-мишеней происходит в специальных вязко-эластичных каплях, которые образуются в результате фазового перехода, инициируемого взаимодействием триптофан-богатых районов TNRC6 со специализированными карманами PIWI домена белка Ago2 [38]. В каплях концентрируются миPHK в комплексе с Ago2, соответствующая мPHK-мишень в высокой концентрации, а также другие компоненты miRISC. Кроме того, в каплях содержатся компоненты деаденилазных комплексов PAN2-PAN3 и CCR4-NOT, которые после разрезания мPHK белком Ago2 разрушают оставшиеся фрагменты мPHK, начиная с 3'-poly-A хвоста [38]. Важно отметить, что в каплях содержится только одна пара миPHK-мPHK, что свидетельствует о наличии отбора определенных молекул мPHK при фазовом переходе [38].

Следствием взаимодействия мРНК с миРНК не всегда является деградация. При связывании с белком Ago2 в последовательности миРНК выделяют три функциональных домена, соответствующих областям взаимодействия с мРНК мишенью, а именно: (1) «ключевая» («seed») область, соответствующая 2–8 н. в 5'- последовательности миРНК, (2) центральная область, соответствующая 9–12 н. миРНК, и (3) область дополнительных взаимодействий на 3'-конце миРНК (13–22 н. миРНК) [39]. Известно, что мРНК имеют разную степень комплементарности с регулирующими их миРНК, в связи с чем существует три варианта преобразований РНК в дуплексе. Когда степень комплементарности низкая, и дуплекс образуется только в «seed» области миРНК, происходит стерическое блокирование трансляции мРНК-мишени (Рисунок 1). При средней степени комплементарности связывание мРНК мишени происходит не только с «seed» областью, но и с центральной областью миРНК, в результате чего происходит деградация мРНК мишени белком Ago и деаденилазными комплексами (Рисунок 1). В случае высокой степени комплементарности, мРНК связывается с миРНК не только в «seed» области, но и формирует дополнительные взаимодействия в 3'-области миРНК, запуская процесс деградации миРНК (Рисунок 1) [39].

1.2 Внутриклеточные механизмы утилизации миРНК

В то время как процессы биогенеза и функционирования миРНК описаны в деталях, этапы внутриклеточной деградации миРНК оставались неизученными до сравнительно недавнего времени. С 2010 г. значительно возросло количество данных, свидетельствующих о том, что разрушение миРНК в клетках происходит в результате связывания с некодирующими РНК [40]. В частности, было показано, что уровень миРНК-27 значительно снижается при связывании с некодирующей уридин-богатой РНК Herpesvirus Samiris или транскриптом m169, которые попадают в клетку в результате инфицирования вирусами H. samiris и Cytomegalovirus, соответственно [41,42]. Кроме того, ингибирование миРНК было выявлено и при взаимодействии с белок-кодирующими РНК, примерами которых являются пары миРНК-30b/с и мРНК белка-ингибитора сериновых протеаз Serpine1, а также миРНК-29b и мРНК белка Nrep, связанного с регенерацией нейронов млекопитающих [43,44]. Подчёркивается, что снижение уровня миРНК ассоциировано с удлинением миРНК на несколько уридиновых или адениновых нуклеотидов на 3'-конце молекулы и последующей понуклеотидной деградацией миРНК в этой области. Такой процесс получил название РНК-направленной миРНК деградации (далее TDMD от target RNA-directed miRNA degradation). Было выявлено, что в данном процессе участвуют такие ферменты, как терминальные уридин-трансферазы (terminal uridinetransferases, далее TUT) и неканонические поли(А) полимеразы, которые обеспечивают перенос уридиновых и адениновых оснований на 3'-конец миРНК, а также 3'-экзонуклеазы (например, DIS3L2), которые способны разрушать миРНК, отщепляя по одному нуклеотиду с 3'-конца последовательности [45] (Рисунок 1). Показано, что процесс ТDMD крайне важен для нормального функционирования клеток, и его блокирование, например, вследствие подавления поли-аденилирования и уридилирования миРНК является причиной развития многих миРНКассоциированных заболеваний, включая, онкологические [46,47].

Неотъемлемым условием, определяющим эффективность TDMD, являтся высокая степень комплементарности между миРНК и её мРНК мишенью. Показано, что деградация миРНК инициируется её прочным связыванием с РНК мишенью одновременно в «seed» районе и З'-области миРНК. Даже двунуклеотидные мисматчи в этих областях могут вызывать снижение эффективности TDMD в 3 раза, а мисматч длиной 4 н. полностью блокирует деградацию миРНК. Важным условием, при котором происходит TDMD, является отсутствие связывания миРНК с мРНК в её центральной части, однако, размер некомплементарной области не должен превышать 5 н., иначе TDMD не осуществляется [48]. Таким образом, различная степень комплементарности между миРНК и мРНК лежит в основе определения пути функционирования миРНК [40].

Важным фактором, который может влиять на баланс между процессами TDMD и ингибирования мРНК мишеней, является уровень представленности миРНК в клетках. При исследовании нейрональных клеток было выявлено, что связывание низкопредставленной миРНК-132 с комплементарными мРНК мишенями инициирует TDMD, тогда как образование комплекса с высоко-экспрессирующимися миРНК, такими как миРНК-138, миРНК-128 и

миРНК-124 в тех же условиях способствует блокированию мРНК. Помимо этого, на примере миРНК-132 показано, что скорость TDMD, значительно снижается при увеличении уровня миРНК за счёт введения в клетки её синтетических мимиков [48].

Помимо этого, TDMD является некумулятивным процессом: увеличение числа сайтов связывания миРНК в последовательности мРНК не повышает скорость TDMD, а в некоторых случаях даже снижает эффективность деградации миРНК [45][48].

Важно отметить, что деградации в клетках подвергаются не только зрелые молекулы, но и предшественники миРНК, причём в этом процессе задействованы те же ферменты, что и при TDMD. В частности, было выявлено, что добавление десяти уридиновых оснований на 3'-конец пре-миРНК let-7 в результате работы ферментов TUT4/7 блокировало её дальнейший процессинг белком Dicer и индуцировало экзонуклеазную деградацию белком DIS3L2 [49–51]. Однако существуют и исключения. В некоторых случаях те же ферменты могут служить факторами, способствующими биогенезу миРНК. Так, показано, что в ряде случаев в результате процессинга ферментом Drosha образуется форма пре-миРНК-let-7, несущая однонуклеотидный выступающий 3'-конец, которая в дальнейшем не распознается и не редактируется белком Dicer. В этой ситуации, 3'-моноуридилирование пре-миРНК терминальными трансферазами обеспечивает необходимую структуру двунуклеотидного выступающего 3'-конца пре-миРНК для дальнейшего прохождения биогенеза [52].

Таким образом, TDMD представляет собой некумулятивную деградацию миРНК, выполняемую двумя типами ферментов: терминальными уридин-трансферазами и 3'экзонуклеазами, инициация активности которых происходит в результате связывания миРНК с высоко-комплементарными ей мРНК мишенями. Следует отметить, что ферменты, осуществляющие TDMD, могут взаимодействовать с белками семейства Ago [45], а также в некоторых случаях выступают в качестве факторов биогенеза миРНК, что свидетельствует о корегуляции процессов биогенеза, функционирования и деградации миРНК.

1.3 Роль миРНК при онкологических заболеваниях

За последние два десятилетия опубликовано множество данных, свидетельствующих о важной роли миРНК в регуляции большинства клеточных функций, и показано, что нарушение экспрессии миРНК нередко приводит к инициации и развитию различных заболеваний, в том числе, онкологических [10,53]. Исследователи выделяют онкогенные миРНК, которые способствуют опухолевой прогрессии, и онкосупрессорные миРНК, которые препятствуют развитию патологических состояний [11,12]. Процесс злокачественной трансформации представляет собой сложный каскад реакций и сопровождается, как показали современные экспериментальные данные, снижением уровня онкосупрессорных миРНК и гиперэкспрессией онкогенных миРНК. Так, например, инициация онкологических заболеваний в ряде случаев связана с увеличением уровня и активности онкогенных миРНК-106b, миРНК-25, а также миРНК из кластера миРНК-17~92, которые контролируют клеточный цикл, усиливают пролиферацию опухолевых клеток, а также стимулируют метастазирование за счёт регуляции мРНК таких белков как, белок ретинобластомы RB, белок аденоматозного полипоза coli APC, белок из семейства сигнальных передатчиков трансформирующего фактора роста β – Smad7 (миРНК-106b), про-апоптотический белок Bim, белок рецептора смерти 4 DR4, Е-кадгерин (миРНК-25), фактор транскрипции E2F1, белок-гомолог фосфатазы и тензина PTEN и опухолевый белок p-53-индуцируемого ядерного белка 1 TP53INP1 (миРНК-17) [54-56]. миРНК-132 также увеличивает интенсивность опухолевого роста, путём подавления онкосупрессорного фактора транскрипции FOXO1, активации сигнального пути PI3K/AKT, увеличения жизнеспособности и пролиферации опухолевых клеток, блокирования перехода из G1- в S-фазу клеточного цикла (Таблица 1) [57]. Патологическое бессмертие, свойственное онкотрансформированным признаками которого клеткам, являются усиленное неконтролируемое деление клеток и уклонение от инициации апоптоза, может быть связана с действием таких онкогенных миРНК, как миРНК-221/222, стимулирующих пролиферацию клеток за счёт негативной регуляции циклин-зависимых киназ CDKN1C/p57 и CDKN1B/p27, миРНК-130b, способствующей снижению чувствительности клеток к химиотерапии, в частности, путём ингибирования онкосупрессорного белка-гомолога фосфатазы и тензина РТЕN, и миРНК-125b, участвующей в подавлении процессов апоптоза, снижая экспрессию проапоптотических белков Bak1, PUMA и BMF (Таблица 1) [58-62]. Негативную роль в регуляции апоптоза опухолевых клеток также играет миРНК-21, которая действует на множество мРНК генов-мишеней, ассоциированных с клеточной смертью, таких как мРНК белка запрограммированной клеточной смерти 4 (PDCD4), мРНК гомологов белка sprouty-1 и sprouty-2 (SPRY1 и SPRY2), мРНК белка тропомиозина-1 (ТРМ1) и мРНК белка В-клеточной лимфомы 2 (BCL2), а также миРНК-4534, которая препятствует переходу опухолевых клеток в состояние апоптоза, полностью блокируя функции мРНК белка-гомолога фосфатазы и тензина РТЕN (Таблица 1) [63,64]. Помимо этого, миРНК-4534 активирует PI3K/Akt сигнальный путь, способствуя увеличению пролиферативного, инвазивного и метастатического потенциала опухолевых клеток [64].

миРНК	Онкоген/ супрессор	Гены- мишени	Биологические функции	Тип клеток	Ссылка
		CASP3, CASP7	Апоптоз	Глиобластома	[65]
		PDCD4	Апоптоз, резистентность к доксорубицину	Рак молочной железы	[66]
			Пролиферация	Колоректальный рак/ рак простаты	[67,68]
DUNCOL		TPM1	Пролиферация	Рак молочной железы/рак простаты	[69]
миРНК-21	Онкоген	MARCKS	Инвазия	Рак простаты	[70]
		PTEN	Апоптоз, инвазия	Гепатоцеллюлярная карцинома	[71]
		EGFR, MMP2	Пролиферация, инвазия, выживаемость	Глиобластома	[72]
		SPRY1 SPRY2	Апоптоз	Рак толстой кишки	[63]
		BCL2	Апоптоз	Глиобластома	[63]
миРНК-155	Онкоген	GABRA1	Пролиферация	Глиобластома	[73]
		VHL	Ангиогенез, опухоль- ассоциированная инфильтрация макрофагами	Рак молочной железы	[6]
		BACH1	Пролиферация, метастазирование, апоптоз	Рак почек, назофаренгиальная карцинома	[74]
		SOCS1	Пролиферация, инвазия, метастазирование	Рак молочной железы, гепатоцеллюлярная	[20]
		APC	Пролиферация, апоптоз	Папиллярная тиреоидная карцинома	[20]
		NOXA, GADD45B,	Колониеобразование	Миелома	[20]
миРНК-17		E2F1	Апоптоз	Рак молочной железы/ рак шейки матки	[75]
	Онкоген	<i>PTEN,</i> TP53INP1	Пролиферация Гепатоцеллюлярная карцинома		[54]
		HSP27	Миграция	Гепатоцеллюлярная карцинома	[76]

Таблица 1. Опухолеассоциированные миРНК и их участие в канцерогенезе

	Онкоген	PUMA, Bax	Апоптоз	Рак молочной железы	[71]
миРНК-221 миРНК-222		CDKN1C/p 57CDKN1 B/p27	Пролиферация	Гепатоцеллюлярная карцинома	[60]
		ΡΤΡμ	Метастазирование	Глиобластома	[77]
		STAT3	Пролиферация	Рак толстой кишки	[78]
		HOXD10	Пролиферация, инвазия, миграция, ангиогенез	Рак молочной железы	[79]
миРНК-10b	Онкоген	KLF4	Инвазия, метастазирование	Эзофагиальный рак	[80]
		BCL2, MCL1	Пролиферация, апоптоз	Медуллобластома	[81]
		EGFR, MMP2	Пролиферация, инвазия, выживаемость	Глиобластома	[72]
миРНК-23b	Онкоген	Онкоген _ Ангиогенез, инвазия, миграция		Глиобластома	[82]
миРНК-522	Онкоген	DENND2D	Пролиферация, апоптоз	Немелкоклеточный рак легких	[83]
миРНК-106b	Онкоген	SMAD7	Метастазирование	Гепатоцеллюлярная карцинома	[54]
		RB, APC	Пролиферация	Napamonia	
миРНК-4534	Онкоген	PTEN	Апоптоз	Рак простаты	[64]
миРНК-25	Онкоген	DR4, Bim	Апоптоз	Гепатоцеллюлярная карцинома	[63]
миРНК-132	Онкоген	FOXO1	Пролиферация, регуляция клеточного цикла	Ларингеальная плоскоклеточная карцинома	[57]
миРНК-130b	Онкоген	PTEN	Резистентность к химиотерапии	Рак лёгкого	[61]
миРНК-125b	Онкоген	Bak1, PUMA, BMF	Апоптоз	Рак молочной железы	[62]
	Супрессор	ERBB2, ERBB3	Инвазия	Рак эндометрия	[84]
миРНК-145	Супрессор	DUSP6	Пролиферация	Рак щитовидной	[05]
миРНК-613	Супрессор	SPHK2	Инвазия	железы	[00]

миРНК-31	Супрессор	CDK1, Rhoa	Инвазия, Рак молочной метастазирование железы		[86,87]	
миРНК-9	Онкоген	SOSC5 Ангиогенез		Рак шейки матки	[88]	
		TGFβR	Метастазирование	Глиома	[89]	
миРНК-130а	Онкоген	C-MYB, RUNX3	Ангиогенез	Рак желудка	[90]	
миРНК-210	Онкоген	FGFR1	Ангиогенез	Гепатоцеллюлярная карцинома	[91]	
миРНК-27b	Онкоген	VEGF, DLL 4, SPRY-2	Ангиогенез	Рак лёгкого	[92]	
миРНК-181b	Онкоген	V-CAM1, CYLD	Метастазирование	Глиобластома	[93]	
миРНК-146b	Онкоген	RARβ	Метастазирование	Паппилярный рак щитовидной железы	[94]	
	Супрессор	BDNF, JAK2, SAM68, SIX1	Миграция, инвазия	Рак молочной железы		
миРНК-204		USP47, SOX4, RAB22A	Пролиферация, инвазия, резистентность к химиотерапии	Рак желудка	[95]	
	Онкоген	PDEF, XRN1	Пролиферация	Рак простаты		

В свою очередь, онкосупрессорные миРНК-145 и миРНК-613, даже при значительном снижении экспрессии, способны подавлять пролиферативный и инвазивный потенциал опухолевых клеток путём ингибирования активности фосфатазы двойной специфичности 6 (DUSP6) и сфингозиновой киназы 2 (SPHK2) (Таблица 1) [85]. миРНК-31, уровень которой существенно снижен в опухолевых клетках, подавляет процессы начальной инвазии, метастазирования и васкуляризации опухоли путём регуляции циклин-зависимой киназы CDK1 и трансформирующего белка Rhoa [86,87]. А представители семейства онкосупрессорных миРНК let-7 ингибируют эпителиально-мезенхимальный переход путём подавления KRas/HMGA2A сигнального пути, препятствуя инвазии и метастазированию [96].

Усиление васкуляризации для обеспечения непрерывного питания формирующейся опухоли нередко является следствием ангиогенного действия ряда миРНК. Так, развитие капиллярных структур стимулируют такие онкогенные миРНК, как миРНК-9, миРНК-130a, а

также миРНК-210, которые направленно подавляют биосинтез супрессора цитокинового сигналинга SOSC5, транскрипционного фактора С-МҮВ, и фактора роста фибробластов 1, соответственно (Таблица 1) [88,89,97]. Прорастание капилляров и пролиферация клеток эндотелия сосудов регулируется миРНК-27b, оказывающей влияние на гены фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), дельта-подобного лиганда 4 (DLL 4) и гомолога белка sprouty-2 (SPRY-2) (Таблица 1) [92].

Помимо этого, высокая скорость ангиогенеза в опухоли, как правило, ассоциирована с активностью онкогенной миРНК-155, основной мишенью которой в данном случае является белок-супрессор опухоли Фон Хиппеля-Линдау (VHL) (Таблица 1) [6]. Процесс клеточной диссеминации контролируется, за счёт взаимодействий миРНК-9 и мРНК рецептора трансформирующего фактора роста β (TGF β R), миРНК-10b и мРНК белка гомеобокса 10 (HoxD10), [20,98], а также миРНК-155 и мРНК транскрипционного фактора ВАСН1, в результате которых многократно увеличивается метастатический потенциал опухолевых клеток. Кроме того, в регуляцию процессов метастазирования вовлечены миРНК-181b, миРНК-21 и миРНК-29a, которые влияют на экспрессию EGFR-зависимого белка адгезии V-CAM1, белка цитоскелета винкулина и лиганда хемокина X3C, соответственно [93,99], а также миРНК-146b, миРНК-181b и миРНК-221/222, которые подавляют экспрессию генов рецептора ретиноевой кислоты β (RAR β), деубиквитиназы CYLD и ингибитора киназ p27, способствуя развитию опухоли высокой степени агрессивности и увеличивая риск рецидива у пациентов, прошедших курс лечения (Таблица 1) [85].

Некоторые миРНК могут быть онкогенными или онкосупрессорными в зависимости от вида злокачественного образования. Так, при раке молочной железы миРНК-125b играет роль онкосупрессора и снижает синтез про-онкогенных белков эрбинов 2 и 3 (ERBB2 и ERBB3), тогда как при развитии рака простаты миРНК-125b проявляет онкогенную активность, подавляя продукт гена *Bak1* из про-апоптотического семейства Bcl-2 (Таблица 1) [100]. миРНК-204 является признанной онкосупрессорной миРНК и регулирует экспрессию множества онкогенных генов-мишеней, таких как нейротрофический фактор мозга BDNF, янус киназа 2 JAK2, Scr-ассоциированного белка митоза SAM68 и белка гомеобокса SIX1 при раке молочной железы, и убиквитин-карбоксил-терминальной гидролазы USP47, транскрипционного фактора SOX4, Ras-родственному белку RAB22A при раке желудка (Таблица 1) [95]. Её активность способствует снижению пролиферации и инвазивности опухолевых клеток, препятствует эпителиально-мезенхимальной транзиции и приводит к увеличению чувствительности раковых клеток к терапии оксалиплатином и 5-фторуридином. При этом при развитии рака простаты миРНК-204 играет двойственную роль и при значительном повышении экспрессии выступает в роли онкогена, подавляя экспрессию генов-онкосупрессоров Ets фактора — производного простаты PDEF и 5'-3' экзорибонуклеазы XRN1 и усиливая пролиферативный потенциал раковых клеток (Таблица 1) [95].

1.4 Стратегии управления активностью миРНК, основанные на применении терапевтических нуклеиновых кислот

Большой массив данных, свидетельствующий о том, что миРНК являются регуляторами биосинтеза сотен белков, вовлеченных в клеточные сигнальные каскады, а изменение уровня миРНК приводит к глобальной реорганизации клеточного сигналинга и развитию патологических состояний, послужил толчком к инициированию целого направления исследований, нацеленных на поиск методов регуляции активности миРНК. Среди разрабатываемых стратегий, ориентированных на подавление развития онкологических заболеваний, выделяют два основных направления – восстановление уровня онкосупрессорных миРНК и ингибирование активности онкогенных миРНК в опухолевых клетках.

Среди способов восстановления уровня онкосупрессорных миРНК наиболее изученными трансформация опухолевых с подходами являются клеткок помощью векторов, экспрессирующих дефицитную миРНК [16], а также трансфекция клеток синтетическими копиями последовательностей онкосупрессорных миРНК – миРНК-мимиками [7,101] (Рисунок 2 А и Б). На данный момент уже получен ряд положительных результатов в этой области. Так, увеличение экспрессии миРНК-26 посредством введения экспрессирующего её аденовирусного вектора способствует индукции апоптоза и подавлению роста клеток Мус-зависимого рака печени [102]. Восстановление уровня миРНК-15 с помощью лентивирусного вектора снижает пролиферацию клеток рака эндометрия [103]. Трансфекция клеток острой промиелотической лейкемии синтетическими мимиками миРНК-218 снижает жизнеспособность клеток. ингибирует синтез ДНК, стимулирует арест клеток в фазе G0/G1 и индуцирует апоптоз [104]. Трансфекция мимиками миРНК-1193 и миРНК-455 снижает инвазивный потенциал клеток рака молочной железы и немелкоклеточного рака лёгкого в 3 раза по сравнению с контролем [105,106]. Использование синтетических миРНК-497, миРНК-495 и миРНК-142 для терапии клеток назофарингеальной карциномы, рака толстой кишки и немелкоклеточного рака лёгкого, соответственно, приводит к подавлению миграции и пролиферации опухолевых клеток в 2.5 раза и двукратно снижает скорость роста опухоли *in vivo* [107–109]. Анализируя литературные данные можно заключить, что успехи применения олигонуклеотидных конструкций для восстановления уровня онкосупрессорных миРНК многочисленны и свидетельствуют о несмомненной перспективности данной стратегии для терапии онкопатологий.



Рисунок 2. Стратегии регуляции активности миРНК в опухолевых клетках, основанные на применении терапевтических нуклеиновых кислот. Конструкции, направленные на восстановление уровня онкосупрессорных миРНК: (**A**) векторные системы, эндогенно экспрессирующие миРНК; (**B**) синтетические миРНК-мимики. Конструкции, направленные на подавление онкогенных миРНК: (**B**) миРНК-маскирующие олигонуклеотиды; (**Г**) миРНК спонжи; (**Д**) малые РНК зипперы; (**E**) антисмысловые олигонуклеотиды.

Параллельно с исследованием биологического потенциала конструкций, направленных на восстановление уровня онкосупрессорных миРНК, активно разрабатываются технологии, ориентированные на подавление гиперфункций онкогенных миРНК. Представленные на сегодняшний день миРНК-ингибиторы на основе олигонуклеотидов можно разделить на два типа: 1) соединения, оказывающие влияние на миРНК-мишени опосредованно, путём взаимодействия с мРНК в области посадки миРНК и 2) соединения, регулирующие активность миРНК путём прямого связывания и блокирования миРНК.

Так к первому типу ингибиторов относятся миРНК-маскирующие олигонуклеотиды, которые не взаимодействуют с миРНК напрямую, а комплементарно связываются с мРНК в области сайта посадки миРНК и таким образом препятствуют образованию комплекса мРНК-миРНК. В результате миРНК-маскирующие олигонуклеотиды способны восстанавливать нормальную активность генов, которые ранее были репрессированы [19] (Рисунок 2 В). В 2012 году такие конструкции были впервые применены для исследования функций миРНК в опухолевых клетках. В ходе экспериментов было выявлено, что связывание миРНК-196а2* с мРНК онкосупрессорного белка ТР63 стимулирует пролиферацию клеток рака молочной

27

железы [110]. С тех пор, с помощью маскирующих олигонуклеотидов было выявлено множество функциональных взаимодействий между онкогенными миРНК и их мРНК мишенями, среди которых такие молекулярные пары, как: миРНК-203 и мРНК LASP-1 (LIM и SH3 Protein 1), регулирующие клеточную пролиферацию; миРНК-17 и миРНК-20à и мРНК NOR-1 (Neuron-derived Orphan Receptor-1), контролирующие ангиогенез; миРНК-29-b-1 и мРНК SPIN1 (Spindlin 1), оказывающие влияние на инвазию и миграцию опухолевых клеток, а также миРНК-27à и мРНК белка калретикулина CALR, которые способствуют уклонению клеток от иммуногенного апоптоза [111,112]. Одновременно с этим, было выявлено, что миРНКмаскирующие олигонуклеотиды являются перспективным средством подавления функций онкогенных миРНК в опухолевых клетках. В частности, эффективное подавление пролиферации клеток и индукция апоптоза было показано при использовании миРНК маскирующих олигонуклеотидов, которые препятствовали взаимодействию миРНК-522 и мРНК гена DENND2D [83]. Увеличение чувствительности клеток глиобластомы к темозоломиду было выявлено в случае применения олигонуклеотидов, которые блокировали связывание миРНК-9 и мРНК РТСН1 [113]. А подавление ангиогенеза было показано при использовании маскирующих конструкций, блокирующих взаимодействие миРНК семейства миРНК-30 и мРНК DLL4 (Delta-like 4) [114]. Несмотря на значительный успех применения миРНК маскирующих олигонуклеотидов in vitro, данные о применении таких конструкций in vivo пока отсутствуют.

Второй тип ингибиторов представлен несколькими олигонуклеотидными конструкциями. Так, в ряде работ была показана эффективность миРНК спонжей олигонуклеотидных последовательностей, которые значительно снижают уровень онкогенных миРНК, за счёт наличия в их структуре нескольких тандемно расположенных сайтов связывания миРНК [115] (Рисунок 2 Г). На сегодняшний день описаны миРНК спонжи для блокирования таких миРНК, как миРНК-10b, миРНК-21, миРНК-19, миРНК-155, миРНК-23b, миРНК-221/222, миРНК-9 и миРНК-140 [20,78,82,116,117]. Показано, что применение миРНКспонжей способствуют ингибированию различных процессов канцерогенеза. Так, результатом применения миРНК спонжей, направленных к миРНК-10b, является снижение инвазивного и миграционного потенциала клеток рака молочной железы на 40% [79]. Под действием спонжей, связывающих онкогенные миРНК-19 и миРНК-155, наблюдается ингибирование пролиферации клеток лейкемии на 50% [20]. Используя спонжи против миРНК-21, можно добиться двукратного увеличения чувствительности клеток рака молочной железы к химиопрепаратам, в частности, к доксорубицину [66]. *In vivo* введение миРНК спонжей, направленных к миРНК-9 и миРНК из кластера миРНК-221/222, приводит к подавлению

28

ангиогенеза и двукратному снижению количества метастазов, образующихся при развитии глиомы и колоректального рака, соответственно [78,117].

В 2017 году был представлен новый тип миРНК-направленных олигонуклеотидов – малые РНК зипперы. Такие конструкции блокируют функции миРНК путём связывания множества копий миРНК в протяженный дуплекс, в котором миРНК расположены друг относительно друга по принципу «голова к хвосту» [18] (Рисунок 2 Д). Исследование активности РНК зипперов, направленых к миРНК-17 и миРНК-221, на клетках рака молочной железы выявило снижение уровня этих миРНК на 90%, подавление миграционного потенциала клеток, а также увеличение их чувствительности к доксорубицину в 1.5 раза [18]. На данный момент, эффективность применения малых РНК зипперов *in vitro* описана лишь в одной работе, однако достигнутые результаты свидетельствуют о высоком терапевтическом потенциале таких конструкций, поскольку биологический эффект их применения сопоставим с эффективностью других миРНК-направленных олигонуклеотидных конструкций.

Перспективным подходом регуляции активности онкогенных миРНК является также применение конструкций CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated nuclease 9 (Cas9)). Такие системы состоят из Cas9 эндонуклеаз, клонированных из стрептококков вида Streptococcus pyogene, и малых направляющих (guide) РНК. Последние состоят из двух последовательностей: (1) CRISPR РНК (сгРНК), которая комплементарна целевым сайтам ДНК; и (2) транс-активационной CRISPR РНК (трансстРНК), которая частично комплементарна crPHK и необходима для поддержания активности нуклеазы Cas9. Системы CRISPR/Cas9 распознают последовательности ДНК мишеней в ядре, которые расположены вблизи мотивов, прилежащих к протоспейсеру (РАМ), и вводят двуцепочечные разрывы в них. Затем происходит репарация разрывов путём негомологичного соединения концов, вследствие чего возникают инсерции и делеции различной длины, что вызывает подавление активности молекулы мишени. С целью ингибирования функции онкогенных миРНК, исследователи, чаще всего, используют системы CRISPR/Cas9, которые вносят мутации в сайты процессинга миРНК предшественников (при- и пре-миРНК), что приводит к блокированию дальнейшего биогенеза миРНК ферментами Drosha/Dicer и снижению уровня зрелых миРНК в клетках, как правило, на 55–96% [118]. Результатом ингибирования таких онкогенных миРНК, как, миРНК-17, миРНК-21, миРНК-141 и миРНК-3188, с использованием специфических систем CRISPR/Cas9 является подавление пролиферации и инвазии клеток в 1.5-2-раза, снижение миграции клеток до 5 раз и увеличение процента апоптотических клеток по сравнению с контролем в 2 раза [119,120]. Также при ингибировании этих миРНК можно добиться блокирования процесса эпителально-мезенхимального перехода, а также значительно увеличить чувствительность опухолевых клеток к химиопрепаратам, в частности таким, как

цисплатин и паклитаксел [119,120]. Стратегия подавления онкогенных миРНК CRISPR/Cas9 обладает высокой стабильностью и продолжительностью эффекта, который может длиться до 30 дней, согласно данным, полученным в экспериментах на клеточных культурах и опухолевых моделях *in vivo* [121]. Кроме того, для CRISPR/Cas9 конструкций характерна высокая специфичность, которая обеспечивает ингибирование определённых онкогенных миРНК из одного и того же миРНК кластера. Тем не менее, стоит отметить, что эффективность CRISPR/Cas9 может существенно варьировать для различных миРНК мишеней.

Одним из наиболее часто применяемых способов подавления гиперэкспресии миРНК является использование синтетических антисмысловых олигонуклеотидов (анти-миРНК ON; Рисунок 2 Е). Антисмысловые олигонуклеотиды представляют собой одноцепочечные фрагменты ДНК длиной 15-20 н., которые были созданы с целью подавления активности мРНК, но впоследствии стали применяться для регуляции функций миРНК. Антисмысловые олигонуклеотиды работают как конкурентные ингибиторы миРНК, комплементарно связывающиеся со зрелыми формами миРНК и стерически блокирующие их или инициирующие их деградацию посредством РНКазы Н [17]. Поскольку олигонуклеотиды на основе природной немодифицированной ДНК быстро разрушаются под действием клеточных нуклеаз, исследователи разработали ряд модификаций межнуклеотидных фосфодиэфирных связей, в том числе фосфотиоатную (PS), и метоксиэтилфосфорамидную, а также модификации сахаро-фосфатного остова и нуклеотидных оснований, такие как 2'ОМетильную (2'ОМе-), 2'фтор-содержащую (2'F), 2'О-Метоксиэтильную (2'MOE), замкнутые нуклеиновые кислоты (LNA) и пептидил нуклеиновые кислоты (PNA) (Рисунок 3) в целях увеличения нуклеазоустойчивости, гибридизационных свойств проникающей способности И терапевтических олигонуклеотидов [122,123].

Под действием модифицированных антисмысловых олигонуклеотидов можно достичь значительного снижения активности онкогенных миРНК и, как следствие, ингибировать различные процессы канцерогенеза. Так, подавление онкогенной миРНК-23а и миРНК из кластера миРНК-106b~25 под действием антисмысловых олигонуклеотидов способствует снижению пролиферативного потенциала опухолевых клеток до 75% [124,125]. Трансфекция анти-миРНК олигонуклеотидами, направленных к миРНК-21, миРНК-221, миРНК-17, миРНК-18а и миРНК-191, приводит к двукратному снижению миграционной активности клеток и увеличению процента клеток в состоянии апоптоза в 2 раза [125–127]. Олигонуклеотиды, направленные к миРНК-10b, миРНК-221 или миРНК-222, также обладают высоким анти-метастатическим и про-апоптотическим потенциалом, способствуя двукратному снижению миграции клеток клеток в 2 раза [77,81].

30



Рисунок 3. Химические модификации, используемые в структуре антисмысловых олигонуклеотидов. Красной рамкой отмечены участки модификации.

Антисмысловые олигонуклеотиды продемонстрировали высокую эффективность и при подавлении опухолевого роста *in vivo* [21]. Так, олигонуклеотиды, направленные к миРНК-10b, вызывают более чем двукратное замедление скорости роста опухоли и значительное увеличение выживаемости мышей с интракраниальной глиобластомой [128]. Введение антимиРНК-155 ОN мышам с трансплантированной лимфомой способствует 5-кратному снижению веса опухоли по сравнению с контролем [129]. Терапия анти-миРНК-182 ON обеспечивает снижение числа метастазов в печени в два раза на поздних этапах развития меланомы [130], а подавление миРНК-10b способствует полной элиминации метастазов в лимфатических узлах мышей с ксенографом опухоли молочной железы [131]. Помимо этого, антисмысловые олигонуклеотиды, направленные к миРНК-155, эффективно подавляют ангиогенез и стимулируют инфильтрацию опухолевого узла макрофагами *in vivo* на модели рака молочной железы [6].

1.5 Препараты на основе нуклеиновых кислот для терапии миРНК-ассоциированных онкологических заболеваний, находящиеся в клинических испытаниях

миРНК-направленных Высокая биологическая активность олигонуклеотидных препаратов in vitro и in vivo послужили основанием для исследования их эффективности в клинических испытаниях. Так, в настоящее время, препарат MRG-106 (miRagen Therapeutics, LNA анти-миРНК-155 Inc.). представляющий собой олигонуклеотид для терапии лимфосаркомы и кожной Т-клеточной лимфомы, проходит 2 стадию клинических испытаний (NCT03837457). Для анти-миРНК-21 олигонуклеотида RG012 (Regulus Therapeutics Inc.), предназначенного для терапии синдрома Альпорта (патологии почек), завершился I этап клинических испытаний (NCT03373786). Успешно завершился первый этап клинических испытаний и для препарата TargomiRs (EnGeneIC Ltd.), который представляет собой миниклетки, содержашие миРНК-16 мимики, для терапии плевральной мезотелиомы [132]. Идёт набор пациентов для 2 фазы клинических испытаний препарата MRG-201 (miRagen Therapeutics Inc.), который представляет собой мимик миРНК-29 (NCT03601052) для терапии келоидных рубцов. В случае успешного прохождения испытаний, этот препарат также планируют протестировать в качестве противоопухолевого средства, поскольку недостаток миРНК-29, являющейся важнейшей онкосупрессорной миРНК, выявлен при многих типах заболеваний. миелоидную онкологических включая лейкемию. эзофагеальную плоскоклеточную карциному и рак желудка [133]. В 2013 году были инициированы клинические испытания для препарата MRX34, представляющего собой синтетическую миРНК-34а. Однако, в 2017 году компания Mirna Therapeutics Inc. заявила, что этот терапевтический агент обладает серьёзными побочными эффектами, и его дальнейшие испытания должны быть прекращены [134]. На сегодняшний день это единственный пример неудачи применения миРНК-направленного препарата в клинике.

Таким образом, был разработан ряд стратегий с использованием в качестве терапевтического инструмента нуклеиновые кислоты, осуществляющие регуляцию активности миРНК различными механизмами (Рисунок 2). В частности, миРНК маскирующие олигонуклеотиды, блокируя сайты посадки миРНК в последовательности мРНК, выступают в качестве конкурентных ингибиторов миРНК. Данная стратегия позволяет влиять на функцию одной определенной мРНК-мишени. Системы CRISPR/Cas9 снижают активность миРНК путём внесения мутаций в структуру предшественников миРНК и блокирования их биогенеза. МиРНК

спонжи, малые РНК зипперы и антисмысловые олигонуклеотиды, не обладающие РНКаза Нактивирующей активностью (2'OMe, LNA, PNA и др.), эффективно подавляют активность онкогенных миРНК путём их стерического блокирования. Антисмысловые олигонуклеотиды, которые распознаются РНКазой Н, необратимо разрушают миРНК и эффективно ингибируют их функции в клетках. Поскольку одна миРНК контролирует активность нескольких мРНКмишеней, прямое ингибирование одной миРНК с помощью таких конструкций позволяет влиять на целый ряд мРНК белков опухолевых супрессоров.

1.6 Комбинации препаратов на основе нуклеиновых кислот для модуляции активности миРНК в опухолевых клетках

Высокая биологическая миРНК-регулирующих активность олигонуклеотидных конструкций *in vitro* и *in vivo* дала основание полагать, что комбинированное применение таких препаратов может значительно усилить их терапевтическое действие. С помощью комбинаций можно добиться одновременного воздействия на несколько регуляторных миРНК, комплексно блокировать процессы канцерогенеза, а также обеспечить снижение дозы применяемых лекарственных агентов. В настоящее время для более эффективного подавления канцерогенеза в основном применяют три типа сочетаний миРНК-регулирующих олигонуклеотидных препаратов, которые включают: (1) комбинации антисмысловых олигонуклеотидов, миРНК: (2)комбинации направленных различным онкогенным к синтетических предшественников (пре-миРНК) или мимиков зрелых форм онкосупрессорных миРНК; а также (3) сочетание антисмысловых олигонуклеотидов и/или мимиков с противоопухолевыми 1 Приложения химиопрепаратами. Таблица суммирует данные 0 преклинических исследованиях комбинированного применения миРНК-направленных препаратов in vitro и in vivo. В этой таблице содержится детальное описание эффектов комбинированной терапии в сравнении с эффектом монотерапии соответствующими препаратами. Данные о наиболее успешных комбинациях миРНК-регулирующих препаратов, оказывающих синергическое влияние на процессы канцерогенеза, отражены в Таблице 2.

1.6.1 Комбинации миРНК-направленных олигонуклеотидов для одновременного подавления нескольких событий канцерогенеза

К настоящему времени предложено две стратегии комбинирования миРНКнаправленных олигонуклеотидов. Первая предполагает введение коктейля олигонуклеотидов, направленных к мультифункциональным онкогенным миРНК, таким как миРНК-155, миРНК-21, и миРНК-10b, регулирующим одновременно несколько патологических процессов [135,136]. Вторая стратегия подразумевает ко-ингибирование миРНК, принадлежащих к одному миРНК кластеру, который обычно сочетает как моно- так и полифункциональные регуляторы. Примером такого кластера является миРНК-183-96-182, в котором миРНК-96 в основном контролирует клеточную пролиферацию, тогда как полифункциональные миРНК-182 и миРНК-183 задействованы в регуляции инвазивного и миграционного потенциалов опухолевых клеток, а также стимулируют развитие резистентности клеток к химиотерапии [137–140].

Обе стратегии комбинирования олигонуклеотидов продемонстрировали эффективное способствовали подавление событий канцерогенеза И многократному усилению терапевтического эффекта по сравнению с введением анти-миРНК ОN по отдельности. Так, например, одновременное подавление миРНК-17 и миРНК-20à из кластера миРНК-17~92, также как и ингибирование трёх миРНК из кластера миРНК-183/182/96 способствует в 3 и 4 раза более эффективному снижению жизнеспособности клеток рака лёгких и толстой кишки человека, соответственно [141,142] (Таблица 2 и Таблица 1 приложения). Комбинация антисмысловых ингибиторов миРНК-130а и миРНК-495 приводит к подавлению ангиогенеза при раке желудка, которое в 2 раза эффективнее, чем при введении соответствующих миРНКнаправленных олигонуклеотидов по отдельности [90] (Таблица 1 приложения). Сочетания антимиРНК олигонуклеотидов, в частности анти-миРНК-221 и анти-миРНК-222, или анти-миРНК-10b и анти-миРНК-21, а также олигонуклеотидов, адресованных к миРНК из кластера миРНК-106b~25 обладают в 2 раза более эффективным анти-пролиферативным действием по отношению к клеткам глиомы и глиобластомы, чем одиночные олигонуклеотиды [72,124,143] (Таблица 2 и Таблица 1 приложения). Применение комбинаций олигонуклеотидов, направленных к миРНК-106, миРНК-93 и миРНК-25 из кластера миРНК-106b~25 или к миРНК из кластера миРНК-221/222 способствует усилению индукции апоптоза в 4 раза по сравнению с эффектом каждого из олигонуклеотидов [124,144] (Таблица 2 и Таблица 1 приложения). При одновременном введении олигонуклеотидов, адресованных миРНК-99b, миРНК-let-7-е и миРНК-125а или к миРНК-21 и миРНК-10b, наблюдается эффективное снижение инвазивного и миграционного потенциалов клеток глиомы и плоскоклеточного рака пищевода, которое в 3.5 раза превышает эффект монотерапии [72,145] (Таблица 2 и Таблица 1 приложения). Следует отметить, что в большинстве случаев, применение коктейлей олигонуклеотидов оказывает комплексное влияние на несколько событий канцерогенеза [124,145,146] (Рисунок 4).

Таблица 2. Комбинации препаратов на основе нуклеиновых кислот для модуляции активности миРНК, проявляющие синергическое действие на процессы канцерогенеза *in vitro* и *in vivo*

Комбинация	Концентрация каждого соединения в комбинации	In vitro/ ex vivo /in vivo	Влияние на клеточные функции	Суммарный эффект отдельных препаратов*	Эффект комбинации	Ссылка
анти-миРНК- 183, анти- миРНК-182 и анти-миРНК- 96 ON	0.4 мкМ	in vitro	подавление пролиферации	подавление пролифераци и в 2.6 раз, подавление колониеобраз ования в 7 раз	подавление пролифераци и в 5 раз, полное подавление колониеобраз ования	[142]
анти-миРНК- 221 и анти-миРНК- 222 R8 конъюгаты	1 мкМ	in vitro	индукция апоптоза	в 2.7 раз	в 6 раз	[144]
анти-миРНК- 21 и анти- миРНК-10b ON	100 нМ	in vitro	подавление инвазии	в 3.8 раз	в 7 раз	[72]
миРНК-34а и миРНК-let-7b мимики	25 или 50 нM	in vitro	подавление инвазии	в 1.72 раза	в 5.5 раз	[147]
миРНК-126 и миРНК-34а мимики	1 БОЕ/кл (вирусный вектор)	in vitro	индукция апоптоза	в 4.75 раз	в 6.3 раз	[148]
миРНК-497 и миРНК-34а мимики	50 нМ	ex vivo	подавление опухолевого роста	в 4.75 раз	в 9 раз	[149]
миРНК-634 и темозоломид	25-400 мкМ темозоломид, миРНК мимик – N/А	in vitro	подавление пролиферации (колониеобразо вания)	в 3.6 раз	в 5.6 раз	[150]
миРНК-205 мимик и гемцитабин	40 мг/кг гемцитабин, миРНК мимик – N/A	ex vivo	подавление опухолевого роста	в 4.3 раза	в 6.1 раз	[151]
анти-миРНК- 21 и гемцитабин	2 мг/кг гемцитабин, 80 мкг/мышь ON	in vivo	подавление опухолевого роста и метастазирован ия	подавление опухолевого роста в 4 раза, снижение числа метастазов в 3 раза	подавление опухолевого роста в 5.5 раз, полная элиминация метастазов	[152]

миРНК let-7b мимик и паклитаксел	50 нМ мимик, 25 нМ паклитаксел – in vitro; 1 мг/кг мимик, 5 мг/кг паклитаксел	in vitro/ in vivo	индукция апоптоза, подавление опухолевого роста	индукция апоптоза в 7.8 раз, подавление опухолевого роста в 3 раза	индукция апоптоза в 13.9 раз, подавление опухолевого роста в 5.7 раз	[153]
миРНК -34а мимик и целекоксиб	100 мкМ целекоксиб, миРНК мимик – N/А	in vitro	подавление миграции	в 3.6 раз	в 5.1 раз	[154]
миРНК-218 мимик и темозоломид	10 мг/кг темозоломид, миРНК мимик – N/А	in vivo	подавление опухолевого роста	в 10.5 раз	в 42 раза	[155]

*Суммарный эффект отдельных препаратов представляет собой сумму эффективностей действия препаратов, используемых по отдельности. N/A – данные о концентрации миРНК-направленных препаратов, используемых в исследовании, отсутствовали. БОЕ – бляшкообразующая единица.

Успешное применение коктейлей антисмысловых ингибиторов на опухолевых клетках способствовало созданию мульти-олигонуклеотидных конструкций ДЛЯ совместного подавления миРНК в клетках. Так, двумя независимыми группами исследователей были разработаны две функционально подобные олигонуклеотидные конструкции: (1)мультитаргетные антисмысловые олигонуклеотиды МТg-AMO и (2) мультипотентые миРНК спонжи, которые представляют собой последовательности, содержащие сайты связывания для различных миРНК. Эти два типа мультифункциональных ингибиторов нескольких принципиально отличаются лишь способом доставки таких конструкций в клетки: MTg-AMOs доставляют в клетки с использованием LipofectamineTM, а миРНК спонжи экспрессируются эндогенно посредством вирусных векторов. Было выявлено, что применение миРНК-21/миРНК-155/миРНК-17 МТg-АМО и миРНК спонжа, комплементарного миРНК-21, миРНК-155, миРНК-221 и миРНК-222, значительно снижает жизнеспособность и пролиферацию опухолевых клеток, причём эффект мультипотентных ингибиторов на 60% превышает действие препаратов, применяемых по отдельности [156,157] (Таблица 1 приложения). Использование миРНК спонжа, направленного к миРНК-17, миРНК-18а, миРНК-19, и миРНК-92, приводит к шестикратному подавлению роста клеток лимфомы по сравнению с эффектом монопотентных спонжей, направленных к каждой индивидуальной миРНК [158] (Таблица 1 приложения). Также, при использовании спонжа, направленного к кластеру миРНК-183-96-182, или содержащего сайты связывания одновременно для миРНК-17 и миРНК-20а, наблюдалось значительное увеличение процента апоптотических клеток [159,160].

Таким образом, очевидно, что применение комбинаций олигонуклеотидов, направленных к нескольким различным онкогенным миРНК, является многообещающей
стратегией подавления событий канцерогенеза. Посредством наиболее эффективных комбинаций можно добиться до 5 раз более эффективной индукции апоптоза и до 7 – 9 раз более значительного подавления инвазивного или пролиферативного потенциала опухолевых клеток по сравнению с монотерапией [72,124,144,158] (Таблица 1 приложения). Но, несмотря на это, только одна публикация на сегодняшний день свидетельствует об успешном применении сочетания анти-миРНК олигонуклеотидов *in vivo*. Было показано, что применение сочетания олигонуклеотидов, направленных к миРНК-221 и миРНК-222, обеспечивало в 1.5 раза более эффективное подавление опухолевого роста по сравнению с олигонуклеотидами, введёнными по отдельности [143] (Таблица 1 приложения).

1.6.2 Комбинации миРНК-мимиков для терапевтического воздействия на определенную функцию клеток

В последнее десятилетие появился ряд работ, описывающих введение в опухолевые клетки коктейля мимиков, имитирующие различные предшественники или зрелые формы онкосупрессорных миРНК. Чаще всего исследователи используют мимики онкосупрессорных миРНК-34a, миРНК-99a и представителей семейства миРНК-145, поскольку эти миРНК играют важнейшую роль в регуляции клеточного цикла, фокальной адгезии и взаимодействий цитокинов с рецепторами на поверхности опухолевых клеток различного гистогенеза. Вследствие увеличения уровня этих онкосупрессорных миРНК в клетках восстанавливается нормальная экспрессии белков-мишеней, которые вовлечены в ключевые сигнальные пути клетки такие, как p53, Notch, TGF-b, IGF-1R, и mTOR [161–163]. В результате происходит нормализация клеточных процессов и подавление патологической реорганизации клеток.

По сравнению с применением комбинаций антисмысловых олигонуклеотидов, которые оказывают комплексное влияние на несколько событий канцерогенеза одновременно, комбинации миРНК мимиков, как правило, оказывают действие на одну определённую клеточную функцию (Рисунок 4). Например, одновременное применение пре-миРНК-15а/16 и пре-миРНК-34а на клетках немелкоклеточного рака лёгких оказывает влияние на клеточный цикл, способствуя увеличению до 55% числа клеток, претерпевающих арест в G1-G0 фазе клеточного цикла, что в 3 раза выше по сравнению с эффектами монотерапии [164] (Таблица 1 приложения). Одновременная трансфекция клеток немелкоклеточного рака лёгких мимиками миРНК-34а и миРНК-let-7b обспечивает значительное снижение инвазивного потенциала клеток: количество инвазирующих клеток в 5 и 8 раз меньше по сравнению с применением имиков миРНК-let-7b и миРНК-34а по отдельности, соответственно [147] (Таблица 2 и Таблица 1 приложения). Применение комбинации, состоящей из пре-миРНК-145 и пре-миРНК-141, обладает в 1.5 раза более сильным ингибирующим эффектом на миграцию клеток

карциномы почек [165]. Одновременная терапия мимиками миРНК-145 и миРНК-143 в 2 раза эффективнее снижает жизнеспособность клеток колоректального рака по сравнению с монотерапией [166] (Таблица 1 приложения). Трансфекция клеток эзофагеальной сквамозной карциномы комбинацией пре-миРНК-99а и пре-миРНК-100 вызывает в 1.5 раза более значительное снижение пролиферации клеток по сравнению с введением каждой пре-миРНК по отдельности [167] (Таблица 1 приложения).

Существует ряд комбинаций миРНК мимиков, применение которых оказывает терапевтический эффект сразу на несколько функций клетки. Так, комбинация мимиков миРНК-99а и миРНК-497 обладает более сильным про-апоптотическим И антипролиферативным эффектом на клетках гепатоцеллюлярной карциномы по сравнению с мимиками, введёнными по отдельности [168] (Таблица 1 приложения). Одновременное введение векторов, экспрессирующих миРНК-34а и миРНК-497 способствует в 1.5 раза более эффективному подавлению колониеобразования и жизнеспособности клеток рака легких по сравнению с монотерапией [149] (Таблица 1 приложения). Значительное снижение жизнеспособности и миграционной активности клеток множественной миеломы наблюдается при одновременном введении пре-миРНК-137 и пре-миРНК-197, которое было в 2 раза эффективнее использования пре-миРНК по отдельности [169] (Таблица 1 приложения). Совместное восстановление уровня онкосупрессорных миРНК-193а и миРНК-600 вызывает в 1.5 раза более значительное ингибирование колониеобразования и в 2.5 раза более эффективную индукцию апоптоза по сравнению с введением каждого мимика по отдельности [170] (Таблица 1 приложения).

Несмотря на большое количество исследований, описывающих применение сочетаний нескольких миРНК мимиков, на сегодняшний день существует только один пример комбинации, посредством которой было достигнуто синергическое воздействие на несколько событий канцерогенеза. Так, восстановление уровня онкосупрессорных миРНК-34а и миРНК-126 в клетках аденокарциномы поджелудочной железы приводит к снижению жизнеспособности клеток на 75%, что трехкратно превышает эффекты монотерапии. Помимо этого, использование такой комбинации позволяет двухкратно снизить миграционный и инвазивный потенциалы опухолевых клеток, а также способствует мощной индукции апоптоза, в результате которого приблизительно 30-50% от общего числа клеток находится в состоянии апоптоза, что в 4 раза превосходит эффекты применения каждого из мимиков [148] (Рисунок 4, Таблица 2 и Таблица 1 приложения).

Примеры применения комбинаций миРНК мимиков *in vivo* также немногочисленны, однако они позволили выявить лидерные комбинации, оказывающие высокий противоопухолевый эффект: например, использование комбинации мимиков миРНК-497 и

38

миРНК-34а или миРНК-497 и миРНК-99а способствует эффективному подавлению опухолевого роста, которое в 4 раза превышает действие монотерапии [147,149,168] (Таблица 2 и Таблица 1 приложения).

Несмотря на то, что данные по использованию мимиков *in vivo* лишь начинают появляться, уже полученные положительные результаты, вне сомнения, указывают на высокий терапевтический потенциал такой терапии.



Рисунок 4. Стратегии комбинирования миРНК-регулирующих препаратов для подавления канцерогенеза. Красным цветом отмечены комбинации, продемонстрировавшие высокую эффективность *in vivo*.

1.6.3 Комбинации препаратов, направленных на модуляцию опухолеассоциированных миРНК, и цитостатиков для преодоления лекарственной устойчивости опухолевых клеток

На сегодняшний день одним из основных способов борьбы с онкологическими заболеваниями остаётся химиотерапия. Препараты, одобренные Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов («Food и Drug Administration», FDA), включая темозоломид, гемцитабин, сунитиниб, паклитаксел, сетуксимаб, обладают различными механизмами противоопухолевого действия. Темозоломид является алкилирующим агентом и инициирует апоптоз вследствие повреждения ДНК в ходе репликации [171]. Сунитиниб, в основном, проявляет анти-ангиогенный эффект, ингибируя группу тирозин-киназных рецепторов, в частности, рецептора фактора роста сосудистого эндотелия (VEGFR) [172]. Гемцитабин является фтор-содержащим аналогом нуклеотида и блокирует синтез ДНК [173]. Сетуксимаб представляет собой моноклональное антитело и подавляет клеточную

пролиферацию в результате направленного блокирования рецептора эпидермального фактора роста [174]. А паклитаксел, являясь представителем класса таксанов, проявляет цитостатическую активность за счёт блокирования реорганизации микротрубочек в митозе [175]. Все указанные агенты проявляют сравнительно высокую противоопухолевую активность, однако развитие резистентности опухолевых клеток значительно снижает эффективность этих препаратов [176].

Огромный массив данных свидетельствует о необычайно важной роли миРНК в развитии резистентного фенотипа опухолевых клеток. Снижение чувствительности к некоторым химиопрепаратам может являться следствием гиперфункции онкогенных миРНК, включающих миРНК-26а, миРНК-18а-5р, миРНК-29b-1-5р, миРНК-431-3р, миРНК-4521 и миРНК-155, или быть результатом значительного снижения активности онкосупрессорных миРНК, таких как миРНК-575, миРНК-642b-3р, миРНК-4430, миРНК-195, миРНК-203а и миРНК-203b [177–182]. Аберрантное функционирование миРНК приводит к нарушению взаимодействий между миРНК и их мРНК мишенями, ассоциированными с формированием лекарственной устойчивости. Примерами таких молекулярных пар могут служить миРНК-210-Зр и мРНК множественного лекарственного транспортёра ABCC5, также известного как MRP5 [183]; миРНК-101 и ДНК-зависимых протеин киназ [184]; миРНК-125а и мРНК проапоптотического белка А20 [185]; миРНК-145 и киназы рибосомального белка S6 (р70S6K1) [186]; миРНК-181b и белка цилиндраматоза (CYDL) [187]; миРНК-144-3р и мРНК белка АТбогатого интерактивного домена 1А (ARD1A) [188]; миРНК-199а-5р и миРНК-375 с мРНК фосфатазы 1, содержащей pH домен и лейцин-богатые повторы, (PHLPP1) [189]. Нарушение взаимодействий между миРНК и их мРНК-мишенями неизбежно приводит к резистентности раковых клеток, поскольку они являются ключевыми участниками основополагающих клеточных сигнальных каскадов, таких как NF-кβ, AKT и JAK2/STAT3, контролирующих апоптоз, клеточный цикл, репарацию ДНК, редактирование РНК и нуклеотидный синтез [190,191]. Принимая во внимание эти данные, исследователи предложили использовать миРНКнаправленные олигонуклеотиды для блокирования активности миРНК, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, для преодоления формирующейся резистентности К химиопрепаратам и увеличения эффективности терапии. Было разработано две стратегии комбинированного применения миРНК-ассоциированных нуклеиновых кислот И химиопрепаратов: стратегия (1) включающая предварительную обработку опухолевых клеток предшествующую химиопрепаратов, миРНК-мимиками, введению И стратегия (2),миРНК-направленных заключаяшаяся В одновременном введении антисмысловых олигонуклеотидов или миРНК мимиков и химиопрепаратов. (Рисунок 4).

Эффективность стратегии предварительного введения миРНК-мимиков, увеличивающая уровень таких миРНК, как миРНК-429, миРНК-383, миРНК-101-3р, миРНК-195, миРНК-634 и миРНК-1294, оказалась достаточно высокой и позволила снизить значения ЕС50 и ІС50 таких химиопрепаратов как гемцитабин, темозоломид и паклитаксел в среднем в 2 – 5 раз [150,182,192–196] (Таблица 1 приложения). Следствием предварительной сенсибилизации клеток стало значительное увеличение эффективности последующей химиотерапии. Так, показано, что увеличение чувствительности клеток рака поджелудочной железы к гемцитабину посредством введения онкосупрессорной миРНК-205 способствовало 2-кратному снижению миграционного потенциала опухолевых клеток [197] (Таблица 1 приложения). Более того, 79% клеток претерпевало арест в G0/G1 фазе клеточного цикла, что в 1.5 раза выше по сравнению с введением только миРНК-205 экспрессирующего вектора [151] (Таблица 1 приложения). Введение миРНК-151а мимика в клетки глиобластомы перед обработкой темозоломидом способствовало значительному подавлению колониеобразования, в 3 раза снижая количество образующихся колоний in vitro [198] (Таблица 1 приложения). Было показано, что терапия миРНК-222 мимиком, предшествующая введению сунитиниба снижает ангиогенез метастатической карциномы почек в 6 раз более эффективно, чем монотерапия каждым препаратом по отдельности [199] (Таблица 1 приложения).

Высокую эффективность *in vitro* также продемонстрировала стратегия одновременного введения миРНК-направленных олигонуклеотидов и химиопрепаратов. Так, при совместном введении анти-миРНК-21 олигонуклеотида или миРНК-145 мимика и сунитиниба, а также миРНК-133b мимика и сетуксимаба можно добиться подавления жизнеспособности клеток глиобластомы и колоректальной карциномы до 75%, что в среднем в 1.5 раза выше, чем эффект каждого из препаратов по отдельности [200,201] (Таблица 1 приложения). Совместная терапия миРНК-383 мимиком и паклитакселом, анти-миРНК-21 олигонуклеотидом и гемцитабином, миРНК-146 мимиком и сетуксимабом приводит к более эффективной индукции апоптоза опухолевых клеток, которая в среднем в 2.5 раза выше по сравнению с монотерапией каждым агентом [152,193,202] (Таблица 1 приложения). А в случае применения миРНК let-7b мимика и паклитаксела количество клеток немелкоклеточного рака лёгкого, перешедших в состояние апоптоза, увеличивается после совместной терапии шестикратно по сравнению с монотерапией каждым препаратом по отдельности [153] (Таблица 2 и Таблица 1 приложения). Эффективное подавление инвазивного и миграционного потенциала клеток аденокарциномы и остеосаркомы было обнаружено для терапии такими комбинациями препаратов, как миРНК-34а мимик и целекоксиб, миРНК-205 мимик и гемцитабин, а также миРНК let-7b мимик и паклитаксел [153,154,197] (Таблица 2 и Таблица 1 приложения). Эффект такой сочетанной терапии в 3 – 3.5 раза превышал действие препаратов по отдельности.

Высокая эффективность комбинаций миРНК-регулирующих нуклеиновых кислот и химиопрепаратов была также обнаружена в исследованиях *in vivo*. Было отмечено, что различные комбинации препаратов, такие как мимик миРНК-205 и гемцитабин, анти-миРНК-21 олигонуклеотид и сунитиниб, пре-миРНК-429 и гемцитабин, мимик миРНК let-7b и паклитаксел, анти-миРНК-21 олигонуклеотид и гемцитабин, мимик миРНК let-7b и темозоломид, а также миРНК-1291 и гемцитабин способствуют значительному подавлению опухолевого роста, приводящего к регрессии объёма опухоли в среднем в 2-4 раза, по сравнению с терапией одиночными агентами [151–153,194,196,198,200,203] (Таблица 2 и Таблица 1 приложения). В некоторых случаях, например, при использовании миРНК-218 мимика и темозоломида удавалось добиться 40-кратного подавления роста опухоли [155] (Таблица 2). А использование комбинации анти-миРНК-21 ОN и гемцитабина позволило полностью элиминировать печеночные метастазы при раке поджелудочной железы. Терапия, включающая миРНК-151а мимик и темозоломид обеспечила значительное увеличение выживаемости мышей [152,198] (Рисунок 4, Таблица 2 и Таблица 1 приложения).

Описанные стратегии, основанные на комбинированном применении препаратов, направленных на модуляцию активности миРНК, такие как коктейли антисмысловых олигонуклеотидов или синтетических онкосупрессорных миРНК, а также их комбинации с химиопрепаратами показали высокую терапевтическую эффективность. В ряде случаев был продемонстрирован аддитивный, а в ряде случаев – синергический эффект такой сочетанной терапии. В частности, аддитивное ингибирующее влияние на жизнеспособность опухолевых клеток было выявлено для Mtg AMO-21/155/17 [156], мимика миРНК-101 и гемцитабина [192], а также для комбинации мимиков миРНК-34а и миРНК-126 [148] (Таблица 1 приложения). Помимо этого, сочетание мимиков миРНК-34а и миРНК-let-7b или миРНК-1291 с паклитакселконъюгированным гемцитабином проявляло аддитивный противоопухолевый эффект in vivo [147,194] (Таблица 1 приложения). Отдельные иследования обнаружили синергический терапевтический эффект комбинаций (Таблица 2). Так, совместное применение анти-миРНК-221 и анти-миРНК-222 олигонуклеотидов в форме конъюгатов с октоаргининовым пептидом, а также комбинации анти-миРНК-21 и анти-миРНК-10b олигонуклеотидов, мимиков миРНК-34a и миРНК-126 или сочетания миРНК-634 мимика и темозоломида обеспечивает синергическое многократное усиление индукции апоптоза [72,144,148,150], подавление колониеобразования [150,204] и снижение инвазивного и миграционного потенциалов клеток по сравнению с монотерапией [72,147,154] (Таблица 2 и Таблица 1 приложения). Более того, ряд комбинаций, таких как сочетание мимиков миРНК-34а и миРНК-497, мимик миРНК-205 и гемцитабин, или мимик миРНК-let-7b и паклитаксел обеспечивали синергическое ингибирование опухолевого роста ex vivo и in vivo [149,151,153] (Таблица 2 и Таблица 1 приложения). В самых успешных

42

случаях, например, при использовании мимика миРНК-218 и темозоломида, было достигнуто 40-кратное подавления опухолевого роста [155], а при введении анти-миРНК-21 олигонуклеотида и гемцитабина наблюдалась полная элиминация метастазов [152] (Таблица 2 и Таблица 1 приложения). Такие комбинации могут выступать в качестве прототипов терапевтических протоколов для лечения таких патологий, как гепатоцеллюлярная карцинома, рак поджелудочной железы и глиобластома.

1.7 Заключение

Открытие в 1993 году малых некодирующих РНК – миРНК явилось стартом для развития нового направления исследований, нацеленного на определение роли некодирующих РНК в геноме живых организмов. Лавинообразное накопление данных о функциях миРНК позволило заключить, что эти молекулы встречаются у многих видов организмов и играют центральную роль в процессах регуляции всех фундаментальных процессов. Показано, что миРНК контролируют экспрессию приблизительно 60% всех белков, закодированных в геноме, причём, одна миРНК способна взаимодействовать с множеством мРНК мишеней, и несколько миРНК могут регулировать экспрессию одной таргетной мРНК. Выявлено, что миРНК являются участниками всех ключевых сигнальных путей клетки, включая PI3K/AKT, MAPK/ERK, Jak-STAT и NF-кβ. В связи с этим, следствием нарушения экспрессии миРНК является запуск глобальной реорганизации функций клеток, вызывая их патологическую трансформацию и развитие различных заболеваний. Полифункциональность, повсеместная распространённость, а также консервативность последовательностей большинства миРНК у разных видов организмов сделало миРНК универсальной и перспективной терапевтической мишенью, а управление активностью вредоносных миРНК – новым подходом к терапии миРНК-ассоциированных патологий.

Успешное применение антисмысловых олигонуклеотидов для подавления мРНК мишеней, дало толчок к разработке подобных соединений в качестве инструментов регуляции уровня и активности миРНК. В отличие от мРНК-направленных олигонуклеотидов, которые воздействуют на экспрессию одной мРНК мишени, посредством миРНК-регулирующих агентов возможно ингибирование нескольких мРНК и выключение целого сигнального каскада. При этом сохраняется возможность и точечного блокирования одной конкретной мРНК. В результате, миРНК-регулирующие препараты представляют собой молекулярные инструменты тонкой регуляции, которые позволяют воздействовать как на одну определённую клеточную функцию, так и на несколько процессов одновременно, а в основе эффективности их действия лежит выбор оптимальной миРНК-мишени.

Важным достоинством миРНК-регулирующих терапевтических нуклеиновых кислот является низкая токсичность по сравнению с существующими препаратами. Их высокая биологическая активность *in vivo* достигается даже в диапазоне концентраций 1 - 2 мг/кг, тогда как доза применяемых химиопрепаратов достигает 40 мг/кг. Исследования доказали, что миРНК-регулирующие препараты эффективны как в качестве монотерапии, так и в комбинациях с противоопухолевыми цитостатиками, вызывая синергическое подавление опухолевого роста. Особенно перспективными представляются сочетания, в которых миРНКрегулирующие препараты используются качестве адъювантов, предшествующих В химиотерапии, поскольку такая стратегия может позволить значительно снизить дозу вводимых цитостатиков, и, как следствие, общую токсичность терапии.

Очевидно, что миРНК-регулирующие препараты создают абсолютно новую терапевтическую парадигму в лечении злокачественных заболеваний. Их создание является новой перпективной областью развития антисмысловой технологии, а применение миРНКрегулирующих препаратов в качестве монотерапии или в виде комбинаций, включающих антимиРНК олигонуклеотиды, мимики и химиопрепараты, может стать высоко-эффективным способом терапии онкологических заболеваний и других миРНК-ассоциированных патологий уже в ближайшем будущем.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1 Материалы

2.1.1 Реактивы и препараты

В работе использовали N,N'-метиленбисакриламид, ("Applichem", Германия), N,N,N',N'тетраметилэтилендиамин (TEMED), трис-(оксиметил)-аминометан (Tris), дитиотреитол (DTT), персульфат аммония (PSA) ("ICN", США), этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), трипсин, мочевина, борная кислота, LSM ("MP Biomedicals", США), имидазол ("Fluka", Швеция) акриламид, фиколл, диэтилпирокарбонат (DEPC), культуральную среду Дульбекко в модификации Искова (IMDM), культуральную среду Дульбекко в модификации Игла (DMEM), бикарбонат натрия, бычью эмбриональную сыворотку (БЭС) ("Sigma", США), среду Opti-MEM, обезжиренное сухое молоко, TRIzol ("Invitrogen", США), интеркалирующий краситель "EvaGreen" ("Biotium", США), этиловый и изопропиловый спирт, цитрат натрия, хлороформ, ацетон, бромфеноловый синий ("Реахим", Россия), ксиленцианол ("Serva", Германия), перхлорат лития ("Sigma-Aldrich", США), раствор антибиотиков и антимикотика (100 ед./мл пенициллина, 0.1 мг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина) ("Биохимик", Россия); парафин "HISTOMIX", формалин ("BioVitrum", Россия); RIPA-буфер, ДНК-полимеразу Maxima Hot Start, полинуклеотид киназу Т4, рибонуклеазу Н ("Thermo Scientific", США), обратную транскриптазу SuperScript III ("Life technologies", США); рибонуклеазу Т1, маркер молекулярного веса белка 10-250 кДа ("MBI Fermentas", США), набор Annexin V-FITC/PI №аb14085, поликлональные первичные антитела anti-PDCD4 (ab79405), anti-Pten (ab154812), anti-GAPDH (ab9485), моноклональные антитела anti-caspase-3 (ab2302) и вторичные антитела HRP-conjugated goat anti-rabbit (ab6721) ("Abcam", Великобритания), матригель ("Corning", США). В работе использовали культуральный пластик фирмы "Costar" и "ТРР" (США).

2.1.2 Оборудование

В работе были использованы: амплификатор в режиме реального времени "iCycler iQ5" ("Bio-Rad", CIIIA): амплификатор "Mastercycler Pro" ("Eppendorf", Германия): спектрофотометры "BioMate 3" ("Thermo", США) и "Cary 300 Bio" ("Varian", Австралия); центрифуги "MiniSpin Plus Eppendorf", "Eppendorf 5810R", "Eppendorf 5415R" ("Eppendorf", Германия); компактная роботизированная станция "Robotics" ("Corbett", США); магнитная мешалка "MR 3001" ("Heidolph", Германия); вортекс "Reax top" ("Heidolph", Германия); ("БИС-Н", Россия); микротермостат модели "208" камера для полиакриламидного электрофореза ("Helicon", Россия); камера для полиакриламидного электрофореза ("Kodak", США); pH-метр ("Orion 410A", США), прибор для электропереноса "Semi-phor TE70" ("Hoefer scientific instruments", США), система гель документации "Pharos FX Plus" ("Bio-Rad", CША); система гель документации "Bio-Vision" ("Vilber Lourmat", Франция); система визуализации "In-vivo MS FX PRO Imaging System" ("Carestream", CША); источник питания "Power-pac 3000" ("Bio-Rad", CША), вакуумная сушка для гелей ("Labconco", CША), счётчик клеток и анализатор их жизнеспособности "TC20" ("Bio-Rad", CША), микротом "Microm HM 355S" ("Thermo Fisher Scientific", США); клеточный анализатор в режиме реального времени xCELLigence® Real-Time Cell Analysis, проточный цитофлуориметр "Novocyte" ("ACEA Biosciences, Inc.", CША), мультиспектральный анализатор "Versadoc 4000 MP" ("Bio-Rad", CША), инвертированные микроскопы "Биолам П2-1" ("ЛОМО", Россия) и "Primo Vert", "Axiostar Plus" ("Ziess", Германия), камера "Axiocam MRc5" ("Ziess", Германия), гомогенизатор "T 10 basic ULTRA-TURRAX®" ("IKA", Германия). Для обработки полученных результатов использовали следующее специальное программное обеспечение: Adobe Photoshop CS3, Bio-Rad iQ5 v. 2.0, Quantity One v.4.6.5, Origin8, STATISTICA v.10.0, ANOVA, ImageJ, Gel Pro, RTCA Software 2.0.

2.1.3 Олигонуклеотиды и олигонуклеотид-пептидные конъюгаты

миРНК-21 5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3', содержащая ОН-группу на 5'-конце молекулы, и 2'OMe-олигонуклеотиды были синтезированы к.х.н. М.И. Мещаниновой в Лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН твердофазным фосфитамидным методом [205] на автоматическом синтезаторе ASM-800 ("Биоссет", Россия) и очищены гель-электрофорезом в денатурирующих условиях.

Олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы в Лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН с помощью стандартного фосфитамидного метода и выделены с помощью обращено-фазовой ВЭЖХ.

Олигонуклеотиды, содержащие N-(метансульфонил)фосфорамидные и фосфотиоатные модификации, были синтезированы к.х.н. Е.А. Бураковой в научной группе под руководством к.х.н. Д.А. Стеценко.

Олигонуклеотид-пептидные конъюгаты были синтезированы проф. Е.В. Биченковой и д-ром (PhD) Аледом Вильямсом в Университете Манчестера (Манчестер, Великобритания).

В экспериментах по исследованию биологической активности олионуклеотид-пептидных конъюгатов на культурах клеток и опухолевой модели *in vivo* для сравнения был использован коммерческий ингибитор миРНК-21 "hsa-miR-21 5-p inhibitor" ("Ambion", CША) (далее в тексте обозначен как "*Inh*").

Последовательности олигонуклеотидов и олигонуклеотид-пептидных конъюгатов указаны в Таблице 3 и Таблице 4, соответственно. Последовательности специфических праймеров для реакции обратной транскрипции и stem-loop ПЦР указаны в Таблице 5.

Олигонуклеотиды, исследуемые в качестве адресующей компоненты иРНКазы			
Название	Последовательность 5'->3'		
5'-10	TGATAAGCTA		
5'-h-6/10	TGATAAGCTAGTCAGCGAAAGCTGAC		
5'-h-9/10	TGATAAGCTACAAGTCAGCGAAAGCTGACTTG		
5'-12	TCTGATAAGCTA		
5'-h-6/12	TCTGATAAGCTAGTCAGCGAAAGCTGAC		
5'-h-9/12	TCTGATAAGCTACAAGTCAGCGAAAGCTGACTTG		
5'-14	AGTCTGATAAGCTA		
5'-h-6/14	AGTCTGATAAGCTAGTCAGCGAAAGCTGAC		
5'-h-9/14	AGTCTGATAAGCTACAAGTCAGCGAAAGCTGACTTG		
5'-16	TCAGTCTGATAAGCTA		
5'-h-6/16	TCAGTCTGATAAGCTAGTCAGCGAAAGCTGAC		
5'-h-9/16	TCAGTCTGATAAGCTACAAGTCAGCGAAAGCTGACTTG		
3'-16	TCAACATCAGTCTGAT		
3'-h-6/16	GTCAGCGAAAGCTGACTCAACATCAGTCTGAT		
3'-h-9/16	GTCAGCGAAAGCTGACTTGTCAACATCAGTCTGAT		
2'OMe-5'-h-6/14	AGTcugauaagcuaGTCAGCGAAAGCTGAC		
2'OMe-5'-h-9/14	agucugauaagcuacaagucagcgaaagcugacuug		
	Антисмысловые олигонуклеотиды		
µ-миРНК-17-ОN	$C_{\mu}T_{\mu}A_{\mu}C_{\mu}C_{\mu}T_{\mu}G_{\mu}C_{\mu}A_{\mu}C_{\mu}T_{\mu}G_{\mu}T_{\mu}A_{\mu}A_{\mu}G_{\mu}C_{\mu}A_{\mu}C_{\mu}T_{\mu}T_{\mu}G$		
µ-миРНК-21-ОN	$T_{\mu}C_{\mu}A_{\mu}A_{\mu}C_{\mu}A_{\mu}T_{\mu}C_{\mu}A_{\mu}G_{\mu}T_{\mu}C_{\mu}T_{\mu}G_{\mu}A_{\mu}T_{\mu}A_{\mu}A_{\mu}G_{\mu}C_{\mu}T_{\mu}A$		
µ-миРНК-155-ОN	$A_{\mu}A_{\mu}C_{\mu}C_{\mu}C_{\mu}C_{\mu}T_{\mu}A_{\mu}T_{\mu}C_{\mu}A_{\mu}C_{\mu}G_{\mu}A_{\mu}T_{\mu}T_{\mu}A_{\mu}G_{\mu}C_{\mu}A_{\mu}T_{\mu}T_{\mu}A_{\mu}A$		
μ-Scr-ON	$C_{\mu}A_{\mu}G_{\mu}T_{\mu}C_{\mu}T_{\mu}C_{\mu}G_{\mu}T_{\mu}A_{\mu}T_{\mu}G_{\mu}T_{\mu}A_{\mu}G_{\mu}T_{\mu}G_{\mu}G_{\mu}T_{\mu}T$		
РS-миРНК-21-ОN	$T_sC_sA_sA_sC_sA_sT_sC_sA_sG_sT_sC_sT_sG_sA_sT_sA_sA_sG_sC_sT_sA$		
PS-Scr-ON	$C_sA_sA_sG_sT_sC_sT_sC_sG_sT_sA_sT_sG_sT_sA_sG_sT_sG_sG_sT_sT$		
µ-luc-ON	$T_{\mu}G_{\mu}C_{\mu}A_{\mu}A_{\mu}C_{\mu}T_{\mu}C_{\mu}C_{\mu}G_{\mu}A_{\mu}T_{\mu}A_{\mu}A_{\mu}A_{\mu}A_{\mu}A_{\mu}C_{\mu}G_{\mu}C_{\mu}G$		
PS-luc-ON	$T_sG_sC_sA_sA_sC_sT_sC_sC_sG_sA_sT_sA_sA_sT_sA_sA_sC_sG_sC_sG$		
PO-luc-ON	TGCAACTCCGATAAATAACGCG		
РО-миРНК-21-ОN	TCAACATCAGTCTGATAAGCTA		
Су5.5-µ-миРНК-21-ОN	$5^{\prime}\text{-}T^{\mu}C^{\mu}A^{\mu}A^{\mu}C^{\mu}A^{\mu}T^{\mu}C^{\mu}A^{\mu}G^{\mu}T^{\mu}C^{\mu}T^{\mu}G^{\mu}A^{\mu}T^{\mu}A^{\mu}A^{\mu}G^{\mu}C^{\mu}T^{\mu}A\text{-}Cy5.5$		
Су5.5-PS-миРНК-21-ОN	5'-T _S C _S A _S A _S C _S A _S T _S C _S A _S G _S T _S C _S T _S G _S A _S T _S A _S A _S G _S C _S T _S A-Cy5.5		

Таблица 3. Последовательность олигонуклеотидов, используемых в работе

Заглавные буквы – дезоксирибонуклеотиды, строчные буквы – 2'ОМе-нуклеотиды; µ – N-(метансульфонил)фосфорамидная модификация межнуклеотидной связи; s – фосфотиоатная модификация межнуклеотидной связи Таблица 4. Последовательность олигонуклеотид-пептидных конъюгатов и модифицированных аналогов антисмысловых олигонуклеотидов, используемых в работе

Название	Последовательность 5'→3'
5'-h-6/14	$[(LeuArg)_2Gly]_2 - NH_2(CH_2)6 - AGTCTGATAAGCTAGTCAGCGAAAGCTGAC$
5'-h-9/14	[(LeuArg) ₂ Gly] ₂ –NH ₂ (CH ₂)6– AGTCTGATAAGCTACAAGTCAGCGAAAGCTGACTTG
5'-16	$[(LeuArg)_2Gly]_2 - NH_2(CH_2)6 - TCAGTCTGATAAGCTA$
5'-h-6/16	$[(LeuArg)_2Gly]_2 - NH_2(CH_2)6 - TCAGTCTGATAAGCTAGTCAGCGAAAGCTGAC$
5'-h-9/16	[(LeuArg) ₂ Gly] ₂ -NH ₂ (CH ₂)6 TCAGTCTGATAAGCTACAAGTCAGCGAAAGCTGACTTG
3'-16	TCAACATCAGTCTGAT-NH ₂ (CH ₂)6-[(LeuArg) ₂ Gly] ₂
3'-h-6/16	GTCAGCGAAAGCTGACTCAACATCAGTCTGAT-NH ₂ (CH ₂)6-[(LeuArg) ₂ Gly] ₂
3'-h-9/16	GTCAGCGAAAGCTGACTTGTCAACATCAGTCTGAT- NH ₂ (CH ₂)6- [(LeuArg) ₂ Gly] ₂
2'ОМе- миРНКаза (1)	$[(LeuArg)_2Gly]_2 - NH_2(CH_2)6 - agucugauaagcuaGTCAGCGAAAGCTGAC$
2'ОМе- миРНКаза (2)	$[(LeuArg)_2Gly]_2 - NH_2(CH_2)6 - AGT cugauaagcuaGTCAGCGAAAGCTGAC$
5'-luc-h-6/14	$[(LeuArg)_2Gly]_2 - NH_2(CH_2)6 - CGATAAATAACGCGGTCAGCGAAAGCTGAC$
5'-luc-h-9/14	[(LeuArg) ₂ Gly] ₂ -NH ₂ (CH ₂)6- CGATAAATAACGCGCAAGTCAGCGAAAGCTGACTTG

NH₂(CH₂)₆ – аминогексильный линкер; заглавные буквы – дезоксирибонуклеотиды, строчные буквы – 2'ОМе-нуклеотиды

Таблица 5. Последовательность олигодезоксирибонуклеотидных праймеров, использованных в работе

Праймеры для обратной транскрипции			
Название	Последовательность 5'-3'		
RT-mir-17	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCTACCT		
RT-mir-155	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGACACCCCTATCA		
RT-mir-21	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAACATCAG		
<i>RT-U6</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAAAATATGGAACG		
Праймеры для полимеразной цепной реакции			
Название		Последовательность 5'-3'	
mir-17-F		AGACAAAGTGCTTACAGTGC	
mir-155-F		ACTTAATGCTAATTGTGATAGG	
mir-21-F		AGACTAGCTTATCAGACTGA	
U6-F		CTCGCTTCGGCAGCACA	
Универсальни	ый обратный праймер	GTGCAGGGTCCGAGGT	

Синим цветом выделена последовательность нуклеотидов, комплементарная 3'-району миРНК; зеленым цветом выделена последовательность петли, красным цветом выделена последовательность стебля

2.1.4 Буферы и растворы

Буфер D	6 М мочевина, 25 мМ цитрат натрия (pH 4.8), 1 мМ EDTA, 100
	мкг/мл суммарной тРНК <i>Escherichia coli</i>
Буфер Е	2 М имидазол (pH 7.0), 1мМ EDTA, 250 мкг/мл суммарной
	тРНК Escherichia coli
Буфер F	20 мМ Трис-HCl (pH 7.8), 40 мМ KCl, 8 мМ MgCl ₂ , 1 мМ DTT
Буфер Н	50 мМ Трис-HCl (pH 7.0), 200 мМ KCl, 1 мМ EDTA
Буфер L	2% SDS, 10% глицерин, 5% β-меркаптоэтанол, 0.002%
	бромфенол, 0.0625 М Трис-HCl (pH 6.8)
Буфер ТВ	47.9 мМ Трис (рН 8.3), 38.6 мМ глицин, 0.1% SDS, 10% этанол
Буфер TBST	137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na ₂ HPO ₄ , 1.8 мМ K ₂ HPO ₄ (pH
	7.4), 0.1% Tween 20
Буфер TGB	25 мМ Трис (рН 8.3), 0.25 М глицин, 0.1% SDS
ОТ-буфер	50 мМ Трис-HCl (pH 8.3), 75 мМ KCl, 3 мМ MgCl ₂
ПЦР-буфер	10 мМ Трис-HCl (pH 8.3), 50 мМ KCl, 1.2 мМ MgCl ₂
Т4-ПНК-буфер	50 мМ Трис-HCl (pH 7.6), 10 мМ MgCl ₂ , 5 мМ DTT, 0.1 мМ
	спермидин
TBE	0.089 М Трис-борат (рН 8.3), 2 мМ Na ₂ EDTA,
Раствор К	20% фиколл, 0.025% ксиленцианол, 0.025% бромфенол
Раствор М	8 М мочевина, 0.025% ксиленцианол, 0.025% бромфенол

2.1.5 Трансфицирующие агенты

В работе использовали коммерческий трансфицирующий агент Lipofectamine2000^{тм} ("Invitrogen", США) и фолат-содержащие катионные липосомы F, синтезированные под руководством д.х.н., проф. М.А. Маслова (МИРЭА, Москва).

2.1.6 Клеточные культуры

Клетки меланомы мыши B16 были получены из банка клеточных культур Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина (Москва, Россия). Клетки лимфосаркомы мыши RLS₄₀, обладающие фенотипом множественной лекарственной устойчивости и растущие в присутствии 40 нМ винбластина, были получены в Институте Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН [206]. Клетки эпидермоидной карциномы человека KB-8-5, обладающие фенотипом множественной лекарственной устойчивости [207] и растущие в присутствии 300 нМ винбластина, были любезно предоставлены проф. М. Gottesman (NIH, США). Клетки В16 и КВ-8-5 культивировали в среде DMEM, клетки RLS₄₀ культивировали в среде IMDM, содержащих 10% БЭС и 1% раствор антибиотиков и антимикотиков (100 ед./мл пенициллина, 0.1 мкг/мл стрептомицина, 0.25 мкг/мл амфотерицина), в атмосфере 5% CO₂ при 37 °C. Клетки пересеивали раз в 3-4 дня для поддержания экспоненциального роста. Для наблюдения за клетками использовали инвертированный микроскоп.

2.1.7 Лабораторные животные

В работе использовали 10-14-недельных мышей линии CBA разведения вивария ИХБФМ СО РАН и 6-8-недельных мышей линии SCID (SHO-Prkdc ^{SCID} Hr ^{HR}) разведения SPF вивария Института цитологии и генетики (ИЦиГ) СО РАН. Животных содержали по 8-10 особей в клетке, мыши имели свободный доступ к еде и воде. Все операции с животными проводили в соответствии с ЕСС директивой 86/609/ЕЕС. Протокол исследования (#53) был утверждён этическим комитетом ИЦиГ СО РАН.

2.2 Методы

2.2.1 Гель-Электрофорез

2.2.1.1 Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в нативных условиях

Электрофорез проводили в нативном 12%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) при соотношении акриламид : N,N'-метиленбисакриламид = 19 : 1 в буфере ТВЕ при 4 °C при напряженности электрического поля 10-20 В/см в течение 3-4 ч. Перед нанесением на гель пробы смешивали с раствором L. Гель высушивали и сканировали с помощью системы гельдокументации "Pharos FX Plus". Полученные после сканирования изображения анализировали с помощью программы Quantity One v.4.6.5 и Origin8.

2.2.1.2 Электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях

Электрофорез проводили в 12%, 15% или 18%-ном ПААГ при соотношении акриламид:N,N'-метиленбисакриламид = 19 : 1 в присутствии 8 М мочевины в буфере ТВЕ при напряженности электрического поля 30-45 В/см. Гели высушивали и анализировали как описано в п. 2.2.1.1.

2.2.2 Введение радиоизотопной метки по 5'-концу миРНК с использованием полинуклеотидкиназы

Введение радиоизотопной метки γ -[³²P] по 5'-ОН миРНК-21 проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 0.2 мКи γ -[³²P]-АТР, 10 ед. акт. Т4 полинуклеотидкиназы, 4 мкг миРНК-21 и Т4-ПНК-буфер при 4 °C в течение ночи [208]. 5'-[³²P]-миРНК выделяли с помощью электрофореза в 12%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. По окончании электрофореза полосу геля, содержащую меченую миРНК-21, визуализировали с помощью радиоавтографии и вырезали из геля. Меченую миРНК элюировали в 350 мкл 0.3 М ацетата натрия, pH 5.2, в присутствии 15%-ного фенола, затем осаждали 3-4 объемами этилового спирта при -20 °C в течение 18 ч. Раствор центрифугировали при 13000 об/мин в течение 15 мин, осадок промывали 3-4 объемами этилового спирта, высушивали, растворяли в воде, обработанной DEPC, и хранили при -20 °C.

2.2.3 Исследование гибридизационных свойств олигонуклеотидов и олигонуклеотидпептидных конъюгатов методом задержки в геле

Гибридизацию проводили в реакционной смеси, объёмом 4 мкл, содержащей 100 имп/мин 5'-[³²P]-миРНК-21, миРНК-21 в концентрации 1 мкМ, олигонуклеотид или конъюгат в диапазоне концентраций 0.1 – 10 мкМ в буфере Н при температуре 37 °C в течение 1 ч. Реакцию останавливали добавлением 4 мкл раствора К и анализировали методом задержки в 15%-ном нативном ПААГ. Непосредственно после остановки реакции образцы вносили в гель идущего электрофореза с интервалом 2 мин.

Исследование кинетических параметров гибридизации олигонуклеотидов с миРНК-21 проводили в реакционной смеси, объемом 40 мкл, содержащей 1000 имп/мин 5'-[³²P]-миРНК-21, миРНК-21 в концентрации 1 мкМ, олигонуклеотид в концентрации 0.5 мкМ в буфере Н при температуре 37 °C. Аликвоты, объемом 4 мкл отбирали через 0.5, 2, 5, 10, 15, 20, 30 и 60 мин. Реакцию останавливали добавлением 4 мкл раствора К и анализировали методом задержки в 15%-ном нативном ПААГ. Непосредственно после остановки реакции образцы вносили в гель идущего электрофореза с интервалом 2 мин. Структура всех олигонуклеотидов и олигонуклеотид-пептидных конъюгатов, исследованных в работе, приведены в Таблице 3 и Таблице 4, соответственно.

2.2.4 Анализ термостабильности комплексов олигонуклеотидов с миРНК

Термодинамический анализ комплексов олигонуклеотидов с миРНК-21 был проведен к.ф.м.н. А.А. Ломзовым (ЛБМХ, ИХБФМ СО РАН). Исследования термостабильности комплексов миРНК-21 и олигонуклеотидов в эквимолярной концентрации 2.5 мкМ, проводили в буфере F методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала на спектрофотометре "Cary 300 Bio" ("Varian", Австралия), используя шестисекционный терморегулируемый кюветодержатель. Регистрацию оптического поглощения на длинах волн 260 и 270 нм проводили при нагревании образцов с 6 до 95 °C со скороростью нагрева 0.5 °C/мин. Термодинамические параметры определяли с помощью программы Simplex (А.В. Иванов, ИЛФ СО РАН), анализируя профили кривых термической денатурации в приближении модели двух состояний [209].

2.2.5 Исследование эффективности расщепления миРНК олигонуклеотид-пептидными конъюгатами

Расщепление миРНК под действием олигонуклеотид-пептидных конъюгатов проводили в условиях однооборотной и многооборотной реакций. Реакционную смесь объёмом 22 мкл, содержащую 1100 имп/мин 5'-[32 P]-меченой миРНК-21, буфер H и миРНК-21 в концентрации 1 мкМ и конъюгат в концентрации 1 – 50 мкМ (однооборотная реакция) или миРНК в концентрации 10 – 50 мкМ и конъюгат в концентрации 5 мкМ (многооборотная реакция) инкубировали при 37 °С. Аликвоты, объемом 2 мкл, отбирали через 0, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96 и 144 ч. Реакцию останавливали добавлением 10-кратного объема 2%-ного раствора перхлората лития в ацетоне, осадок РНК отделяли центрифугированием при 13000 об/мин в течение 15 мин, высушивали и растворяли в растворе М. В качестве контроля инкубировали реакционную смесь того же состава, но в отсутствие конъюгатов. Продукты гидролиза анализировали с помощью электрофореза в 18%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. Соотнесение сайтов гидролиза проводили сравнением с продуктами статистического гидролиза этой же РНК под действием РНКазы Т1 и 2 М имидазола.

2.2.6 Исследование эффективности расщепления миРНК в гетеродуплексах с олигонуклеотид-пептидными конъюгатами и химически модифицированными олигонуклеотидами в присутствии РНКазы Н

2.2.6.1 Исследование эффективности расщепления миРНК под действием РНКазы Н в гетеродуплексе с олигонуклеотид-пептидными конъюгатами

Реакционную смесь, объёмом 20 мкл, содержащую 1000 имп/мин 5'-[³²P]-меченой миРНК-21, немеченную миРНК-21 в концентрациях 10, 25 и 50 мкМ и конъюгат в концентрации 5 мкМ в буфере F инкубировали при 37 °C в течение 20 мин. Затем добавляли рибонуклеазу H до итоговой концентрации в растворе 100 ед. акт./мл и продолжали инкубировать при 37 °C. Аликвоты, объемом 2 мкл, отбирали через 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 и 48 ч после добавления фермента. Реакцию останавливали добавлением 10-кратного объема 2%-ного раствора перхлората лития в ацетоне, осадок РНК отделяли центрифугированием при 13000 об/мин в течение 15 мин, высушивали и растворяли в растворе М. В качестве контроля инкубировали реакционную смесь того же состава, но в отсутствие олигонуклеотида или конъюгата. Продукты гидролиза анализировали как описано в п. 2.2.8. Расчёт числа оборотов реакции (Reaction turnover, Rt) проводили согласно формуле Rt = [концентрация миРНК-21] × (количество расщепляемых связей) × (эффективность расщепления, %) / [концентрация конъюгата].

2.2.6.2 Исследование эффективности расщепления миРНК под действием РНКазы Н в гетеродуплексе с антисмысловыми олигонуклеотидами

Реакционную смесь, объёмом 26 мкл, содержащую 1300 имп/мин 5'-[³²P]-меченой миРНК-21, немеченную миРНК-21 и олигонуклеотиды в эквимолярной концентрации 1 мкМ в буфере F инкубировали при 37 °C в течение 20 мин. Затем добавляли рибонуклеазу H до итоговой концентрации в растворе 85 ед. акт./мл и продолжали инкубировать при 37 °C. Аликвоты, объемом 2 мкл, отбирали через 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 20 и 30 мин после добавления фермента. Реакцию останавливали добавлением 10-кратного объема 2%-ного раствора перхлората лития в ацетоне, осадок РНК отделяли центрифугированием при 13000 об/мин в течение 15 мин, высушивали и растворяли в растворе М. В качестве контроля инкубировали реакционную смесь того же состава, но в отсутствие олигонуклеотида или конъюгата. Продукты гидролиза анализировали как описано в п. 2.2.8.

2.2.7 Частичный гидролиз РНК в денатурирующих условиях

Для определения сайтов гидролиза при расщеплении миРНК под действием олигонуклеотид-пептидных конъюгатов или РНКазы Н в качестве маркеров использовали частичные гидролизаты миРНК, полученные в денатурирующих условиях (лэддеры).

2.2.7.1 Частичное расщепление 5'-[³²P]-миРНК-21 РНКазой Т1

Реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 5'-[³²P]-миРНК (1000 имп/мин) и 9 мкл буфера D инкубировали при 55 °C в течение 10 мин, затем при 0 °C в течение 1 мин. Затем к пробе миРНК добавляли 1 ед. акт. РНКазы T1 и вновь инкубировали при 55 °C в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением 1 мкл 10×ТВЕ.

2.2.7.2 Частичное расщепление 5'-[³²P]-миРНК-21 в имидазольном буфере

Реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 5'-[³²P]-миРНК (1000 имп/мин) и 9 мкл буфера Е инкубировали при 90 °C в течение 30 мин. По окончании реакции пробы осаждали 10-кратным объемом 2%-ного перхлората лития в ацетоне, осадок отделяли

центрифугированием при 13000 об/мин, в течение 15 мин, комнатной температуре, высушивали и растворяли в растворе М.

2.2.8. Анализ эффективности гибридизации и расщепления миРНК

После проведения реакции гибридизации и расщепления гели высушивали и сканировали с помощью системы гель-документации Pharos FX Plus. Полученные после сканирования изображения анализировали с помощью программ Quantity One v.4.6.5 и Origin8.

Степень связывания олигонуклеотидов и олигонуклеотид-пептидных конъюгатов с миРНК определяли как отношение интенсивности полосы комплекса миРНК/олигонуклеотид к сумме интенсивностей полос, соответствующих комплексу и несвязанной миРНК.

Суммарне. степень расщепления миРНК определяли, как отношение суммарной интенсивности полос образовавшихся фрагментов миРНК к суммарной интенсивности всех фрагментов, включая нерасщепленную миРНК. Накопление отдельного фрагмента расщепленной миРНК оценивали как отношение интенсивности полосы фрагмента к суммарной интенсивности всех фрагментов, включая нерасщепленную миРНК.

Эффективные константы скорости расщепления или комплексообразования рассчитывали согласно формуле: $F(t)=a\times(1-e^{-k}_{eff}t)$, где k_{eff} – эффективная константа скорости; t – время; a – концентрация субстрата.

2.2.9 Исследование стабильности химически модифицированных олигонуклеотидов и олигонуклеотид-пептидных конъюгатов в ростовой среде и сыворотке крови мышей

2.2.9.1 Приготовление сыворотки крови мышей

Непосредственно перед экспериментом получали свежую сыворотку крови мышей линии C57/Black. Немедленно после забора крови образцы инкубировали при 37 °C в течение 30 мин с последующим охлаждением при –20 °C в течение ночи. Далее образцы центрифугировали при 4000 об/мин, +4 °C в течение 20 мин. Полученную сыворотку крови сразу же использовали для исследования нуклеазоустойчивости олигонуклеотидов и олигонуклеотид-пептидных конъюгатов.

2.2.9.2 Исследование нуклеазоустойчивости олигонуклеотидов и олигонуклеотидпептидных конъюгатов

Реакционную смесь объемом 80 мкл, содержащую ростовую среду DMEM с 10%-ной или 50%-ной бычьей эмбриональной сывороткой (БЭС) или сыворотку крови мышей, конъюгат или олигонуклеотид в концентрации 0.1 мкг/мкл инкубировали при 37 °C. Аликвоты объемом 10 мкл отбирали через 0, 0.5, 2, 4, 8, 24, 48 ч в реакции с конъюгатами и через 24, 48, 72, 96 и

168 ч в реакции с модифицированными олигонуклеотидами. Аликвоту смешивали с равным объемом 8 М мочевины и замораживали в жидком азоте. Образцы хранили при -20 °C. Для разделения продуктов реакции использовали электрофорез в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. Гель окрашивали с помощью stains-all и визуализировали при помощи системы гель документации «Infinity».

2.2.10 Приготовление комплексов катионных липосом и нуклеиновых кислот

В исследованиях на культурах опухолевых клеток трансфекцию препаратов проводили с помощью коммерческого препарата Lipofectamine2000TM (LF). Формирование липоплексов проводили путём инкубации LF в среде Opti-MEM при комнатной температуре в течение 5 мин, с последующим смешиванием с равным объёмом раствора олигонуклеотидов или конъюгатов в среде Opti-MEM и инкубацией в течение 20 мин при комнатной температуре. После чего липоплексы добавляли к клеткам. Условия трансфекции для проведения функциональных тестов указаны в Таблице 6.

Для исследования биологической активности модифицированных олигонуклеотидов *in vivo* использовали фолат-содержащие катионные липосомы F. Комплексообразвание химически модифицированных олигонуклеотидов и липосом F проводили при соотношении N/P (количество азотов катионного липида и липида-хэлпера липосом и фосфоров нуклеиновых кислот) равном 4:1. Приготовление липоплексов проводили путём смешивания липосом F и олигонуклеотидов в среде Opti-MEM с последующей инкубацией в течение 20 мин при комнатной температуре. После чего липоплексы вводили животным.

2.2.11 Трансфекция опухолевых клеток олигонуклеотидами и олигонуклеотидпептидными конъюгатами

Трансфекцию клеток RLS₄₀, B16 и KB-8-5 проводили в присутствии трансфецирующего агента Lipofectamine2000TM согласно протоколу производителя. Перед трансфекцией клетки осаждали центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 мин и высаживали в планшеты в среде, не содержащей сыворотки и антибиотиков. Концентрация клеток и объёмы растворов, использованные в экспериментах, указаны в Таблице 6. Приготовление липоплексов проводили как описано в п. 2.2.10. Трансфекцию клеток проводили в атмосфере 5%-ного CO₂ при 37 °C в течение 4 ч, после чего среду в каждой лунке заменяли на культуральную среду, содержащую 10%-ную БЭС и 1%-ный раствор антибиотиков и антимикотика, и продолжали инкубировать в атмосфере 5%-ного CO₂ при 37 °C. Далее клетки использовали непосредственно для проведения тестов либо для выделения суммарной клеточной PHK с использованием TRIzol.

Тест	Планшет	Клеточная линия	Кол-во клеток*	Среда *	Соединения, мкМ	Комплексы ON/LF в Opti-MEM,	LF *
MTT	96	RLS ₄₀	3×10^{4}	75 мкл IMDM	5'-h-9/14 (1 мкМ)	мкл * 25 мкл	0.9 мкл
Annexin V/FITC, Инвазия (xCelligence)	24	B16	2×10^{5}	200 мкл DMEM	5'-h-9/14 (1 мкМ), µ- и PS-ON (0.1	50 мкл	1.6 мкл
Вестерн Блот, ПЦР		B16, RLS ₄₀	$1 - 1.5 \times 10^{5}$		мкМ)		
Пролиферация (xCelligence)	16	B16, KB-8-5	5×10 ³	100 мкл DMEM	5'-h-6/14 (1 мкМ), 2'ОМе- миРНКазы (0.5 мкМ),µ- и PS-ON (0.1 мкМ, 0.2 мкМ)	25 мкл	0.9 мкл
Миграция (Scratch тест)	6	B16	2.5×10^{5}	640 мкл IMDM	640 year	μ- и PS-ON (0.1 мкМ),	6.4 мкл
		KB-8-5	5×10^{5}		2'ОМе- миРНКаза (2) (0.5 мкМ)	80 мкл	

Таблица 6. Параметры проведения трансфекции нуклеиновыми кислотами опухолевых клеток различного гистогенеза для проведения функциональных тестов.

* Количество указано в расчёте на одну лунку планшета.

2.2.12 Выделение суммарной клеточной РНК из опухолевых клеток и ткани

Суммарную клеточную РНК выделяли из клеток и опухолевой ткани с использованием реагента TRIzol согласно методике фирмы производителя. Для предотвращения деградации РНК все операции проводили во льду. Фрагменты опухоли гомогенизировали в 1 мл TRIzol с помощью гомогенизатора "T 10 basic ULTRA-TURRAX®" ("IKA", Германия), полученные образцы хранили при -20 °C до выполнения последующих манипуляций. При выделении РНК из опухолевых клеток, клетки осаждали центрифугированием при 2000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант удаляли, к осадку клеток добавляли TRIzol из расчёта 1 мл реагента на 10⁶ клеток. Клетки суспендировали и выдерживали при комнатной температуре в течение 5 мин. Далее к полученной клеточному лизату или гомогенату опухоли добавляли хлороформ в объеме, составляющем 1/5 от объема TRIzola, и инкубировали в течение 2–3 мин при комнатной температуре. Водную фазу отделяли центрифугированием при 12000 об/мин, 4 °C, в течение 15 мин, переносили в новую пробирку, добавляли к ней изопропиловый спирт в объеме, составляющем ¹/₂ от объема TRIzola, и инкубировали при комнатной температуре 10 мин. Осадок РНК отделяли центрифугированием при 13000 об/мин, 4 °C, в течение 20 мин, промывали 75%-ным этанолом, высушивали, растворяли в воде, хранили при -20 °C. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 260 нм. Степень чистоты РНК определяли по поглощению на длинах волн 260 и 280 нм и расчёту соотношения 260/280. Для реакции обратной транскрипции были использованы образцы с соотношением 260/280 не менее 1.8.

2.2.13 Исследование влияния олигонуклеотид-пептидных конъюгатов и химически модифицированных олигонуклеотидов на пролиферацию опухолевых клеток в режиме реального времени с помощью системы xCelligence

Исследование пролиферации клеток эпидермоидной карциномы KB-8-5 и меланомы B16 регистрировали в режиме реального времени с помощью прибора xCELLigence ("ACEABiosciences", CША) в атмосфере 5% CO₂ при 37 °C. Для этого опухолевые клетки высаживали в 16-ти луночные планшеты E-Plate по 5×10^3 клеток на лунку. На следующие сутки проводили трансфекцию клеток ДНК-иPHKазами (0.5 или 1 мкМ), 2'OMe-миPHKазами и соответствующими олигонуклеотидами (0.5 мкМ) или μ - и PS-олигонуклеотидами (100-200 нМ) в комплексе с Lipofectamine2000TM как описано в п. 2.2.10 и 2.2.11 (Таблица 6). Через 4 ч после трансфекции среду в лунках заменяли средой DMEM, содержащей 10%-ную БЭС и 1%-ный раствор антибиотиков и антимикотика. Эксперименты по пролиферации клеток проводили в течение 144 ч, клеточный индекс регистрировался каждые 30 мин в течение всей продолжительности эксперимента.

2.2.14 Исследование влияния олигонуклеотид-пептидных конъюгатов на инвазивные свойства опухолевых клеток с использованием матригеля и системы xCelligence

Исследование инвазивного потенциала клеток меланомы В16 проводили через 24 ч после трансфекции клеток конъюгатом или олигонуклеотидом (как описано в п. 2.2.10 и 2.2.11, Таблица 6) в режиме реального времени с помощью прибора xCELLigence в 16-ти луночных планшетах CIM-Plate в атмосфере 5% CO₂ при 37 °C. В лунки верхней камеры добавляли матригель в объёме 20 мкл на лунку, предварительно разведённый в соотношении 1:30 в охлажденной среде DMEM, и оставляли полимеризоваться в течение 4 ч при 37 °C в атмосфере 5% CO₂. По окончании полимеризации матригеля в лунки нижней камеры добавляли среду DMEM, содержащую 10%-ную БЭС (160 мкл/лунку), а в лунки верхней камеры – среду DMEM без сыворотки (30 мкл/ лунку). Трансфицированные клетки B16, промывали PBS, открепляли с использованием трипсина, суспендировали в среде DMEM, центрифугировали при 2000 об/мин

в течение 5 мин, к осадку клеток добавляли свежую DMEM без сыворотки, а затем высеивали в лунки верхней камеры планшета в количестве 5×10⁴ кл на лунку. Эксперименты проводили в течение 168 ч, клеточный индекс регистрировался каждые 30 мин в течение всей продолжительности эксперимента.

2.2.15 Исследование влияния олигонуклеотид-пептидных конъюгатов и химически модифицированных олигонуклеотидов на миграционную активность опухолевых клеток методом зарастания царапины (scratch теста)

Для исследования миграционной активности клетки меланомы В16 и эпидермоидной карциномы КВ-8-5 высаживали в 6-ти луночные планшеты в среде IMDM, не содержащей антибиотиков, и на следующие сутки проводили трансфекцию клеток конъюгатами или олигонуклеотидами как описано в п. 2.2.10 и 2.2.11 (Таблица 6). В течение эксперимента клетки инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37 °C. Через 24 ч после трансфекции в монослое клеток наносили царапину, затем клетки промывали стерильным физиологическим раствором и инкубировали в прежних условиях в течение 72 ч. Через 0, 24, 48 и 72 ч клетки фотографировали с помощью микроскопа Zeiss Primo Vert («Zeiss», Германия) на 4-кратном увеличении. Фотографии клеток обрабатывали с помощью программы ImageJ. Степень зарастания царапины (υ) оценивали по формуле $\upsilon = (1-x) \times 100\%$, где x – отношение ширины царапины через 24, 48 и 72 ч к ширине царапины в 0 ч.

2.2.16 Исследование индукции апоптоза в опухолевых клетках под действием олигонуклеотид-пептидных конъюгатов и химически модифицированных олигонуклеотидов методом окрашивания клеток Annexin V-FITC/PI

Для определения проапоптотического эффекта олигонуклеотид-пептидных конъюгатов и олигонуклеотидов клетки меланомы B16 трансфицировали конъюгатами в концентрации 1 мкМ и μ - и PS-олигонуклеотидами в концентрации 100 нМ как описано в п. 2.2.10 и 2.2.11 (Таблица 6). Через 24 ч в экспериментах с конъюгатами и через 48 ч в экспериментах с олигонуклеотидами клетки меланомы B16 промывали, открепляли трипсином, суспендировали в среде DMEM, дважды промывали стерильным PBS, ресуспендировали в коммерческом буфере «Binding Buffer» («Abcam», США) в концентрации 2 – 5×10⁵/мл и инкубировали с Annexin V-FITC и пропидий иодидом (PI) в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин. Далее клетки анализировали методом проточной цитофлуориметрии.

2.2.17 Исследование противоопухолевой активности олигонуклеотид-пептидных конъюгатов *ex vivo*

Первичную культуру клеток лимфосаркомы RLS₄₀ получали из асцитов, собранных у мышей линии СВА, которым предварительно интраперитониально в абдоминальную полость перевивали опухолевые клетки в концентрации 2×10⁶ клеток в 200 мкл физиологического раствора. Клетки RLS₄₀ выделяли из асцитной жидкости путём фильтрации через LSM ("MP Biomedicals", США), а затем разделяли на 7 групп в соответствии с дальнейшей терапией: 1) контроль – интактные клетки; 2) клетки, инкубированные с Lipofectamine2000TM; клетки, трансфицированные липоплексами Lipofectamine2000TM с олигонуклеотидами 5'-h-9/14 (3), 2'-*OMe-5'-h-9/14* (4), коммерческим ингибитором *Inh* (5) и конъюгатами **5'-h-9/14** (6) или **5'-luc-h-**9/14 (7) в концентрации 1 мкМ. Последовательности олигонуклеотидов и конъюгатов указаны в Таблицах 3 и 4, соответственно. Трансфекцию проводили как описано в п. 2.2.10 и 2.2.11. Через 4 ч после трансфекции, суспензии клеток (100 мкл, 2×10⁶ клеток) вводили внутримышечно в правую заднюю лапу мышей линии СВА для развития солидной опухоли. После того как опухоли начинали пальпироваться, каждые 2-3 дня проводили измерение объёма опухолей с использованием штангенциркуля. Объем опухоли рассчитывали по формуле: V = ($\pi/6 \times$ длина \times ширина \times высота опухоли). Время удвоения опухоли (DT) рассчитывали по формуле: DT = (t – t0) \times ln 2/(ln V – ln V0), где (t – t0) отражает период времени между измерениями размера опухоли и V0 и V отображают объём опухоли в момент времени t0 и t, соответственно [210].

2.2.18 Исследование биораспределения химически модифицированных олигонуклеотидов

Анализ биораспределения Су5.5-меченых модифицированных химически олигонуклеотидов в мышах-опухоленосителях линии SCID был проведен Д.В. Гладких (ЛБНК, ИХБФМ СО РАН). Для этого животным подкожно трансплантировали клетки эпидермоидной карциномы KB-8-5 человека (10⁶ кл в 100 мкл физиологического раствора/мышь) для формирования солидных опухолей. После формирования опухолей мышам внутривенно (200 мкл) или перитюморально (100 мкл) вводили олигонуклеотиды Су5.5-µ-миРНК-21-ОN или Cy5.5-PS-миPHK-21-ON в дозе 40 мкг/мышь в комплексе с фолат-содержащими катионными липосомами F, приготовленными как описано в п. 2.2.10. Через 4 и 24 ч после инъекций животных анестезировали изофлураном и проводили регистрацию флуоресценции на длинах волны 620 нм и 700 нм, соответствующих максимуму поглощения и испускания флуорофора Су5.5 (экспозиция 10 с) и рентгенографию (экспозиция 15 с) с помощью системы визуализации "In-vivo MS FX PRO Imaging System" ("Carestream", США). Затем мышей выводили из эксперимента, опухоли и внутренние органы, включая сердце, лёгкие, печень, селезёнку и

почки использовали для детекции флуоресценции каждого органа отдельно. Эффективность накопления Су5.5-меченых олигонуклеотидов определяли как соотношение интенсивности флуоресценции каждого органа к общей флуоресценции олигонуклеотида в организме.

2.2.19 Исследование противоопухолевой активности модифицированных олигонуклеотидов *in vivo*

Исследование противоопухолевой активности µ- и PS-олигонуклеотидов проводили на модели эпидермоидной карциномы КВ-8-5 человека на мышах линии SCID. Для этого (10^{6}) трансплантировали опухолевые клетки κл в 100 животным подкожно МКЛ физиологического раствора/мышь) для формирования солидных опухолей. На 12-ый день после формирования опухолей мыши были случайным образом поделены на 6 групп в соответствии с дальнейшей терапией: (1) контроль (Opti-MEM); (2) F (фолат-содержащие катионные липосомы F без доставляемых препаратов); (3) – (6) липоплексы с μ-миРНК-21-ON; μ-Scr-ON, PS-миРНК-21-ON и PS-Scr-ON, соответственно. Образование комплексов F с олигонуклеотидами проводили в соотношении N/P = 4/1 как описано в п. 2.2.10, а затем перитуморально вводили животным в концентрации 10 мкг/мышь с интервалом в 3 дня. Всего было проведено 4 инъекции. Объем опухоли измеряли каждые 3 дня с использованием штангенциркуля. Объём опухоли и время удвоения (DT) рассчитывали как в п. 17. На 30 день животные были выведены из эксперимента, опухоли и внутренние органы, включая почки и печень, были зафиксированы в 10%-ном формалине для дальнейших гистологических исследований. Одна четвёртая часть каждой опухоли была использована для выделения суммарной клеточной РНК и приготовления лизата для последующего анализа уровня миРНК-21 и её белков-мишеней.

2.2.20 Определение уровня миРНК в опухолевых клетках и опухолевой ткани методом количественной ОТ-ПЦР

Определение уровней миРНК-17, миРНК-21 и миРНК-155 в клетках лимфосаркомы RLS₄₀ и меланомы B16 проводили методом обратной транскрипции с использованием специфических к миРНК шпилечных праймеров с последующей количественной полимеразной цепной реакцией ("stem-loop PCR-technology") [211]. Последовательности праймеров для реакций обратной транскрипции и количественной ПЦР указаны в Таблице 5.

2.2.20.1 Обратная транскрипция

Для синтеза кДНК использовали суммарную РНК, выделенную из клеток или из опухолевой ткани, как описано в п. 2.2.12. кДНК получали в реакционной смеси объёмом 20 мкл, содержащей ОТ-буфер, 3 мкг суммарной клеточной РНК, 10 мМ DTT, 50 нМ специфического праймера (Таблица 5), 0.5 мМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов и 200

ед. обратной транскриптазы SuperScript III. Перед реакцией праймеры инкубировали при 75 °C в течение 5 мин и далее при 0 °C в течение 1 мин. Синтез кДНК проводили в следующих условиях: 1 цикл 16 °C, 30 мин; 60 циклов 30 °C, 30 сек, 42 °C, 30 сек, 50 °C, 30 сек. По окончании реакции обратную транскриптазу инактивировали в течение 1 цикла 85 °C, 5 мин.

2.2.20.2 ПЦР в режиме реального времени

ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 5 мкл кДНК в разведении $10^{-1} - 10^{-3}$, 0.25 мкМ специфических праймеров (Таблица 5), ПЦР-буфер, 1.3 мМ MgCl₂, 0.2 мМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов, краситель 1×EvaGreen и 0.6 ед. ДНК-полимеразы Maxima Hot Start. Амплификацию проводили в следующих условиях: 1 цикл, 95 °C, 4 мин; 40 циклов, 95 °C, 40 сек; 60 °C, 30 сек; 72 °C, 30 сек. Регистрирование данных реакции в режиме реального времени проводили, начиная с 75 °C в течение 15 сек. Данные для кривой плавления продуктов ПЦР реакции фиксировали в течение 81 цикла с интервалом 0.5 °C, начиная с 55 °C до 95 °C. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения Bio-Rad iQ5 v.2.0. Уровни экспрессии миРНК определяли относительно уровня малой ядерной РНК U6.

2.2.21 Определение уровня белков-мишеней миРНК в опухолевых клетках и опухолевой ткани методом Вестерн блот гибридизации

2.2.21.1 Приготовление лизата из опухолевых клеток и опухолевой ткани

Для приготовления лизата опухолевые клетки B16 и RLS_{40} в культуральных планшетах промывали стерильным физиологическим раствором, а затем лизировали в буфере RIPA в объёме 100 мкл. Фрагменты опухоли KB-8-5 гомогенизировали в 500 мкл буфера RIPA с помощью электрического гомогенизатора. Затем образцы центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 20 мин при +4 °C, супернатанты отбирали и хранили при -20 °C.

2.2.21.2 Вестерн блот гибридизация

К полученному лизату (10 мкл) добавляли равный объём буфера L, прогревали в течение 10 мин при 95 °C и проводили белковый электрофорез. Разделение белков осуществляли в 12.5% ПААГ, содержащем додецилсульфат натрия в буфере TGB при напряженности электрического поля 10 В/см в течение 1 ч. После электрофореза белки переносили на мембрану Immobilon-P PVDF ("Merck", США) в буфере TB с помощью полусухого электропереноса. Для предотвращения неспецифического связывания антител, мембрану после переноса инкубировали в течение 1 ч в 5% обезжиренном сухом молоке, растворённом в буфере TBST. Далее мембраны выдерживали при +4 °C в течение 18 ч с первичными моноклональными антителами кролика к белкам PTEN, PDCD4 и GAPDH, разведёнными в 5% обезжиренном сухом молоке в TBST в следующих соотношениях: PTEN 1:800, PDCD4 1:1000 и GAPDH 1:2000. По окончании инкубирования мембрану промывали в буфере TBST 3 раза по 10 мин и переносили в раствор со вторичными антителами козы к иммуноглобулинам кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (ab6721, Abcam, UK). По истечении 1 ч мембрану промывали в буфере TBST 3 раза по 10 минут. Люминисцентную детекцию проводили с помощью готового раствора субстрата для пероксидазы хрена ("Abcam", Великобритания) на приборе "Versadoc 4000 MP". Анализ интенсивности полос определяли с помощью программы Gel Pro ("Media Cybernetics", США).

2.2.22 Гистологический анализ опухолевых тканей и внутренних органов мышей после терапии химически модифицированными олигонуклеотидами

Гистологический анализ тканей опухоли, печени и почек мышей линии SCID после введения модифицированных олигонуклеотидов был проведен к.м.н. А.В. Сеньковой (ЛБНК, ИХБФМ СО РАН). Для этого образцы опухолей, почек и печени животных, полученных после эксперимента *in vivo*, фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине в течение 3-5 дней. Для дальнейшей гистологической обработки из опухолевого узла и органов вырезали образцы путём поперечного рассечения. Далее производили обезвоживание материала в растворах этилового спирта в возрастающих концентрациях, просветляли ксилолом и заключали в парафин "HISTOMIX" ("BioVitrum", Россия). На микротоме "Microm HM 355S" ("Thermo Fisher Scientific", США) изготавливали парафиновые срезы толщиной не более 5 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином.

Лля иммуноморфологического исследования тканей опухоли производили депарафинизацию срезов ксилолом, а также демаскировку антигенов тканей посредством нагревания на водяной бане "Decloaling chamber" ("BioCare Medical", США) в 10 мМ цитратном буфере (pH 6.0), блокировали эндогенную пероксидазу 3%-ным раствором H₂O₂. Затем инкубировали срезы с первичными антителами к каспазе-3 (ab2302, "Abcam", Великобритания), согласно протоколу производителя. Полученные образцы инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена ("Spring Bioscience detection system", США), добавляли готовый раствор субстрата для пероксидазы хрена, а затем окрашивали гематоксилином Майера. Изображения образцов получали с помощью микроскопа "Axiostar Plus" ("Zeiss", Германия) (×100 и ×400 увеличение) и камеры "Axiocam MRc5" ("Zeiss", Германия).

Морфометрическое исследование структурной организации тканей печени, почек и опухоли проводили с использованием закрытой тестовой системы из 100 точек, накладывая сетку случайным образом: при морфометрическом исследовании тканей печени и почек

подсчитывали 10-15 случайных полей зрения для каждого образца, что составило 70-100 полей зрения для каждой группы мышей; при морфометрическом исследовании тканей опухоли анализировали 20-50 случайных полей зрения, что составило 140-350 полей зрения для каждой группы мышей.

При морфометрическом исследовании опухоли определяли объёмные плотности (Vv, %) неизменённой опухолевой ткани; лимфоидной инфильтрации; некрозов и суммарных деструктивных изменений, а также численные плотности (Nv) клеток в состоянии митозоа и каспаза-3-положительных клеток.

Морфометрическое исследование печени включало оценку объемных плотностей (Vv, %) нормальных и дистрофически измененных гепатоцитов, некрозов паренхимы печени, суммарных деструктивных изменений, а также оценку численной плотности (Nv) двуядерных гепатоцитов, отражающих регенеративный потенциал печени. Морфометрическое исследование почек включало оценку объемных плотностей (Vv, %) нормальных, дистрофически измененных и некротизированных эпителиоцитов проксимальных канальцев, а также суммарных деструктивных изменений паренхимы почек.

Объемную плотность гистологической структуры подсчитывали по формуле: $Vv = (Pcтруктура/Pтест) \times 100\%$, где Pcтруктура – количество точек, которые приходятся на структуру, а Prect – общее количество тестовых точек, в данном случае 100. Численную плотность гистологической структуры определяли путем подсчета количества структур в пределах тестового поля определенной площади, в данном случае 3.2×106 мкм².

2.2.23 Статистический анализ данных

Полученные данные статистически обрабатывали с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с применением апостериорного критерия Тьюки (р ≤0.05). Для анализа использовали программное обеспечение *STATISTICA* версии 10.0.

Глава 3. Сиквенс-специфические олигонуклеотид-пептидные конъюгаты и N-(метансульфонил)фосфорамидные аналоги антисмысловых олигонуклеотидов как ингибиторы онкогенных миРНК *in vitro* и *in vivo* (Результаты и их обсуждение)

3.1 Разработка миРНК-направленных олигонуклеотид-пептидных коньюгатов и исследование их биологических свойств

Наиболее эффективным и надёжным способом снижения уровня и активности патогенных РНК в клетках является их необратимая деградация. Среди имеющихся на сегодняшний день вариантов терапевтических конструкций, только антисмысловые олигонуклеотиды могут инициировать необратимое расщепление РНК-мишеней, посредством активации внутриклеточной РНКазы Н. К настоящему моменту, способностью активировать РНКазу Н обладает лишь небольшое число химически модифицированных аналогов олигонуклеотидов, и для увеличения эффективности РНК-направленных препаратов требуется применение альтернативных технологий. В качестве таких эффективных РНК-расщепляющих агентов могут выступать сиквенс-специфические искусственные рибонуклеазы (иРНКазы) – соединения, которые сочетают в своей структуре адресный домен, необходимый для распознавания РНК-мишени, и каталитический домен, обеспечивающий её необратимую деградацию [27,32].

На сегодняшний день в области создания сиквенс-специфических искусственных рибонуклеаз достигнут значительный прогресс. Однако, разработанные на сегодняшний день иРНКазы, направлены преимущественно на расщепление синтетических РНК мишеней или модельных РНК. На данный момент существуют лишь единичные работы, описывающие создание иРНКаз, адресованных к биологически значимым миРНК-мишеням. На сегодняшний день описаны коньюгаты РNA олигонуклеотидов, содержащих в качестве каталитической группы диэтилентриамин (DЭTA) или пептид [His(Gly)₂], координированный с ионом меди Cu^{2+} , адресованные к синтетическому аналогу онкогенной миРНК-1323 [27]. Другим примером миРНК-направленной иРНКазы является и коньюгат РNA олигонуклеотида и трис(2-аминобензимидазола), направленно разрушающий онкогенную миРНК-20a [29]. Описанные иРНКазы показали высокую эффективность расщепления синтетических модельных миРНК *in vitro*, однако данные о применении таких конструкций в клетках или *in vivo* пока отсутствуют. Тем не менее, результаты, полученные *in vitro*, свидетельствуют о перспективности разработки металл-независимых миРНК в клетках.

3.1.1 Исследование биологических свойств миРНК-направленных искусственных рибонуклеаз, содержащих в качестве адресующей компоненты немодифицированные олигодезоксирибонуклеотиды

3.1.1.1 Дизайн олигонуклеотидов, выступающих в качестве адресующей компоненты миРНК-направленных иРНКаз

Представлялось интересным создание миРНК-направленных иРНКаз – олигонуклеотидпептидных конъюгатов, состоящих из адресующего олигонуклеотида, комплементарного миРНК-мишени, и каталитического пептида на основе чередующихся остатков аргинина и лейцина. Ввиду короткой длины, которая составляет 22-25 н., молекула миРНК представляет собой сложную мишень для разработки сайт-специфических иРНКаз. Такой тип миРНКингибиторов требует тщательного дизайна, поскольку для проявления биологической активности иРНКазы необходимо подобрать такую длину адресующего олигонуклеотида, которая обеспечивала бы формирование стабильного дуплекса с миРНК мишенью, и при этом оставался бы одноцепочечный участок миРНК, необходимый для атаки конъюгатом. В качестве мишени для иРНКаз была выбрана онкогенная миРНК-21. В качестве миРНК-21-связываюшего иРНКаз домена было использовано два типа олигонуклеотидов: линейные олигодезоксирибонуклеотиды (5'-10, 5'-12, 5'-14, 5'-16, 3'-16), (Рисунок 5, Таблица 7) с длиной участка, полностью комплементарного миРНК-21, от 10 до 16 н., и шпилечные олигодезоксирибонуклеотиды (5'-h-6/10, 5'-h-9/10, 5'-h-6/12, 5'-h-9/12, 5'-h-6/14, 5'-h-9/14, 5'-h-6/16, 5'-h-9/16, 3'-h-6/16 и 3'-h-9/16) (Рисунок 5 А, Таблица 7), содержащие в своей структуре: (1) последовательность, комплементарную миРНК-21 длиной от 10, 12, 14 или 16 нуклеотидов и (2) шпильку, введенную в структуру адресующего олигонуклеотида с целью увеличения стабилизации комплекса с миРНК-21 за счет стэкинг-взаимодействий [222], со стеблем длиной 6 или 9 п.н (Рисунок 5 Б и В). В тексте работы олигонуклеотиды, исследуемые в качестве адресующей компоненты конъюгатов, обозначены курсивом, в их названиях «5'» или «3'» соответствуют области присоединения пептида при синтезе иРНКаз, «h» обозначает шпильку, «6» или «9» – длину стебля в составе шпильки, а «10-16» – длину одноцепочечного фрагмента олигонуклеотида, полностью комплементарного миРНК-21. Схематичное представление комплексов миРНК-21 с олигонуклеотидами отражено на Рисунке 5. Структура, последовательность и обозначения всех олигонуклеотидов, использованных для дизайна иРНКаз, приведены в Таблице 7.



Рисунок 5. Схематичное представление комплексов миРНК-21 с олигонуклеотидами различной структуры. Комплексы миРНК-21 с (**A**) линейными олигонуклеотидами (5'-10, 5'-12, 5'-14, 5'-16, 3'-16), (**B**) шпилечными 5'-олигонуклеотидами (5'-h-6/10, 5'-h-9/10, 5'-h-6/12, 5'-h-6/16, 5'-h-9/16) и (**B**) шпилечными 3'-олигонуклеотидами (3'-h-6/16 и 3'-h-9/16).

3.1.1.2 Исследование гибридизационных и термодинамических свойств олигонуклеотидов. Скрининг и выбор перспективных кандидатов для синтеза иРНКаз

С целью выбора олигонуклеотидов для конструирования искусственных рибонуклеаз была проведена оценка эффективности их связывания с миРНК-21 в диапазоне концентраций 0.1 – 10 мкМ. Исследования гибридизационных свойств олигонуклеотидов проводили в условиях, близких к физиологическим, при 37 °C, в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl (pH 7.0), 200 мМ КCl, 1 мМ EDTA. Концентрационная зависимость связывания олигонуклеотидов с миРНК-21 приведена на Рисунке 6, а степени связывания – в Таблице 7.

Выявлено, что эффективность связывания линейных олигонуклеотидов 5'-10 и 5'-12 с миРНК-21 очень низкая и не детектируется методом задержки в геле. Введение шпильки со стеблем длиной 6 или 9 п.н. в структуру олигонуклеотида 5'-10 (олигонуклеотиды 5'-*h*-6/10 и 5'-*h*-9/10, соответственно) не приводит к значительному увеличению гибридизационных свойств: эффективность образования комплекса не превышает 5% даже при 100-кратном избытке олигонуклеотида по отношению к миРНК-21 (Таблица 7).

Введение шпильки со стеблем 6 п.н в структуру олигонуклеотида 5'-12 (олигонуклеотид 5'*h-6/12*) также не приводит к существенному увеличению эффективности его связывания с миРНК, однако удлинение стебля до 9 п.н. (олигонуклеотид 5'-*h-9/12*) приводит к значительному увеличению его сродства к мишени: эффективность комплексообразования 5'-*h*-9/12 с миРНК-21 достигает 82% при 100-кратном избытке олигонуклеотида (Рисунок 6 Б, Таблица 7).



Гибридизация миРНК-21 5'-адресующими Рисунок 6. с олигонуклеотидами. (A) Радиоавтографы 15%-ных нативных ΠΑΑΓ, демонстрирующих гибридизацию олигонуклеотидов: линейного 5'-16 и шпилечных 5'-h-6/16 и 5'-h-9/16 в диапазоне концентраций 0.1 – 10 мкМ с 5'-[³²P]-миРНК-21 (1 мкМ) при 37 °С, в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl (pH 7.0), 200 мМ КСl, 1 мМ ЕDTA. К – миРНК-21 инкубировали в отсутствие олигонуклеотидов. (Б) Концентрационные зависимости гибридизации олигонуклеотидов с миРНК-21.

Олигонуклеотиды с длиной антисмыслового фрагмента 14-16 н. эффективно связываются с миРНК. Линейные олигонуклеотиды 5'-14 и 5'-16 при эквимолярной концентрации гибридизуются с миРНК-21 с эффективностью 60 и 88%, соответственно (Рисунок 6 А и Б, Таблица 7). Добавление шпильки со стеблем 6 п.н. и 9 п.н. в структуру олигонуклеотида 5'-14 (олигонуклеотиды 5'-h-6/14 и 5'-h-9/14, соответственно) приводит к увеличению эффективности гибридизации до 97% для обоих олигонуклеотидов (Рисунок 6 Б, Таблица 7). Линейный олигонуклеотид 5'-16 обладает высоким сродством к миРНК-21 (88%), а добавление шпильки длиной 6 и 9 п.н. спосбствует дополнительному увеличению эффективности связывания, достигающему 100%, при эквимолярных концентрациях олигонуклеотидов 5'-h-6/16 или 5'-h-9/16 и РНК (Риунок 6 А и Б, Таблица 7).

Анализ эффективности гибридизации 3'-олигонуклеотидов, содержаших 16-звенный фрагмент, комплементарный миРНК-21 (3'-h-6/16 и 3'-h-9/16), показал, что эффективность их связывания совпадает с таковой для 5'-олигонуклеотидов аналогичной структуры: 3'-h-6/16 и 3'-h-9/16 количественно связываются с миРНК-мишенью уже при эквимолярных концентрациях (Таблица 7).

Для всех исследуемых олигонуклеотидов была измерена температура плавления комплекса (Tm) – температура, при которой 50% взаимодействующих олигонуклеотидов находится в свободном одноцепочечном состоянии. Данный параметр является наглядной характеристикой стабильности гетеродуплекса и зависит от ряда «внутренних» факторов, таких как длина, последовательность олигонуклеотида и наличие модификаций в его составе, и некоторых «внешних» параметров, например, буферных условий и растворителя [223]. В Таблице 7 представлены Tm комплексов миPHK-21/олигонуклеотид. Термодинамический анализ был проведен к.ф.-м.н. Ломзовым А. А (ЛБМХ, ИХБФМ СО РАН).

Из представленных в Таблице 7 данных видно, что гетеродуплексы, сформированные миРНК-21 с олигонуклеотидами с последовательностью, комплементарной миРНК длиной 10 н. 5'-h-6/10 и 5'-h-9/10 характеризуются самой низкой Tm 35.2 и 37.7 °C, соответственно. Tm комплексов, сформированных 12-звенными олигонуклеотидами 5'-h-6/12 и 5'-h-9/12 увеличивается на 5–6 °C и составляет 41.7 °C и 43.5 °C, соответственно. Следует отметить, что для олигонуклеотидов с длиной комплементарной части 10-12 н. удлинение стебля на 3 п.н. увеличивает Tm комплексов на 2 °C: с 35.2 °C до 37.7 °C для 5'-h-6/10 и 5'-h-9/10, и с 41.7 °C до 43.5 °C для 5'-h-6/12 и 5'-h-9/12.

Для 14-звенного олигонуклеотида 5'-14 температура плавления комплекса с миРНК-21 составляет 47.8 °C. Для шпилечных адресующих олигонуклеотидов на его основе – 5'-h-6/14 и 5'-h-9/14, стабилизирующий эффект шпильки отражается в повышении Tm гетеродуплекса на 6-7°C: 54.7 °C и 53.3 °C, соответственно.

ON	Структура олигонуклеотида ¹⁾	ΔG, ккал/моль	T _m , ℃	Связывание, % 2)
5'-10	⁵ ' <u>tgataagcta</u> ³ '	-	_	0
5'-h-6/10	A ^G CGACTG <u>ATCGAATAGT</u> ^{5'} A _A GCTGAC _{3'}	-8.1 ± 0.1	35.2 ± 0.5	0.2
5'-h-9/10	A ^G CGACTGAAC <u>ATCGAATAGT</u> ^{5°} A _A GCTGACTTG ₃ ,	-8.5 ± 0.1	37.7 ± 0.4	0.3

Таблица 7. Структура олигодезоксирибонуклеотидов, направленных к миРНК-21, и термодинамические параметры комплексообразования с РНК мишенью

5'-12	^{5'} <u>TCTGATAAGCTA</u> ^{3'}	_	-	0
5'-h-6/12	A ^G CGACTG <u>ATCGAATAGTCT</u> ^{5'} A _A GCTGAC _{3'}	-9.4 ± 0.1	41.7 ± 0.3	0.3
5'-h-9/12	A A CGACTGAAC <u>ATCGAATAGTCT</u> ^{5'} A _A GCTGACTTG ₃ ,	-9.9 ± 0.1	43.5 ± 0.3	3
5'-14	⁵ <u>AGTCTGATAAGCTA</u> ^{3'}	-11.1 ± 0.1	47.8 ± 0.2	60
5'-h-6/14	A ^G CGACTG <u>ATCGAATAGTCTGA</u> ^{5'} A _A GCTGAC ₃ ,	-14.1 ± 1	54.7 ± 0.2	97
5'-h-9/14	A ^G CGACTGAAC <u>ATCGAATAGTCTGA</u> ⁵ A _A GCTGACTTG ₃ ,	-13.7 ± 0.2	53.3 ± 0.3	97
5'-16	⁵ <u>TCAGTCTGATAAGCTA</u> ³	-13.1 ± 0.6	51.5 ± 0.3	88
5'-h-6/16	A ^G CGACTG <u>ATCGAATAGTCTGACT</u> ^{5'} A _A GCTGAC ₃ ,	-12 ± 0.3	51.4 ± 0.3	99
5'-h-9/16	$\begin{array}{c} A \\ A \\ C \\ G \\ C \\ G \\ C \\ T \\ C \\ C \\ C \\ T \\ G \\ C \\ T \\ C \\ C \\ T \\ C \\ C \\ T \\ C \\ C$	-12.2 ± 0.3	50.5 ± 0.2	99
3'-16	⁵ <u>TCAACATCAGTCTGAT</u> ³	-13.9 ± 1	53.7 ± 0.6	99
3'-h-6/16	⁵ GTCAGC ^A A ³ <u>TAGTCTGACTACAACT</u> CAGTCG _G A	-15.4 ± 0	55.6 ± 0.2	100
3'-h-9/16	⁵ CAAGTCAGC ^A A ³ <u>TAGTCTGACTACAACT</u> GTTCAGTCG _G A	-15 ± 0.2	55.1 ± 0.1	99

¹⁾ Шрифтом с подчёркиванием обозначена последовательность комплементарная миРНК-21. ²⁾ Исследование эффективности связывания 5'-[³²P]-миРНК-21 и олигонуклеотидов в эквимолярных концентрациях 1 мкМ проводили при 37°С в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl (pH 7.0), 200 мМ KCl, 1 мМ EDTA, в течение 1 ч.

Термодинамический анализ показал, что для адресующих олигонуклеотидов с комплементарной компонентой длиной 16 н. 5'-16, 5'-h-6/16, 5'-h-9/16, 3'-16, 3'-h-6/16 и 3'-h-9/16, температура плавления гетеродуплексов варьирует от 50 до 55 °C в зависимости от GC состава комплементарной последовательности. В частности, следует отметить, что значения Tm для адресующих олигонуклеотидов 5'-16, 5'-h-6/16 и 5'-h-9/16 практически не отличаются и составляют 51.5, 51.4 и 50.5 °C, соответственно. Для этих олигонуклеотидов удлинение стебля шпильки на 3 п.н. не приводит к увеличению стабильности комплекса с миPHK-21.

Для линейных и шпилечных олигонуклеотидов с длиной антисмыслового фрагмента 14 и 16 н. 5'-14, 5'-h-6/14 и 5'-16, 5'-h-6/16 была исследована кинетика комплексообразования с миРНК-21. Поскольку для этих олигонуклеотидов наблюдалось количественное связывание с миРНК-21 уже при эквимолярной концентрации, для анализа кинетических параметров концентрация олигонуклеотидов была снижена до 0.5 мкМ. На Рисунке 7 представлен

радиавтограф 15%-ного нативного ПААГ после разделения продуктов гибридизации миРНК-21 с олигонуклеотидами.



5'-[³²Р]-миРНК-21 Рисунок 7. Кинетика комплексообразования синтетической с олигонуклеотидами 5'-14, 5'-h-6/14, 5'-16 и 5'-h-6/16. (А) и (Б) – радиоавтографы 15%-ных нативных ПААГ, демонстрирующих связывание с миРНК-21 олигонуклеотидов 5'-14, 5'-h-6/14 и 5'-16. 5'-h-6/16 соответственно. миРНК-21 (1мкМ) инкубировали в присутствии олигонуклеотидов (0.5 мкМ) при 37 °C, в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl (pH 7.0), 200 мМ КСІ, 1 мМ ЕDTA, в течение 1 ч. К – миРНК-21 инкубировали в отсутствие олигонуклеотидов. (В) и (Г) Кинетические зависимости связывания олигонуклеотидов 5'-14, 5'*h*-6/14 и 5'-16, 5'-*h*-6/16, с миРНК-21, соответственно. k_{eff} – эффективные константы скорости комплексообразования.

Из представленных на рисунке данных видно, что линейный олигонуклеотид 5'-14 гибридизуется с миРНК-21 с наименьшей эффективностью, не превышающей 10% по истечении 60 мин реакции, и с самой низкой скоростью ($k_{eff} = 0.024 \pm 0.005$ мин⁻¹) среди всех исследуемых олигонуклеотидов. Для шпилечного олигонуклеотида 5'-*h*-6/14 эффективность гибридизации по истечении 2 мин составляет 30%, а после 30 мин достигает 60% и выходит на плато. При этом наблюдается значительное ускорение комплексообразования и увеличение на порядок значения k_{eff} ($k_{eff} = 0.17 \pm 0.03$ мин⁻¹) по сравнению с линейным олигонуклеотидом. Олигонуклеотиды 5'-*h*-6/14 ($k_{eff} = 0.22 \pm 0.02$ мин⁻¹ и 0.21 \pm 0.05 мин⁻¹, соответственно).

Таким образом, согласно данным гибридизационного и термодинамического анализов выявлено, что: (1) эффективность гибридизации олигонуклеотида возрастает при введении в его

структуру шпильки с 4-звенной петлёй и 6- или 9-звенным стеблем, обеспечивающей эффективные стэкинг взаимодействия в комплексе миРНК/олигонуклеотид; (2) при введении шпильки в структуру адресующего олигонуклеотида наибольший эффект стабилизации дуплекса наблюдается для олигонуклеотидов с комплементарной частью длиной 14 н.; (3) для шпилечных олигонуклеотидов с длиной участка, комплементарного миРНК-21, 14 или 16 н., удлинение стебля шпильки с 6 п.н. до 9 п.н. не приводит к увеличению эффективности и скорости гибридизации с миРНК-21; (4) для 16-звенных олигонуклеотидов (олигонуклеотиды 5'-16 и 5'-h-6/16) введение в структуру олигонуклеотида шпильки не приводит к улучшению термодинамических характеристик гетеродуплекса, а так же увеличению скорости комплексообразования с миРНК-21.

На основании полученных данных наиболее эффективно связывающиеся олигонуклеотиды 5'-h-6/14, 5'-h-9/14, 5'-16, 3'-16, 5'-h-6/16 3'-h-6/16, 5'-h-9/16 и 3'-h-9/16 были выбраны для синтеза конъюгатов с пептидом [(LeuArg)₂Gly]₂.

3.1.1.3 Дизайн миРНК-направленных иРНКаз

МиРНК-направленные олигонуклеотид-пептидные конъюгаты состояли из узнающего миРНК-21 олигонуклеотида (5'-h-6/14, 5'-h-9/14, 5'-16, 3'-16, 5'-h-6/16 3'-h-6/16, 5'-h-9/16 и 3'h-9/16) и каталитического пептида. Выбор пептида для конструирования миРНКспецифических конъюгатов был проведён на основе данных исследований [31,32] по расщеплению с помощью олигонуклеотид-пептидных конъюгатов фенилаланиновой тРНК дрожжей, где было показано, что введение в структуру пептида дополнительного остатка глицина между двух аргинин-лейциновых блоков значительно увеличивает рибонуклеазную активность модельных конъюгатов. На основе этих данных пептид [(LeuArg)₂Gly]₂ был выбран для дизайна миРНК-направленных иРНКаз. Кроме того, предыдущие исследования показали важность конформационной подвижности пептида, которая обеспечивается гибким аминогексильным линкером [31,32]. При синтезе конъюгатов присоединение каталитического пептида проводили путём формирования связи между С-концевой карбоксильной группой пептида и аминогруппой аминогексильного линкера, расположенного на 5'-конце или 3'-конце адресующего олигонуклеотида для 5'- и 3'-конъюгатов, соответственно. Структуры олигонуклеотид-пептидных конъюгатов и аминокислотная последовательность пептида приведены на Рисунке 8.

Далее по тексту названия конъюгатов будут отмечены полужирным шрифтом. Для простоты обозначений наименования конъюгатов совпадают с обозначениями олигонуклеотидов, входящих в их состав в качестве адресующей компоненты. Синтез олигонуклеотид-пептидных

конъюгатов 5'-h-6/14, 5'-h-9/14, 3'-16, 3'-h-6/16, 3'-h-9/16 5'-16, 5'-h-6/16 и 5'-h-9/16 был проведен профессором Е.В. Биченковой и Dr Аледом Вильямсом в Университете Манчестера (Манчестер, Великобритания).



Рисунок 8. Структуры олигонуклеотид-пептидных конъюгатов, исследованных в работе. (А) Схематическое изображение комплексов миРНК-21 и конъюгатов различной структуры. Обозначения «16 н.», «10-16 н.» и «14-16 н.» – длина миРНК-21-адресующего олигонуклеотида. Обозначение «6-9 п.н.» – длина стебля; «рер» – пептид [(LeuArg)₂Gly]₂. (**Б**) и (**B**) Структуры конъюгатов с пептидом [(LeuArg)₂Gly]₂, присоединенным через карбоксильную группу с помощью аминогексильного линкера к 5'- (**Б**) или 3'-концевому фосфату олигонуклеотида (**B**).

3.1.1.4 Исследование гибридизационных свойств иРНКаз

Способность олигонуклеотид-пептидных конъюгатов 5'-h-6/14, 5'-h-9/14, 5'-16, 5'-h-6/16, 5'-h-9/16, 3'-h-6/16 и 3'-h-9/16 связываться с миРНК-мишенью была исследована методом задержки в 15%-ном нативном ПААГ (Рисунок 9). Исследования гибридизационных свойств иРНКаз проводили в условиях, близких к физиологическим, при 37 °C, в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl (pH 7.0), 200 мМ KCl, 1 мМ EDTA. Эффективность связывания
конъюгатов с миРНК-21 сопоставляли с эффективностью связывания соответствующих олигодезоксирибонуклеотидов.



Рисунок 9. Гибридизация с 5'-[³²P]-миРНК-21 с адресующими олигонуклеотидами и соответствующими конъюгатами. (А) Радиоавтограф 15%-ного нативного ПААГ, демонстрирующий гибридизацию миРНК-21 с олигонуклеотидами 3'-16, 3'-h-6/16, 3'-h-9/16 5'h-9/14, 5'-16, 5'-h-6/16 и 5'-h-9/16, (дорожки 2, 4, 6, 8, 10, 12 и 14, соответственно) и конъюгатами этих же олигонуклеотидов (дорожки 3, 5, 7, 9, 11, 13 и 15, соответственно). миРНК-21 (1мкМ) инкубировали в присутствии конъюгатов (5 мкМ) при 37 °С, в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСІ (рН 7.0), 200 мМ КСІ, 1 мМ ЕDTA, в течение 20 мин. (Б) Концентрационные зависимости связывания олигонуклеотида 5'-h-9/14 и конъюгата 5'-h-9/14 с миРНК-21.

Гибридизацию миРНК-21 (1 мкМ) проводили в присутствии либо олигонуклеотида, либо соответствующего конъюгата в концентрации 5 мкМ в течение 20 мин, так как в этих условиях формирование комплекса ещё не сопровождается расщеплением миРНК-мишени. Анализ эффективности гибридизации конъюгатов и олигонуклеотидов с миРНК-21 показал, что присоединение пептида к адресующему олигонуклеотиду не препятствует связыванию конъюгата с миРНК-21.

Как видно из Рисунка 9 А при 5-кратном избытке все конъюгаты эффективно связываются с миРНК-мишенью с образованием одного типа комплекса, кроме конъюгатов **3'-h-9/16** и **5'-h-9/16**, для которых наблюдается образование нескольких типов комплексов (Рисунок 9 А, д. 7 и 15, соответственно). Детальный анализ концентрационных зависимостей показал, что присоединение пептида к адресующему олигонуклеотиду снижает эффективность его связывания с миРНК-21 (Рисунок 9 Б): при эквимолярных концентрациях миРНК и конъюгата степень связывания конъюгата составляет одну треть от эффективности связывания соответствующего олигонуклеотида. Но при 5-кратном избытке конъюгата степень связывания достигает 100%.

Существует две возможных причины снижения эффективности гибридизации конъюгатов с миРНК-21. Можно предположить, что происходит формирование межмолекулярных комплексов конъюгатов посредством электростатических взаимодействий между положительно

заряженными остатками пептида одной молекулы И отрицательно заряженным олигонуклеотидом другой молекулы конъюгата. Образование подобных молекулярных агрегатов может снижать концентрацию мономерных форм конъюгата в растворе, необходимую для эффективной гибридизации с миРНК-мишенью. Помимо этого. не исключены внутримолекулярные электростатические взаимодействия между остатками аргинина пептида и фосфатными группами олигонуклеотида одного и того же конъюгата, которые могут также снижать эффективность связывания иРНКаз с миРНК.

3.1.1.5 Исследование рибонуклеазной активности иРНКаз в условиях однооборотной и многооборотной реакций

3.1.1.5.1. Исследование рибонуклеазной активности иРНКаз в условиях однооборотной реакции

Рибонуклеазную активность 3'-конъюгатов **3'-16**, **3'-h-6/16** и **3'-h-9/16** и 5'-конъюгатов **5'-h-6/14**, **5'-h-9/14**, **5'-16**, **5'-h-6/16**, **5'-h-9/16** исследовали в реакции расщепления 5'-[³²P]-миРНК-21 (1 мкМ) при концентрации конъюгатов 1 – 50 мкМ в условиях, близких к физиологическим, при 37 °C, в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl (pH 7.0), 200 мМ KCl, 1 мМ EDTA. На Рисунке 10 приведены радиоавтографы 18%-ного денатурирующего ПААГ, демонстрирующие разделение продуктов расщепления миРНК-21 в присутствии 50 мкМ 3'-конъюгатов **3'-16**, **3'-h-6/16** и **3'-h-9/16**.



Рисунок 10. Разделение продуктов расщепления синтетической 5'-[³²P]-миРНК-21 олигонуклеотид-пептидными конъюгатами **3'-16**, **3'-h-6/16** и **3'-h-9/16**. (А) Радиоавтографы 18%-ного денатурирующего ПААГ. миРНК-21 (1мкМ) инкубировали в присутствии конъюгатов (50 мкМ) при 37 °C, в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl (pH 7.0), 200 мМ КCl, 1 мМ ЕDTA. Дорожки Im и T1 – частичное расщепление 5'-[³²P]-миРНК-21 РНКазой T1 и в 2 М

имидазоле, соответственно. Контроль – 5'-[³²P]-миРНК-21 инкубировали в отсутствие конъюгатов. Время инкубации в часах указано сверху. (Б) Схематическое изображение комплекса миРНК-21 с 3'-конъюгатом **3'-h-6/16**. Стрелкой указан основной сайт расщепления миРНК.

Анализ расщепления миРНК-21 З'-конъюгатами показал, что такие конъюгаты осуществляют расщепление миРНК-мишени по единственной связи G₃C₄ с очень низкой эффективностью, не превышающей 5% (Рисунок 10).

На Рисунке 11 приведены радиоавтографы 18%-ного денатурирующего ПААГ, демонстрирующие разделение продуктов расщепления миРНК-21 в присутствии 20 мкМ коньюгатов **5'-h-6/14**, **5'-h-9/14**, **5'-h-6/16**, **5'-h-9/16**. Сводные данные об эффективности и специфичности расщепления миРНК-21 под действием 5'-конъюгатов представлены в Таблице 8. Как видно из представленных данных, 5'-конъюгаты эффективно расщепляют миРНК-21 по нескольким связям, расположенным в 3'-области миРНК-21 (Рисунок 11). Суммарная эффективность расщепления миРНК-21 под действием 5'-конъюгатов по истечении 72 ч составляет 57% и 83% для **5'-h-9/16** и **5'-h-6/16**, соответственно, и около 98% для **5'-16**, **5'-h-6/14** и **5'-h-9/14** (Рисунок 11, Таблица 8). Конъюгаты **5'-16**, **5'-h-6/14** и **5'-h-9/14** расщепляют миРНК-21 с приблизительно равной скоростью: эффективные константы скорости расщепления k_{eff} составляют 12,6±1,7, 11,9±4,9 и 11,0±1,4 ×10⁻⁶c⁻¹, соответственно, а период полурасщепления миРНК-21 ($\tau_{1/2}$) – 15.1±0.2, 16.2±0.2 и 17±0.4 ч, соответственно (Таблица 8). Для конъюгатов **5'-h-9/16** и **5'-h-6/16** k_{eff} и $\tau_{1/2}$ определены не были, так как не было достигнуто плато расщепления этими конъюгатами, и суммарная эффективность расщепления миРНК составляет менее 100%.



Рисунок 11. Разделение продуктов расщепления 5'-[³²P]-миРНК-21 олигонуклеотидпептидными конъюгатами 5'-h-6/14, 5'-h-9/14, 5'-16, 5'-h-6/16 и 5'-h-9/16. (А) Радиоавтографы 18%-ного денатурирующего ПААГ. миРНК-21 (1мкМ) инкубировали в присутствии

конъюгатов (20 мкМ) при 37 °C, в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl (pH 7.0), 200 мМ KCl, 1 мМ EDTA. Дорожки Im и T1 – частичное расщепление 5'-[³²P]-миРНК-21 РНКазой T1 и в 2 М имидазоле, соответственно. Контроль – 5'-[³²P]-миРНК-21 инкубировали в отсутствие конъюгатов. Время инкубации миРНК-21 с конъюгатами (в часах) указано сверху. (**Б**) Схематическое изображение комплекса миРНК-21 с 5'-конъюгатами **5'-h-6/16** и **5'-h-6/14**. Стрелки указывают на основные сайты расщепления миРНК.

Из представленных данных видно, что все 5'-конъюгаты расщепляют миРНК-мишень исключительно по G-X связям, где X = C, U или A. При этом в зависимости от длины миРНК-21 последовательности конъюгата, комплементарной (далее антисмысловой последовательности), было выявлено два или три основных сайта расщепления миРНК-21 (Рисунок 11 Б). Так, конъюгаты с 16-нуклеотидной антисмысловой частью расщепляют миРНК-21 по двум фосфодиэфирным связям G₁₈U₁₉ и G₂₁A₂₂, а конъюгаты с длиной антисмыслового фрагмента 14 н. расщепляют миРНК-21 по сайтам G15A16, G18U19 и G21A22 (Рисунок 11 Б, Таблица 8). При этом, G-X связи, расположенные в непосредственной близости от места присоединения пептида, расщепляются конъюгатами более эффективно. Так, под действием конъюгатов 5'-h-9/16 и 5'-h-6/16 расщепление миРНК-21 по связи G₁₈U₁₉, располагающейся вблизи локализации пептида, происходит в 3 раза более эффективно, чем по связи G21A22 (Рисунок 11 Б, Таблица 8).

Для 5'-коньюгатов 5'-h-6/14 и 5'-h-9/14 основным сайтом расщепления является фосфодиэфирная связь $G_{15}A_{16}$, находящаяся вблизи локализации пептида, и эффективность расщепления миРНК-21 по этому сайту достигает 68% (Рисунок 11 Б, Таблица 8). По мере увеличения расстояния между пептидом и G-X связью интенсивность её расщепления под действием коньюгатов падает до 30% для связи $G_{18}U_{19}$ и до 1.5% для связи $G_{21}A_{22}$ (Рисунок 11 Б, Таблица 8).

Конъюгат	Связывание	Суммарное расщепление 2)	Константа расщепления ×10 ⁻⁶ с ⁻¹	т _{½,} ч	Сайт- направленное расщепление, 2)
5'-h-6/14	100%	99 %	11,9±4,9	16.2±0.2	$\begin{array}{l} G_{15}A_{16}\ (68\%),\\ G_{18}U_{19}\ (30\%),\\ G_{21}A_{22}\ (1.5\%) \end{array}$
5'-h-9/14	100%	98 %	11,0±1,4	17±0.4	$\begin{array}{c} G_{15}A_{16} \left(48\%\right),\\ G_{18}U_{19} \left(46\%\right),\\ G_{21}A_{22} \left(4\%\right)\end{array}$
5'-16	100%	93 %	12,6±1,7	15.1±0.2	$\begin{array}{c} G_{3}C_{4} \ (5\%), \\ G_{15}A_{16} \ (4\%), \\ G_{18}U_{19} \ (78\%), \\ G_{21}A_{22} \ (6\%) \end{array}$

Таблица 8. Эффективность и специфичность расщепления миРНК-21 под действием 5'олигонуклеотид-пептидных конъюгатов

5'-h-6/16	99%	83 %	_*	_	$\begin{array}{c} G_{18}U_{19}(63\%),\\ G_{21}A_{22}(20\%) \end{array}$
5'-h-9/16	97%	57 %	_*	_	$\begin{array}{c} G_{18}U_{19}(33\%),\\ G_{21}A_{22}(24\%) \end{array}$
2'OMe-5'-h-6/14 (1)	100%	81%	2,6±2,0	_	$\begin{array}{c} G_{18}U_{19}(38\%),\\ G_{21}A_{22}(35\%) \end{array}$
2'OMe-5'-h-6/14 (2)	100%	100%	43,1±11,8	4.9±0.1	$\begin{array}{c} G_{15}A_{16}(68\%),\\ G_{18}U_{19}(27\%),\\ G_{21}A_{22}(4.6\%) \end{array}$

¹⁾ [миРНК-21]=1 мкМ, [конъюгат]=5 мкМ, 37 °С, 20 мин, ²⁾ [миРНК -21]=1 мкМ, [конъюгат]=20 мкМ, 37 °С, 72 ч; * – константа не была определена, так как не достигнуто плато расщепления миРНК конъюгатом.

Стоит отметить, что при разделении продуктов расщепления миРНК-21 конъюгатами, подвижность образовавшихся фрагментов соответствует 2'-3' циклофосфатам, что свидетельствует 0 том, что расщепление происходит механизму реакции по трансэтерификации, что коррелирует с ранее полученными данными [31,32].

На Рисунке 12 А представлена эффективность расщепления миРНК-21 в зависимости от концентрации конъюгатов. Из представленных данных видно, что при концентрации 20 мкМ зависимости эффективности расщепления для всех исследованных 5'-конъюгатов достигают плато (данные приведены для времени инкубации 24 ч).



Рисунок 12. Концентрационные и кинетические зависимости расщепления миРНК-21 5'-конъюгатами. (А) Концентрационная зависимость расщепления миРНК-21 конъюгатами 5'-h-6/14, 5'-h-9/14, 5'-h-6/16 и 5'-h-9/16; время инкубации 24 ч. (Б) Кинетика расщепления миРНК-21 (1 мкМ) олигонуклеотид-пептидными конъюгатами 5'-h-6/14, 5'-h-9/14, 5'-16, 5'-h-6/16 и 5'-h-9/16 (20 мкМ).

На Рисунке 12 Б приведены кинетические кривые расщепления миРНК-21 5'конъюгатами (20 мкМ). Из представленных данных видно, что наиболее эффективно миРНК-21 расщепляют конъюгаты 5'-h-6/14, 5'-h-9/14 и 5'-16, суммарная степень расщепления которыми через 24 ч достигает 65-85%. Конъюгаты 5'-h-6/16 и 5'-h-9/16 расщепляют миРНК-21 за то же время лишь на 18-20%. К 48 ч инкубации кривая расщепления конъюгатами 5'-h-6/14, 5'-h-9/14 и 5'-16 достигает плато, и эффективность расщепления составляет 90-95%. За тот же период времени конъюгаты 5'-h-6/16 и 5'-h-9/16 расщепляют миРНК-21 на 57% и 40%, соответственно.

Таким образом, в результате скрининга рибонуклеазной активности миРНК-21направленных конъюгатов показано, что 3'-конъюгаты расщепляют миРНК-мишень с чрезвычайно низкой эффективностью, что вероятнее всего, объясняется отсутствием эффективных внутримолекулярных взаимодействий между олигонуклеотидной компонентой и пептидом конъюгата, необходимых для формирования каталитически активной конформации.

Анализ рибонуклеазной активности 5'-конъюгатов показал, что данные иРНКазы расщепляют миРНК-21 с высокой эффективностью исключительно по G-X мотивам, при этом, с наибольшей скоростью расщеплению подвергаются связи, расположенные вблизи точки присоединения пептида. Конъюгаты 5'-16, 5'-h-6/14 и 5'-h-9/14 являются наиболее эффективными миРНК-21-направленными рибонуклеазами и способны обеспечить полнное расщепление миРНК-мишени. Стоит отметить, что конъюгаты, содержащие шпильку в структуре олигонуклеотидного домена, более предпочтительны для применения в культуре клеток. Во-первых, мишенями таких конъюгатов являются исключительно зрелые формы миРНК. Во-вторых, конъюгаты 5'-h-6/14 и 5'-h-9/14, обладая такой же эффективностью связывания с миРНК-мишенью, как и 5'-16, катализируют расщепление миРНК-21 по трём связям, что может с большей вероятностью и надежностью блокировать функции миРНК-мишени.

Выявлено, что конъюгаты 5'-h-6/16 и 5'-h-9/16, в структуре которых область, комплементарная миРНК-мишени, удлинена на 2 н., расщепляют миРНК-21 с максимальной эффективностью 57-83%. Существует несколько возможных причин снижения рибонуклеазной активности этих конъюгатов. Ранее было показано, что даже незначительные структурные модификации конъюгатов, такие как изменение длины и состава олигонуклеотидной приводит к значительным изменениям каталитической компоненты, эффективности олигонуклеотид-пептидных конъюгатов [31-34]. В случае конъюгатов 5'-h-6/16 и 5'-h-9/16, увеличение участка, комплементарного миРНК-21, с 14 до 16 н. привело к укорочению одноцепочечной области миРНК-21, формируемой при связывании с конъюгатом. Полученные ранее данные указывают на то, что подобное уменьшение одноцепочечной области РНКмишени [31] может приводить к значительному снижению или полной потере каталитической активности конъюгата, вероятнее всего, за счёт уменьшения конформационной подвижности каталитического пептида. Помимо этого, наиболее эффективно расщепляемым сайтом под действием конъюгатов 5'-h-6/14 и 5'-h-9/14 является связь G-A, тогда как конъюгаты 5'-h-6/16

и **5'-h-9/16** из-за удлинения олигонуклеотидной компоненты, в основном, атакуют связь G-U, которая, как известно, менее чувствительна к расщеплению нуклеазами. Наконец, из-за снижения конформационной гибкости, образование удлинённых комплексов миРНК-21/**5'-h-9/16** и миРНК-21/**5'-h-6/16** может препятствовать формированию *in-line* конформации, необходимой для совершения расщепления [31,32].

Особого внимания заслуживает специфичность действия разработанных конъюгатов. Полученные данные показывают, что созданные миРНК-направленные рибонуклеазы являются мимиками РНКазы Т1 и осуществляют расщепление исключительно по G-X связям в последовательности миРНК-мишени. Ранее было показано, что присоединение пептида $[(LeuArg)_2Gly]_2$ к олигонуклеотидной компоненте за N-конец посредством линкера нулевой длины, обеспечивает конъюгату Руг-А специфичность [32]. Когда тип конъюгирования был изменён, и пептид был присоединён к олигонуклеотидному домену за C-конец с добавлением гибкого линкера, специфичность иРНКазы изменилась на G-X. Ранее, G-X специфичность расщепления РНК была обнаружена только для искусственной рибонуклеазы рер-9 [33,34] и двойных конъюгатов (dual conjugates), направленных к фенилаланиновой тРНК, в структуре которых присутствовал длинный гибкий линкер, и присоединение пептида было проведено одновременно за N- и C-концы (двойные конъюгаты), соответственно [31].

3.1.1.5.2. Исследование рибонуклеазной активности иРНКаз в условиях многооборотной реакции

Исследование эффективности расщепления миРНК-21 в условиях многооборотной реакции было проведено для конъюгата **5'-h-9/14** при концентрации конъюгата 5 мкМ и концентрациях миРНК-21 10 мкМ, 25 мкМ и 50 мкМ, составляющих 2-, 5- и 10-кратный избыток, соответственно (Рисунок 12). Реакцию проводили при 37 °C в течение 72 ч. Эффективность расщепления миРНК-21, взятой в различных концентрациях, конъюгатом **5'-h**-9/14 по истечении 72 ч достоверно не отличалась и составляла 87%, 86% и 83 %, для 2-, 5- и 10-кратного избытка миРНК по отношению к **5'-h-9/14**, соответственно (Рисунок 13). Поскольку основным критерием работы ферментов в каталитическом режиме является неизменная эффективность катализа при различных концентрациях субстрата [224], полученные данные свидетельствуют о работе конъюгата в каталитическом режиме. Это подразумевает формирование стабильного дуплекса иРНКазы с РНК-мишенью, её расщепление и быструю диссоциацию конъюгата из комплекса для последующих актов расщепления новых молекул РНК [225]. Наличие данной характеристики у созданного конъюгата является преимуществом при его применении в терапевтических целях, поскольку позволяет использовать малые концентрации конъюгата для ингибирования избытка миРНК-мишени.



Рисунок 13. Кинетика расщепления 5'-[³²Р]-миРНК-21 конъюгатом 5'-h-9/14 в многооборотной условиях реакции. Конъюгат 5'-h-9/14 (5 мкМ) инкубировали с 2-кратным избытком миРНК-21 (10 мкМ) – черная кривая; 5кратным избытком миРНК-21 (25 мкМ) красная кривая и 10-кратным избытком миРНК-21 (50 мкМ) – синяя кривая при 37 °С в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl (pH 7.0), 200 мМ КСl, 1 мМ ЕDTA, в течение 72 ч.

3.1.1.6 Исследование каталитической активности иРНКаз в присутствии РНКазы Н

Поскольку в качестве адресующей компоненты в структуре анти-миРНК-21 конъюгатов были использованы немодифицированные ДНК олигонуклеотиды, предполагалось, что комплекс коньюгата с миРНК может выступать в качестве субстрата для РНКазы Н, которая распознаёт гетеродуплексы ДНК:РНК, и гидролизует РНК в составе гетеродуплекса [226,227]. Для того, чтобы оценить эффективность расщепления миРНК конъюгатом 5'-h-9/14 в присутствии РНКазы Н была проведена серия параллельных экспериментов: эффективность расщепления миРНК исследовали в условиях 2-, 5- и 10-кратного избытка РНК мишени по отношению к конъюгату или олигонуклеотиду (Рисунок 14 А - Ж). Преформированные комплексы миРНК-21 с конъюгатом 5'-h-9/14 инкубировали в присутствии РНКазы Н и сравнивали эффективность расщепления РНК при совместном действии конъюгата и РНКазы Н (Рисунок 14 A(II), B(V), и Д(VIII)) с эффективностью расщепления миРНК под действием только конъюгата 5'-h-9/14 (Рисунок 14 A(I), B(IV) и Д(VII)). Параллельно проводили расщепление миРНК-21 в гетеродуплексе с олигонуклеотидом 5'-h-9/14 под действием РНКазы Н (Рисунок 14 A(III), B(VI), и Д(IX)). Реакцию проводили при 37 °С в коммерческом буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl (pH 7.8), 40 мМ KCl, 8 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT, рекомендованном производителем РНКазы Н.

Как видно из представленных данных, миРНК-21 эффективно расщепляется как в комплексе с олигонуклеотидом, так и в комплексе с конъюгатом. Сравнение паттернов расщепления выявило, что вне зависимости от концентрации РНК РНКаза Н расшепляет миРНК-21 в комплексе с олигонуклеотидом 5'-h-9/14 по связям U₆A₇, C₉A₁₀, и G₁₁A₁₂ (Рисунок 14 A-III, B-VI, и Д-IX).



Рисунок 14. Расщепление 5'-[³²P]-миРНК-21 под действием конъюгата **5'-h-9/14** и/или РНКазы Н. Радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующих расщепление миРНК-21 в условиях 2- (**A**), 5- (**B**), и 10-кратного (**Д**) избытка миРНК-21 по отношению к конъюгату **5'-h-9/14** или олигонуклеоиду *5'-h-9/14*. Радиоавтографы I, IV и VII демонстрируют расщпление миРНК-21 только под действием конъюгата **5'-h-9/14**, радиоавтографы II, V и VIII демонстрируют расщепление миРНК-21 совместно конъюгатом **5'-h-9/14** и РНКазой H,

радиоавтографы III, VI, и IX демонстрируют расщепление миРНК-21 в комплексе с олигонуклотидом 5'-h-9/14 под действием РНКазы Н. Дуплексы 5'-[³²P]-миРНК-21 (10, 25, и 50 мкМ) и олигонуклеотида или конъюгата (5 мкМ) инкубировали при 37°С в течение 48 ч в буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl (pH 7.8), 40 мМ KCl, 8 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT. Дорожки Im и T1 – частичное расщепление 5'-[³²P]-миРНК-21 РНКазой T1 и в 2 М имидазоле, соответственно. Контроль – РНК инкубировали в отсутствие олигонуклеотидов или конъюгатов и в присутствии РНКазы Н. Концентрация РНКазы Н в реакционной смеси составляла 100 ед. акт./мл. (Б), (Г) и (Е) Диаграммы, демонстрирующие кинетику расщепления миРНК-21 конъюгатом, комбинацией конъюгата и РНКазы Н или РНКазой Н (100 ед. акт./мл) в комплексе с олигонуклеотиду, соответственно. (Ж) Сайты расщепления миРНК-21 конъюгатом (красные стрелки), РНКазой Н в дуплексе с олигонуклеотидом (черные стрелки) или при совместном действии конъюгата и РНКазы Н. (З) Гипотетический механизм расщепления миРНК-21 под действием конъюгата и РНКазы Н совместно.

В комплексе миРНК-21 с конъюгатом, расщепление происходит как по G-X связям, характерным для **5'-h-9/14** (G₃C₄, G₁₅A₁₆, G₁₈U₁₉, и G₂₁A₂₂), так и по связям, чувствительным для РНКазы H (U₆A₇, C₉A₁₀, и G₁₁A₁₂) (Рисунок 14 А-II, B-V, и Д-VIII). Вероятнее всего, комплекс миРНК и конъюгата в концевых областях является «дышащим». Поэтому наблюдается расщепление связи G₃C₄ под действием пептида конъюгата, так как радиус его действия, согласно ранее полученным данным, составляет 36 Å [32]. Помимо этого, накопление коротких фрагментов может быть следствием дорасщепления фрагментов РНКазой H, которое вероятнее всего, связано с тем, что скорость расщепления многократно превосходит скорость диссоциации фрагментов из гетеродуплекса.

Исследование кинетики расщепления миРНК показало, что в комплексе с олигонуклеотидом 5'-h-9/14 расщепление под действием РНКазы Н РНК-мишени, взятой в 2-кратном избытке по отношению к олигонуклеотиду, достигает плато через 30 мин инкубации, причём суммарная эффективность расщепления составляет приблизительно 45% (Рисунок 14 А-Ш, Б – синяя кривая). При увеличении концентрации миРНК до 5- и 10-кратного избытка эффективность расщепления миРНК РНКазой Н в комплексе с олигонуклеотидом снижается до 10% и 5%, соответственно (Рисунок 14 В-VI, Д-IX; Г и Е – синие кривые), что, вероятнее всего, отражает уменьшение доли гетеродуплекса миРНК/олигонуклеотид по отношению к общему количеству миРНК в растворе.

В свою очередь, в данных условиях конъюгат **5'-h-9/14** расщепляет миРНК в каталитическом режиме: уже через 24 ч инкубации степень расщепления миРНК-21 при 2-, 5- и 10-кратном избытке мишени составляет 65-68% (Рисунок 14 А-I, В-IV, Д-VII; Б, Г и Е–черная кривая), а к 72 ч возрастает до 87% (Рисунок 13). Исследование кинетики расщепления миРНК-21 совместно конъюгатом **5'-h-9/14** и РНКазой Н показало, что при 2-кратном избытке миРНК-21 по отношению к конъюгату полное расщепление РНК наблюдается через 8 ч инкубации

(Рисунок 14 А-II, Б – красная кривая), при 5-кратном избытке миРНК через 24 ч (Рисунок 14 В-V, Г – красная кривая), а в случае 10-кратного избытка – через 48 ч (Рисунок 14 Д-VIII).

Анализ данных о периоде полурасщепления миРНК ($\tau/2$) под действием конъюгата **5'-h-9/14** и РНКазы Н показал, что в условиях 2-, 5- и 10-кратного избытка миРНК скорость расщепления миРНК конъюгатом **5'-h-9/14** в присутствии РНКазы Н была в 14.9, 3 и 2.4 раза выше по сравнению с действием только конъюгата, соответственно (Таблица 9).

Таблица 9. Время полурасщепления миРНК-21 и обороты реакции её расщепления в присутствии конъюгата **5'-h-9/14** и РНКазы Н

5'-h-9/14, мкМ	миРНК-21, мкМ	Избыток РНК	т/2 ¹⁾ , ч		R t ²⁾	
			РНКаза Н		РНКаза Н	
				+	_	+
5	10	2- кратный	10.4±0.5	0.7±0.2	104±10	1620±105
	25	5- кратный	16.2±1.5	5.4±0.4	106±11	740±90
	50	10- кратный	11.04±0.8	4.7±0.4	382±28	1760±132

¹⁾ т/2 – время полурасщепления миРНК-21, за которое расщепляется 50% молекул миРНК.

²⁾ Rt, (Reaction turnover) обороты реакции – число молекул миРНК, расщепленных одной молекулой конъюгата за 1 ч. Rt рассчитывали согласно формуле Rt = [концентрация миРНК-21] × (количество расщепляемых связей) × (эффективность расщепления, %) / [концентрация конъюгата].

Расчёт количества оборотов реакции показал, что одна молекула конъюгата **5'-h-9/14** за 1 ч осуществляла расщепление 100 молекул миРНК в условиях 2- и 5-кратного избытка миРНК, и около 380 молекул в условиях 10-кратного избытка миРНК (Таблица 9). Добавление РНКазы Н увеличивало количество оборотов реакции в 15.6, 7.0 и 4.6 раз при 2-, 5- и 10-кратном избытке миРНК-21, соответственно, приводя к расщеплению приблизительно 1800 молекул миРНК за 1 ч. Очевидно, что наличие РНКазы Н значительно усиливает эффективность расщепления миРНК-21 в комплексе с конъюгатом, видимо, за счёт ускорения диссоциации коротких фрагментов РНК из гетеродуплекса после расщепления.

Таким образом, наши исследования показали, что миРНК-направленный конъюгат 5'-h-9/14 способен с высокой эффективностью расщеплять миРНК-21 в каталитическом режиме. Важным открытием является обнаружение синергического эффекта миРНК-направленного конъюгата и РНКазы Н. Вероятнее всего, многократное увеличение скорости и эффективности расщепления миРНК совместно конъюгатом и РНКазой Н может объясняться: (1) усилением активности конъюгата вследствие вытеснения пептида из непродуктивных конформаций при взаимодействии РНКазы H с гетеродуплексом; (2) увеличением эффективности расщепления субстрата РНКазой H в силу большей стабилизации гетеродуплекса с конъюгатом по сравнению с олигонуклеотидом, а также (3) за счёт одновременного увеличения процессивности и конъюгата, и РНКазы H вследствие расщепления миРНК на более короткие фрагменты (Рисунок 14 А-II, В-V, Д-III) и ускорения диссоциации конъюгата и РНКазы H из комплекса для последующих циклов расщепления (Рисунок 14 З).

Несомненным преимуществом совместного расщепления рибонуклеазами является деградация миРНК-21 в различных областях: под действием РНКазы Н миРНК-21 расщепляется по 5'-концу в «seed» области, являющейся канонической детерминантой функций миРНК [228], а посредством конъюгата деградация происходит в 3'-области дополнительных взаимодействий, определяющей особенности функционирования и процессинга миРНК [39,229]. Синергическое действие конъюгата **5'-h-9/14** и РНКазы Н, широко представленной в клетке, даёт основание полагать, что разработанные миРНК-направленные иРНКазы могут обладать высокой биологической активностью в опухолевых клетках.

Таким образом, исследование гибридизационных свойств и рибонуклеазной активности разработанных миРНК-направленных иРНКаз показало, что шпилечные конъюгаты 5'-h-6/14 и 5'-h-9/14 проявляют высокую рибонуклеазную активность и расщепляют РНК мишень в каталитическом режиме. Высокая эффективность действия такого типа конъюгатов позволила нам ввести для его обозначения специальный термин – «миРНКаза» (от «рибонуклеаза, расщепляющая миРНК»). Наиболее эффективные миРНКазы 5'-h-6/14 и 5'-h-9/14 были выбраны для исследования их биологической активности *in vitro* и *in vivo*.

3.1.1.7 Исследование биологической активности миРНК-направленных иРНКаз на культурах опухолевых клеток

3.1.1.7.1 Исследование нуклеазоустойчивости миРНК-направленных иРНКаз в ростовой среде в присутствии сыворотки

Важной характеристикой терапевтического препарата для применения *in vitro* и *in vivo* является его стабильность к действию сывороточных и внутриклеточных нуклеаз. На Рисунке 15 показаны результаты сравнительного анализа стабильности олигонуклеотидов 5'-14, 5'-*h*-9/14 и 5'-16 и конъюгатов 5'-16 и 5'-h-9/14 в среде, содержащей 10%-ную бычью эмбриональную сыворотку (БЭС).

Как видно из представленных на Рисунке 15 А данных, наличие в структуре конъюгатов пептида оказывает существенное влияние на стабильность соединения в среде с 10%-ной сывороткой. В присутствии нуклеаз линейные олигонуклеотиды 5'-14 и 5'-16 уже через 2 ч разрушаются на 90%. За то же время, конъюгат **5'-16** разрушается лишь на 40% (Рисунок 15 А,

Б и В). Через 4 ч инкубации степень деградации олигонуклеотидов 5'-14 и 5'-16 составляет 95%, а конъюгата 5'-16 – около 75%. К 8 ч инкубации наблюдается практически 100% деградация и линейных олигонуклеотидов, и конъюгата.



Рисунок 15. Стабильность адресующих олигонуклеотидов 5'-16, 5'-14, 5'-h-9/14 и конюгатов 5'-16 и 5'-h-9/14 в среде, содержащей 10%-ную БЭС. Разделение продуктов деградации олигонуклеотида 5'-16 и конъюгата 5'-16 (А) и олигонуклеотидов 5'-14 и 5'-h-9/14 и конъюгата 5'-h-9/14 (В) в 15%-ном денатурирующем ПААГ. Окраска stains-All. Над дорожками обозначено время инкубации адресующего олигонуклеотида или конъюгата в 10%-ной сыворотке (в часах). (Б) и (Г) Графики, отражающие степень деградации соединений в зависимости от времени инкубации.

Введение шпильки по 3'-концу олигонуклеотида также значительно увеличивает стабильность соединений. Так, олигонуклеотид 5'-h-9/14 остается практически интактным в течение первых 4 ч инкубации, а через 8 ч разрушается не более, чем на 10% (Рисунок 15 В и Г). Через 24 ч и 48 ч степень деградации олигонуклеотида 5'-h-9/14 составляет 15% и 25%, соответственно (Рисунок 15 В и Г). Присоединение пептида по 5'-концу олигонуклеотида обеспечивает ещё более высокий уровень стабильности к действию сывороточных нуклеаз: через 24 ч конъюгат 5'-h-9/14 сохраняется в интактном состоянии на 100%, а через 48 ч на 95% (Рисунок 15 В и Г).

Известно, что олигонуклеотиды на основе немодифицированной ДНК характеризуются коротким периодом полужизни из-за низкой устойчивости к действию сывороточных нуклеаз. Вследствие этого, такие олигонуклеотиды обладают малой биологической активностью *in vivo*, а для улучшения их эффективности требуется введение модификаций в их структуру. В данной

работе увеличение нуклеазоустойчивости олигонуклеотид-пептидных конъюгатов было достигнуто за счёт добавления шпилечной структуры в 3'-область олигонуклеотидной компоненты и присоединения пептида на 5'-конец олигоуклеотида. Наблюдаемое увеличение нуклеазоустойчивости за счёт введения в структуру олигонуклеотида шпильки коррелирует с ранее опубликованными данными. Так показано, что введение шпилечных структур в концевые области олигонуклеотидов значительно увеличивает время полужизни соединений и обеспечивает высокую стабильность к действию фосфодиэстеразы змеиного яда [230]. Помимо этого, добавление фланкирующих шпилек может увеличивать терапевтический эффект модифицированных анти-миРНК олигонуклеотидов за счёт облегчения их включения в комплекс miRISC [231,232]. В свою очередь, роль пептида в обеспечении нуклеазоустойчивости разработанных соединений была отмечена впервые.

Стоит отметить, что разработанные конъюгаты обладают сравнительно высокой нуклеазоустойчивостью. В условиях 10%-ной БЭС она была сопоставима со стабильностью миРНК-21-направленных линейных фосфотиоатных миксмеров с разными паттернами модификаций сахарофосфатного остова, включая ДНК/LNA, 2'F/LNA и 2'OMe/LNA [122]. Таким образом, обнаруженная высокая нуклеазоустойчивость миРНК-направленных рибонуклеаз к действию сывороточных нуклеаз может обеспечить их продолжительный биологический эффект *in vitro* и *in vivo*.

3.1.1.7.2 Исследование рибонуклеазной активности некомплементарного контрольного конъюгата

В экспериментах по исследованию биологической активности разработанных миРНКаз специфическое действие конъюгатов предполагалось оценивать в сравнении с эффектом контрольного конъюгата 5'-luc-h-9/14, содержащего пептид, также присоединенный по 5'концу шпилечного олигонуклеотида. Антисмысловая последовательность в составе олигонуклеотида представляла фрагмент гена люциферазы, не имеющий гомологии в геноме млекопитающих (Таблица 4). Перед проведением исследований биологической активности конъюгата 5'-h-9/14 на опухолевых клетках нами была изучена рибонуклеазная активность конъюгата 5'-luc-h-9/14. Исследование контрольного эффективности расщепления синтетической 5'-[³²P]-миРНК-21 под действием конъюгата 5'-luc-h-9/14 проводили в диапазоне концентраций 1 – 20 мкМ, и сравнивали с активностью специфического конъюгата 5'-h-9/14 при 37 °С, в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl (pH 7.0), 200 мМ KCl, 1 мМ EDTA.

Из Рисунка 16 А видно, что, **5'-luc-h-9/14** неспецифически расщепляет миРНК-21 по всем G-X связям, имеющимся в последовательности миРНК-21: G₃C₄, G₁₁A₁₂, G₁₅A₁₆, G₁₈U₁₉ и G₂₁A₂₂. При этом, суммарная эффективность расщепления миРНК-21 некомплементарным

конъюгатом 5'-luc-h-9/14 была значительно ниже, чем действие специфического конъюгата 5'-h-9/14.



Рисунок 16. Разделение продуктов расщепления 5'-[³²P]-миРНК-21 некомплементарным конъюгатом **5'-luc-h-9/14.** (**A**) Радиоавтограф 18%-ного денатурирующего ПААГ. Реакцию проводили при 37 °C в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl (pH 7.0), 200 мМ KCl, 1 мМ ЕDTA, в течение 24 ч. Дорожки Im и T1 – частичное расщепление 5'-[³²P]-миРНК-21 РНКазой T1 и в 2 М имидазоле, соответственно. К – миРНК-21 инкубировали в отсутствие конъюгатов. Над дорожками обозначена концентрация олигонуклеотид-пептидного конъюгата (в мкМ). (**Б**) Концентрационная зависимость расщепления миРНК-21 под действием некомплементарного конъюгата **5'-luc-h-9/14** и специфического конъюгата **5'-h-9/14**.

На Рисунке 16 Б приведены концентрационные зависимости расщепления миРНК-21 под действием конъюгатов **5'-luc-h-9/14** и **5'-h-9/14**. Как видно из представленных данных, суммарная эффективность расщепления миРНК-21 составляет 20% для **5'-luc-h-9/14** и 70% для конъюгата **5'-h-9/14**.

Полученные данные поднимают вопрос о возможных неспецифических эффектах разработанных миРНК-направленных рибонуклеаз в клетке. Стоит отметить, что расщепление миРНК-21 некомплементарным конъюгатом 5'-luc-h-9/14 было исследовано в условиях 20кратного избытка конъюгата по отношению к миРНК мишени. Дальнейшие эксперименты на культуре клеток и на мышах были проведены при концентрации конъюгата 1 мкМ. В таких условиях степень неспецифического расщепления миРНК-21 контрольным конъюгатом 5'-luc**h-9/14** составляет не более 1 - 2%, что сопоставимо с уровнем спонтанного расщепления РНК в клетках. Кроме этого, в клетках присутствует высокий избыток других РНК молекул, что будет способствовать миРНК-21, дополнительному снижению доли И препятствовать неспецифическому расщеплению конъюгатом 5'-luc-h-9/14. Следует отметить, что специфический конъюгат 5'-h-9/14 действует синергически с внутриклеточной РНКазой Н, что будет лишь увеличивать разницу между специфическим и неспецифическим расщеплением.

3.1.1.7.3 Влияние миРНК-направленных иРНКаз на уровень миРНК и её белков мишеней в клетках лимфосаркомы RLS₄₀

С точки зрения терапевтической значимости важным вопросом является подтверждение способности разработанных олигонуклеотид-пептидных конъюгатов инактивировать миРНК-21 в биологической системе. Для этого было проведено исследование эффективности снижения уровня миРНК-21 под действием конъюгата 5'-h-9/14 в клетках лимфосаркомы RLS₄₀, в которой ранее был выявлен повышенный уровень этой онкогенной миРНК. Для подтверждения специфичности действия 5'-h-9/14 было также исследовано его влияние на уровень миРНК let7g. Биологическую активность конъюгата сравнивали с эффектом адресующего олигонуклеотида 5'-h-9/14 И контрольного конъюгата 5'-luc-h-9/14. Трансфекцию конъюгатов И олигонуклеотидов в опухолевые использованием клетки проводили с коммерческого трансфектанта Lipofectamine2000TM.

Эффективность действия конъюгата **5'-h-9/14** оценивали путем сравнения уровней экспрессии миРНК-21 в контрольных и трансфицированных конъюгатом опухолевых клетках (Рисунок 17).



Рисунок 17. Биологическая активность конъюгата **5'-h-9/14** в клетках лимфосаркомы RLS₄₀. Уровни миРНК-21 (**A**) и миРНК let7-g (**Б**) в клетках RLS₄₀, определённые методом stem-loop ПЦР в режиме реального времени. Уровень миРНК-21 нормировали на уровни мяРНК U6 и

мРНК гена *Rpl30.* (**B**) Уровень белка PDCD4, определённый методом Вестерн блот гибридизации через 48 ч после трансфекции клеток RLS_{40} исследуемыми соединениями. Уровень белка PDCD4 нормировали на уровень белка GAPDH. (1) – Контроль, интактные клетки RLS_{40} , (2) – LF, клетки RLS_{40} , инкубированные только с Lipofectamine 2000TM, (3, 4, 5) – **5'-luc-h-9/14**, 5'-h-9/14, клетки RLS_{40} трансфицированные 1 мкМ контрольным конъюгатом, адресующим олигонуклеотидом и анти-миРНК-21 конъюгатом, соответственно. (Г) Пролиферативный потенциал клеток RLS_{40} через 72 ч после трансфекции.

Как видно из представленных данных, трансфекция клеток RLS_{40} олигонуклеотидом 5'h-9/14 и контрольным конъюгатом 5'-luc-h-9/14 не оказывает статистически значимого влияния на уровень миРНК-21. Конъюгат 5'-h-9/14 через 24 ч после трансфекции снижает уровень миРНК-21 в клетках RLS_{40} более чем в 2 раза по сравнению с контрольными интактными клетками и клетками, обработанными Lipofectamine2000TM, а к 72 ч уровень миРНК-21 восстанавливается до 80% от исходного уровня (Рисунок 17 А). Исследование уровня миРНК let7-g в клетках RLS_{40} показало, что ни одно из соединений не приводит к статистически значимому изменению уровня этой миРНК (Рисунок 17 Б), что свидетельствует о специфичности эффекта 5'-h-9/14.

Следствием снижения патологически высокого уровня онкогенной миРНК в опухолевых клетках должно стать восстановление уровня онкосупрессорных белков-мишеней, регулируемых этой миРНК. В ответ на обработку клеток анти-миРНК-21 конъюгатом нами был исследован уровень белка запрограммированной клеточной смерти 4 (от англ. Programmed cell death protein 4 – PDCD4), экспрессия которого напрямую контролируется миРНК-21 [63].

Определение уровня белка проводили методом Вестерн блот гибридизации через 48 ч после трансфекции клеток RLS₄₀ конъюгатом **5'-h-9/14**, олигонуклеотидом *5'-h-9/14* и контрольным конъюгатом **5'-luc-h-9/14** в концентрации 1 мкМ (Рисунок 17 В). Как видно из Рисунка 17, под действием контрольного конъюгата **5'-luc-h-9/14** не происходит видимого достоверно значимого повышения уровня белка PDCD4, тогда как после трансфекции клеток олигонуклеотидом *5'-h-9/14* уровень белка PDCD4 возрастал в 1.3 раза по сравнению с контролем, но эти изменения не являлись статистически достоверными. И лишь под действием конъюгата **5'-h-9/14** наблюдалось достоверное увеличение уровня белка PDCD4 в 1.9 раз по сравнению с интактными клетками (Рисунок 17 В).

Стоит отметить, что наблюдаемый эффект конъюгата **5'-h-9/14** сопоставим с ингибирующим действием ранее созданных анти-миРНК антисмысловых олигонуклеотидов. В частности, сходной эффективностью в различных линиях опухолевых клеток обладают миРНК-21-направленные фосфотиоатные и 2'ОМе-олигонуклеотиды, которые обеспечивают двукратное снижение уровня миРНК-21 и увеличение экспресии её белковых мишеней PDCD4, PTEN и TPM1 в клетках в 3 [233,234], 2.2 [235] и 1.4 раза [69], соответственно. Полученные данные позволяют предположить, что подавление миРНК-21 под действием специфического конъюгата может способствовать восстановлению уровня и других белков мишеней и, как следствие, приводить к нормализации ключевых процессов в опухолевых клетках, способствуя снижению скорости пролиферации клеток, подавлению их инвазии, а также индукции апоптоза.

3.1.1.7.4 Влияние миРНК-направленных иРНКаз на пролиферацию опухолевых клеток лимфосаркомы RLS₄₀

МиРНК-21 играет существенную роль в регуляции фундаментальных процессов клетки, в частности, пролиферации, миграции, инвазии и апоптоза, и направленное снижение патологически высокого уровня миРНК-21 в опухолевых клетках может приводить к глобальному изменению экспрессии её белков мишеней и последующему снижению скорости роста, уменьшению мотильности и инвазии клеток, а также способствовать переходу популяции клеток в состояние апоптоза. В связи с этим нами был исследован антипролиферативный, анти-инвазивный и про-апоптотический потенциал конъюгата **5'-h-9/14**.

Антипролиферативный эффект конъюгата **5'-h-9/14** исследовали на опухолевых клетках RLS40 путём определения времени удвоения популяции клеток после их трансфекции 1 мкМ конъюгатом **5'-h-9/14**, олигонуклеотидом *5'-h-9/14* или контрольным конъюгатом **5'-luc-h-9/14**. Анализ проведён для точки 72 ч после трансфекции (Рисунок 17 Г).

Время удвоения числа интактных клеток RLS40 составляло 22.3±0.7 ч, а клеток, обработанных Lipofectamine 2000^{TM} или контрольным конъюгатом **5'-luc-h-9/14** – 22.7±0.9 и 22.9±1.0 ч, соответственно. Трансфекция клеток антисмысловым олигонуклеотидом 5'-h-9/14 приводила к увеличению времени удвоения числа клеток до 25.7±1.0 ч, тогда как конъюгат 5'h-9/14 продемонстрировал наибольшее антипролиферативное действие, способствуя увеличению времени удвоения числа клеток RLS40 до 33.3±2.2 ч, что в 1.4 раза превышает время удвоения клеток в контрольных группах. Полученные данные согласуются с данными, полученными с помощью MTT теста, который показал, что трансфекция клеток Lipofectamine2000TM или контрольным конъюгатом **5'-luc-h-9/14** не вызывает статистически изменения пролиферации опухолевых клеток. Олигонуклеотид 5'-h-9/14 значимого способствует 30%-ному подавлению пролиферации клеток лимфосаркомы, а конъюгат 5'-h-9/14 вызывает 50%-ное ингибирование пролиферации, что в 1.4 раза превосходит эффект антисмыслового олигонуклеотида той же структуры (Рисунок 17 Г).

3.1.1.7.5 Влияние миРНК-направленных иРНКаз на инвазию и апоптоз клеток меланомы B16

Противоинвазивное и про-апоптотическое действие анти-миРНК-21 конъюгата исследовали на клетках меланомы В16 мышей, которые характеризуются высоким метастатическим потенциалом и агрессивностью опухолевого роста.

Исследование про-апоптотического действия конъюгата **5'-h-9/14** проводили методом окрашивания клеток B16 Annexin V-FITC/PI с последующей проточной цитофлуориметрией. Показано, что под действием как специфического **5'-h-9/14**, так и контрольного конъюгата **5'luc-h-9/14** через 48 ч инкубации наблюдается увеличение процента клеток B16 с признаками некроза до 7% (Рисунок 18 А). При этом, для клеток B16, обработанных специфическим антимиРНК-21 конъюгатом был также отмечен значительный про-апоптотический эффект: количество клеток в состоянии апоптоза через 48 ч составляло 28%, что прилизительно в 6 раз выше по сравнению с контролем, в котором доля апоптотических клеток составляла 5% и в 1.6 раз выше по сравнению с контрольным конъюгатом, вызывающим апоптоз в 15% клеток (Рисунок 18 А и Б).



Рисунок 18. Про-апоптотическое и противоинвазивное действие конъюгата 5'-h-9/14 на клетках меланомы В16 мыши. (А) Апоптотический профиль клеток В16 после трансфекции специфическим конъюгатом 5'-h-9/14 и контрольным конъюгатом 5'-luc-h-9/14. Цитофлуориметрический анализ клеток, окрашенных Annexin V-FITC/PI, через 48 ч после

трансфекции соответствующими конъюгатами в концентрации 1 мкМ в комплексе с Lipofectamine2000TM. Q1 – популяция живых клеток; Q2 – Annexin V-FITC+/PI-, ранний апоптоз; Q3 – Annexin V-FITC+/PI+, поздний апоптоз; Q4 – Annexin V-FITC-/PI+, некроз. (**Б**) Процент апоптотических (в состоянии раннего и позднего апоптоза) и некротических клеток B16. (**B**, **Г**) Инвазивная активность клеток B16 после инкубирования с Lipofectamine2000TM (LF), дезоксирибоолигонуклеотидом 5'-h-9/14, 2'-OMe олигонуклеотидом 2'OMe-5'-h-9/14, коммерческим ингибитором миPHK-21 (Inh), конъюгатом **5'-h-9/14** и контрольным конъюгатом **5'-luc-h-9/14** в концентрации 1 мкМ. Миграцию клеток оценивали с помощью системы анализа в режиме реального времени xCELLigence. Контроль – интактные клетки B16.

Изучение противоинвазивных свойств конъюгата **5'-h-9/14** на клетки В16 проводили в сравнении с дезоксирибоолигонуклеотидом *5'-h-9/14*, контрольным конъюгатом **5'-luc-h-9/14**, полностью модифицированным 2'OMe-олигонуклеотидом *2'OMe-5'-h-9/14* и коммерческим ингибитором миPHK-21 *Inh* ("Ambion", США) с помощью системы регистрации в режиме реального времени xCelligence. Результаты эксперимента приведены на Рисунке 18.

Выявлено, что олигонуклеотиды 5'-h-9/14 и 2'OMe-5'-h-9/14 (синяя и фиолетовая кривая, соответственно), а также контрольный конъюгат 5'-luc-h-9/14 (зеленая кривая) не оказывают влияния на инвазивные свойства клеток меланомы (Рисунок 18 В и Г). Через 40 ч после трансфекции клеточный индекс составил 2.05 ± 0.29 для 5'-h-9/14, 2.35 ± 0.22 для 2'OMe-5'-h-9/14, 2.62 ± 0.15 для 5'-luc-h-9/14 и 2.19 ± 0.28 для клеток, инкубированных только с Lipofectamine2000TM. Было установлено, что коммерческий ингибитор (оранжевая кривая) способствует 40%-ному подавлению инвазии клеток В16 по сравнению с контролем и 20%-ному по сравнению с контрольным конъюгатом (Рисунок 18 Г). Наибольший противо-инвазивный эффект продемонстрировал конъюгат 5'-h-9/14 (красная кривая), который способствовал подавлению инвазии опухолевых клеток на 50% по сравнению с контролем и контрольным конъюгатом. Клеточный индекс в этих образцах через 40 ч после трансфекции составил 1.47±0.09 (Рисунок 18 В).

Таким образом, выявлено, что на культурах опухолевых клеток различного гистогенеза конъюгат **5'-h-9/14** обладает высоким антипролиферативным, про-апоптотическим и антиинвазивным действием, значительно превыщающим эффект олигонуклеотидов и коммерческого ингибитора.

3.1.1.8 Влияние миРНК-направленных иРНКаз на рост лимфосаркомы RLS₄₀ у мышей

Подавление роста опухоли под действием конъюгата **5'-h-9/14** проводили на мышах с использованием модели солидной опухоли RLS_{40} *ex vivo*. Для этого полученную из асцита первичную культуру клеток лимфосаркомы RLS_{40} трансфицировали *in vitro* с помощью Lipofectamine2000TM конъюгатом **5'-h-9/14**, олигонуклеотидом *5'-h-9/14*, 2'OMe-

олигонуклеотидом 2'OMe-5'-h-9/14, контрольным конъюгатом 5'-luc-h-9/14 в концентрации 1 мкМ, а затем внутримышечно имплантировали мышам линии СВА для формирования солидной опухоли. Такой подход обеспечивает доставку соединений в 90-100% клеток, формирующих опухолевый узел, что позволяет оценить чистый противоопухолевый эффект олигонуклеотидных конструкций, исключая влияние эффективности таргетной доставки соединений в организме животных. Ингибирующий эффект анти-миРНК-21 конъюгата исследовали в сравнении с эффектом коммерческого ингибитора миРНК-21 Inh, введённого в клетки в концентрациях 0.1 (рекомендуемая производителем) и 1 мкМ. Результаты эксперимента представлены на Рисунке 19.

Как видно из представленных данных, олигонуклеотид 2'ОМе-5'-h-9/14, контрольный конъюгат 5'-luc-h-9/14, а также коммерческий ингибитор Inh в концентрации 0.1 мкМ не вызывают статистически значимого снижения роста опухоли (Рисунок 19 А и Б). Олигодезоксирибонуклеотид 5'-h-9/14 снижает скорость опухолевого роста приблизительно на 50%. Трансфекция опухолевых клеток анти-миРНК-21 конъюгатом 5'-h-9/14 приводит к ещё более значительному снижению скорости роста опухоли, достигающему 94% (по сравнению с контролем) к моменту завершения эксперимента. Измерение размеров опухолей показало, что объём опухоли в этой группе был в 16.7 раз меньше, чем в контроле, и в 8.5 раз меньше, чем после обработки контрольным конъюгатом 5'-luc-h-9/14 (Рисунок 19 А и Б). Сходный противоопухолевый эффект продемонстрировал только коммерческий ингибитор Inh («Ambion», США) в концентрации 1 мкМ. Стоит отметить, что данная концентрация превышает рекомендованную производителем дозу, составляющую 0.05 – 0.1 мкМ в 10-20 раз, и может вызвать побочные эффекты. Таким образом, мы показали, что даже однократная обработка опухолевых клеток миРНК-21-направленной иРНКазой способствует многократному подавлению опухолевого роста.

Анализ времени удвоения объёма опухоли (DT) показал, что данный показатель в группах мышей с опухолями, обработанными Lipofectamine2000TM, контрольным конъюгатом **5'-luc-h-9/14**, олигонуклеотидами *5'-h-9/14* и *2'OMe-5'-h-9/14*, а также коммерческим ингибитором *Inh* в концентрации 0.1 мкМ, достоверно не отличается от контроля, для которого DT составляет 2.45 \pm 0.49 дней (Рисунок 19 В). Под действием конъюгата **5'-h-9/14** время удвоения опухоли возрастает до 12.77 \pm 0.34 дней, что в 5 раз выше по сравнению с группой, в которой клетки RLS₄₀ не подвергались обработке (Рисунок 19 В). Значение DT в группе мышей с опухолями, трансфицированными коммерческим ингибитором в концентрации 1 мкМ, составляет 13.90 \pm 0.46 дней, что сопоставимо с действием **5'-h-9/14**. Однако такое увеличение DT наблюдалось только в случае 10-кратного увеличения рекомендованной производителем концентрации ингибитора (Рисунок 19 В).



Рисунок 19. Противоопухолевое действие коньюгата 5'-h-9/14. (А) Динамика роста опухоли RLS₄₀ после обработки клеток олигонуклеотидами 5'-h-9/14 и 2'OMe-5'-h-9/14, контрольным коньюгатом 5'-luc-h-9/14, миРНК-21-направленным коньюгатом 5'-h-9/14 или коммерческим ингибитором миРНК-21 Inh («Ambion», США). (Б) Объём опухоли на 19 день после трансплантации клеток RLS₄₀. Мышам линии CBA имплантировали интактные клетки RLS₄₀ (Контроль) или клетки обработанные Lipofectamine2000TM (LF), коммерческим ингибитором миРНК-21 в концентрациях 0.1 мкМ (Inh 0.1, концентрация, рекомендованная производителем) и 1 мкМ (Inh 1, соответствующая концентрации других соединений в данной работе), контрольным конъюгатом 5'-luc-h-9/14, олигонуклеотидами 5'-h-9/14 и 2'OMe-5'-h-9/14 или миРНК-21 специфическим конъюгатом 5'-h-9/14 в концентрации 1 мкМ. (В) Время удвоения опухоли RLS₄₀ после обработки олигонуклеотидами и конъюгатами.

Эффективное подавление миРНК-21 с использованием конъюгата **5'-h-9/14** способно инициировать широкий спектр биологических ответов в клеточных линиях, способствуя 50%ному подавлению пролиферации, 60-70%-ному подавлению инвазии и инициации апоптоза в 28% популяции опухолевых клеток. В дополнение к этому, разработанный конъюгат продемонстрировал высокую биологическую активность на мышиной опухолевой модели. Даже однократная обработка опухолевых клеток конъюгатом **5'-h-9/14** способствовала 94%ному торможению опухолевого роста у мышей. Время удвоения опухоли в результате терапии увеличивалось более чем в 5 раз по сравнению с контролем или группами, в которых клетки были обработаны контрольным конъюгатом **5'-luc-h-9/14** или шпилечным олигонуклеотидом *5'-h-9/14*. Такая высокая терапевтическая эффективность разработанного миРНК-21направленного олигонуклеотид-пептидного конъюгата, вероятнее всего, является следствием (1) высокой нуклеазоустойчивости конъюгата; (2) эффективного расщепления миРНК-мишени в каталитическом режиме и (3) синергического действия с внутриклеточной РНКазой Н.

3.1.2 Влияние модификаций рибозофосфатного остова адресующего олигонуклеотида на биологические свойства миРНК-направленных искусственных рибонуклеаз

Для улучшения биологических свойств препаратов на основе нуклеиновых кислот исследователи вводят в их состав модификации сахарофосфатного остова и азотистых оснований [122,123]. Используемые модификации нередко способствуют значительному изменению структуры дуплексов таких ингибиторов с их мишенями, что в случае искусственных рибонуклеаз может вызвать существенное изменение активной конформации соединений и их рибонуклеазной активности. Поэтому, при разработке модифицированных иРНКаз главной задачей является выбор оптимальной модификации и паттерна её введения в структуру олигонуклеотидного домена для сохранения и увеличения биологической активности соединений.

В настоящее время при разработке модифицированных иРНКаз исследователи чаще всего используют олигонуклеотиды на основе пептидил нуклеиновых кислот (PNA). И хотя введение PNA звеньев многократно увеличивает нуклеазоустойчивость соединений, существенно улучшает связывание олигонуклеотидной компоненты с мишенью [236], а также обеспечивает увеличение числа расщепляемых связей в субстрате по сравнению с ДНК аналогом [28,29], использование PNA модификации может оказывать негативное влияние. Так, в частности, PNA-модифицированные конъюгаты склонны к формированию агрегатов, приводящих к снижению эффективной концентрации конъюгатов в растворе [29], не расщепляют PHK-субстрат в каталитическом режиме из-за прочного связывания с мишенью [27], а также крайне чувствительны к изменению длины PNA олигонуклеотида, которая влияет

95

на эффективность сайт-направленного расщепления мишени [29]. Таким образом, для создания эффективной рибонуклеазы на основе PNA аналогов, требуется тщательная оптимизация дизайна конъюгатов.

Недавно впервые были сконструированы иРНКазы, в состав олигонуклеотидной компоненты которых были введены LNA модификации. Получены многообещающие данные, согласно которым введение шести LNA звеньев в структуру 15-звенного олигонуклеотидного домена конъюгата с трис(2-аминобензимидазолом) не только не изменяет паттерн расщепления РНК конъюгатом, но и обеспечивает четырёхкратное увеличение скорости расщепления мишени по сравнению с немодифицированным аналогом [30].

В целом, на сегодняшний день, количество исследований, посвящённых разработке и исследованию свойств модифицированных искусственных рибонуклеаз крайне невелико. Одной из задач настоящей работы стало изучение влияния химических модификаций, в частности, 2'ОМетильных, на свойства и активность олигонуклеотид-пептидных конъюгатов.

3.1.2.1 Дизайн миРНК-направленных иРНКаз, содержащих различный паттерн 2'ОМе модификаций в области связывания с миРНК

В данной работе разработаны иРНКазы, в которых в адресующую компоненту были введены 2'ОМе-модификации нуклеотидов для увеличения нуклеазоустойчивости и эффективности связывания конъюгатов с миРНК-мишенью. В качестве основы для дизайна был выбран один из наиболее эффективных немодифицированных конъюгатов **5'-h-6/14**. Было создано два типа 2'ОМе-рибонуклеаз: **2'ОМе-миРНКаза** (1), в которой связывающий олигонуклеотид состоял из немодифицированной шпильки и полностью модифицированной области, комплементарной миРНК-21; и **2'OMe-миРНКаза** (2), которая имела такую же структуру, как **2'OMe-миРНКаза** (1) за исключением того, что три нуклеотида с 5'-конца, расположенные в непосредственной близости к точке присоединения каталитического пептида, были оставлены без модификации (Рисунок 20 А). Биологические свойства сконструированных 2'OMe-миРНКаз сравнивали со свойствами немодифицированного конъюгата **5'-h-6/14**.

3.1.2.2 Исследование гибридизационных свойств миРНК-направленных 2'ОМеиРНКаз

Гибридизационные свойства **2'ОМе-миРНКаз (1)** и (**2**) исследовали в реакции с 5'-[³²P]меченой миРНК-21 (1 мкМ) методом задежки в 15%-ном нативном ПААГ при 37 °С в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl (pH 7.0), 200 мМ КСl, 1 мМ ЕDTA (Рисунок 20). Оказалось, что введение 2'ОМе-модификаций улучшает гибридизационные свойства конъюгатов по сравнению с их ДНК-аналогом (Рисунок 20 Б и В): уже в эквимолярной концентрации эффективность связывания коньюгатов **2'ОМе-миРНКаз** (1) и (2) с миРНК-21 составляла 34% и 28%, соответственно, что в 3 раза превышает степень связывания коньюгата **5'-h-6/14**, для которого она составляет 10% в этих условиях. Количественное связывание для **2'ОМе-миРНКаз** (1) и (2) наблюдалось уже при концентрации 2.5 мкМ, тогда как для коньюгата **5'-h-6/14** 96%-ное связывание с РНК-мишенью наблюдается при концентрациях 5 мкМ и выше (Рисунок 20 Б и В). Таким образом, введение 2'ОМе-модификаций в область связывания коньюгата с миРНК способствует увеличению их сродства к РНК-мишени, что может быть связано с увеличением температуры плавления дуплекса миРНК:коньюгат на 1 - 1.5 °C на каждую 2'OMe-модификацию [237].



Рисунок 20. Структура и гибридизационные свойства модифицированных конъюгатов. (**A**) Структура комплексов миРНК-21 с специфическими конъюгатами **5'-h-6/14**, **2'OMe-миРНКаза** (**1**) и (**2**) и контрольным конъюгатом **5'-luc-h-6/14**. (**Б**) Радиоавтограф 15%-ного нативного ПААГ, демонстрирующий связывание миРНКаз с миРНК-21. 5'-[³²P]-миРНК-21 (1 мкМ) инкубировали с конъюгатами (0.1 – 10 мкМ) при 37 °C в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl (рН 7.0), 200 мМ КСl, 1 мМ ЕDTA, в течение 1 ч. К – миРНК-21 инкубировали в отсутствие конъюгатов. После окончания реакции образцы были нанесены на идущий гель-электрофорез с интервалом в 1 мин. (**B**) Концентрационная зависимость связывания конъюгатов с миРНК-21.

3.1.2.3. Исследование рибонуклеазной активности миРНК-направленных 2'ОМеиРНКаз в условиях однооборотной и многообротной реакций

Исследование влияния 2'ОМе-модификаций на рибонуклеазную активность разработанных иРНКаз оценивали в условиях однооборотной реакции при 20-кратном избытке конъюгатов по отношению к миРНК ([миРНК-21] = 1 мкМ, [конъюгат] = 20 мкМ) или в условиях многооборотной реакции при 2-кратном избытке миРНК по отношению к конъюгату ([миРНК-21] = 10 мкМ, [конъюгат] = 5 мкМ) при 37 °C в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl (рН 7.0), 200 мМ КСl, 1 мМ ЕDTA (Рисунок 21).



Рисунок. 21. Кинетика расщепления 5'-[³²P]-миРНК-21 конъюгатом **5'-h-6/14** и **2'OMe-миРНКазами.** (**A**) Радиоавтограф 18%-ного денатурирующего ПААГ и кинетические зависимости расщепления миРНК-21 в условиях однооборотной реакции. 5'-[³²P]-миРНК-21 (1 мкМ) инкубировали с конъюгатами (20 мкМ) при 37 °C в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НС1 (рН 7.0), 200 мМ КСl, 1 мМ EDTA, в течение 72 ч. (**Б**) Схематичное изображение комплексов миРНК-21/2'OMe-конъюгат. Стрелки указывают на сайты расщепления миРНК-21 2'OMe-

конъюгатами в условиях однооборотной реакции. (**B**) Радиоавтограф 18%-ного денатурирующего ПААГ и кинетические зависимости расщепления миРНК-21 в условиях многооборотной реакции. 5'-[³²P]-миРНК-21 (10 мкМ) инкубировали с конъюгатами (5 мкМ) при 37 °C в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl (pH 7.0), 200 мМ KCl, 1 мМ EDTA, в течение 72 ч. (**Г**) Схематичное изображение комплексов миРНК-21/2'OMe-конъюгат. Стрелки указывают на сайты расщепления миРНК-21 2'OMe-конъюгатами в условиях многооборотной реакции. Дорожки T1 и Im – частичное расщепление 5'-[³²P]-миРНК-21 РНКазой T1 и в 2 М имидазоле, соответственно.

Полная дезоксирибонуклеотидного адресующей области замена остова В олигонуклеотида на 2'ОМе-модифицированный фрагмент вызывает значительное снижение рибонуклеазной активности конъюгата. Так, полностью модифицированный конъюгат 2'ОМемиРНКаза (1) расщепляет миРНК-21 на 5% и 22% через 2 и 8 ч, соответственно, а суммарная эффективность деградации РНК не превышает 81% даже после 72 ч инкубации (Рисунок 21 А). Для сравнения, немодифицированный конъюгат 5'-h-6/14 расщепляет миРНК субстрат на 47% и 66% за 2 и 8 ч, соответственно, а после 48 ч наблюдается количественное расщепление миРНК-21 (Рисунок 21 А). Отсутствие модификаций олигонуклеотида в области присоединения пептида в структуре конъюгата 2'ОМе-миРНКаза (2), наоборот, способствует увеличению эффективности расщепления миРНК мишени. Данный конъюгат расщепляет миРНК-21 на 60% и 89% через 2 и 8 ч инкубации, соответственно, а полное расщепление миРНК-мишени наблюдается уже через 24 ч. Так же как и конъюгат 5'-h-6/14, 2'ОМемодифицированные иРНКазы расщепляют миРНК-21 преимущественно по G-X связям (где X = A, U, C), в частности, по G₁₅A₁₆, G₁₈U₁₉ и G₂₀A₂₂ (Рисунок 21 А и Б).

Выявлено, что **2'OMe-5'-h-6/14** (**2**) расщепляет миРНК-21 со скоростью до трех раз выше по сравнению с немодифицированным конъюгатом **5'-h-6/14**, о чем свидетельствуют значения k_{eff} , равные 43,1±11,8 и 11,9±4,9 ×10⁻⁶c⁻¹, для **2'OMe-миРНКаза** (**2**) и **5'-h-6/14** соответственно, а также $\tau_{1/2}$ расщепления миРНК-21 конъюгатами, равные 4.9±0.1 и 16.2±0.2 ч, соответственно (Таблица 8). В свою очередь k_{eff} полностью модифицированного конъюгата **2'OMe-миРНКаза** (**1**) составляет 2,6±2,0×10⁻⁶ с⁻¹, что в 4 раза ниже по сравнению с немодифицированным аналогом (Таблица 8). Период полурасщепления миРНК для конъюгата **2'OMe-2'OMe-миРНКаза** (**1**) не был определён, так как суммарная эффективность расщепления миРНК составляет менее 100%.

В условиях двукратного избытка миРНК-21 относительно конъюгата, полная модификация адресующей области олигонуклеотида, как и в случае однооборотной реакции, значительно снижает активность миРНКазы. Так, для конъюгата **2'ОМе-миРНКаза (1)** суммарное расщепление миРНК-21 составляет 37% через 8 ч инкубации (Рисунок 21 В). **2'ОМе-миРНКаза (2)** расщепляет миРНК значительно более эффективно: за 8 ч инкубации наблюдается 63%-ное расщепление миРНК-21 (Рисунок 21 В). Первичными сайтами расщепления миРНК-21 2'ОМе рибонуклеазами также являются G-X связи. Также наблюдается вторичное расщепление первичных продуктов реакции по некоторым Руг-A сайтам – U₆A₇ и C₉A₁₀ (Рисунок 21 В и Г).

Для сравнения, немодифицирированный конъюгат **5'-h-6/14** за это же время расщепляет лишь 46.5% миРНК субстрата. После 24 ч скорости расщепления миРНК-21 **2'OMeмиРНКазой (2)** и **5'-h-6/14** становятся сравнимыми, эффективность расщепления достигает плато и составляет 77% и 79%, соответственно, через 72 ч инкубации (Рисунок 21 В).

Таким образом, полное 2'ОМетилирование олигонуклеотидной компоненты конъюгатов в области, комплементарной миРНК, снижает эффективность расщепления миРНК-21 в 2 раза по сравнению с немодифицированными конъюгатом. Частично модифицированная 2'ОМемиРНКаза (2), напротив, характеризуется увеличенной скоростью расщепления миРНКмишени по сравнению с 5'-h-6/14.

Оценка активности разработанных конъюгатов показала, что частично модифицированный конъюгат **2'ОМе-миРНКаза** (2) обладает сходной или более высокой рибонуклеазной активностью по сравнению с другими имеющимися на сегодняшний день искусственными рибонуклеазами. В частности, сходную эффективность расщепления демонстрирует конъюгат 14-звенного PNA олигонуклеотида и ДЭТА, направленный к миРНК-1323, который разрушает целевую миРНК на 90% за 24 ч [27]. В свою очередь, миРНК-1323-направленный конъюгат той же структуры, содержащий в качестве каталитического домена пептид [His(Gly)₂]•Сu, расщепляет миРНК лишь на 47% за то же время [27]. Вдобавок, для данного конъюгата необходимо присутствие в системе аскорбиновой кислоты, которая восстанавливает ион Cu²⁺ в структуре конъюгата для следующего акта катализа оксидативного расщепления субстрата [27].

Сравнение **2'ОМе-миРНКазы** (**2**) с иРНКазой на основе трис(2-аминобензимидазола) и 15звенного PNA олигонуклеотида показало, что в первые часы инкубации конъюгаты проявляют схожую рибонуклеазную активность: 50%-ное расщепление субстрата этими иРНКазами достигается через 1.7 и 3.5 ч, соответственно [29,30]. Однако, по скорости и суммарной эффективности расщепления **2'ОМе-миРНКаза** (**2**) превосходит PNA-конъюгат, для котрого 100%-ное расщепление PHK-мишени не достигается даже через 100 ч инкубации, тогда как **2'ОМе-миРНКаза** (**2**) полностью расщепляет миРНК-21 через 24 ч.

Существенным преимуществом разработанных 2'ОМе-конъюгатов является их способность расщеплять РНК субстрат в каталитическом режиме. Ни одна из разработанных ранее миРНКнаправленных искусственных модифицированных рибонуклеаз не была способна расщеплять мишень в каталитическом режиме вследствие слишком прочного связывания конъюгатов с мишенями, которое препятствует диссоциации продуктов реакции из комплекса с конъюгатом.

3.1.2.4. Исследование нуклеазоустойчивости миРНК-направленных 2'ОМе-иРНКаз в ростовой среде и в сыворотке крови мышей

Для исследования влияния модификаций на устойчивость соединений к действию сывороточных нуклеаз 2'ОМе-конъюгаты инкубировали в среде, содержащей 50%-ную БЭС, и в сыворотке крови мышей – условиях, наиболее близко моделирующих агрессивную физиологическую среду. Для сравнения в тех же условиях инкубировали исходный конъюгат **5'-h-6/14**, а также ДНК и 2'ОМе-олигонуклеотиды (*5'-h-6/14* и *2'OMe-5'-h-6/14*, соответственно), представляющие собой адресующие домены конъюгатов без присоединенного пептида (Рисунок 22).



Рисунок 22. Стабильность ДНК- и 2'ОМе-олигонуклеотидов и олигонуклеотид-пептидных конъюгатов в 50%-ной БЭС и сыворотке крови мышей. (А) Фотографии 15%-ных денатурирующих ПААГ. Окрашивание stains-All. (Б) Кинетическая зависимость деградации

олигонуклеотидов и олигонуклеотид-пептидных конъюгатов в 50%-ной БЭС и сыворотке крови мышей. Олигонуклеотиды и олигонуклеотид-пептидные конъюгаты инкубировали в 50%-ной БЭС или сыворотке крови мышей при 37 °С в течение 48 ч.

Стабильность олигонуклеотидов и конъюгатов достоверно не отличалась как в среде с 50%-ной БЭС, так и в сыворотке крови мышей (Рисунок 22). Оценка $\tau_{1/2}$ показала, что стабильность **2'OMe-миРНКазы** (1) и соответствующего олигонуклеотида *2'OMe-5'-h-6/14* составляет 4.14 ± 1.81 ч и 4.36 ± 1.44 ч в 50%-ной БЭС, и 4.87±1.64 ч и 6±1.39 ч в сыворотке крови, соответственно (Рисунок 22). Кроме того, выявлено, что введение 2'OMe-модификаций не приводит к увеличению стабильности соединений. Нуклеазоустойчивость 2'OMe- и ДНК конъюгатов в среде, содержащей 50%-ную БЭС, и в сыворотке крови мышей достоверно не отличаются: $\tau_{1/2}$ составляет 4.14 ± 1.81 ч и 6 ± 0.35 ч в 50%-ной БЭС, и 4.87 ± 1.64 ч и 6.76 ± 1.42 ч в сыворотке для **2'OMe-миРНКазы (1)** и конъюгата **5'-h-6/14**, соответственно (Рисунок 22).

Следует отметить, что введение 2'ОМе-модификаций способствует изменению паттернов деградации соединений в 50%-ной БЭС: как видно из Рисунка 22 А, сайты расщепления олигонуклеотидов 5'-h-6/14 и 2'OMe-5'-h-6/14, а также конъюгатов 5'-h-6/14 и 2'OMe-миРНКазы (1) отличаются. Полученные данные можно объяснить различиями в чувствительности ДНК- и 2'OMe-аналогов к действию эндо- и экзонуклеаз, присутствующих в этой среде.

Таким образом, введение 2'ОМе-модификаций в состав олигонуклеотид-пептидных конъюгатов не приводит к увеличению их стабильности, как в среде с 50%-ной БЭС, так и в сыворотке крови мышей. Вероятнее всего, разработанная структура конъюгата уже является достаточно стабильной в физиологических условиях, и введение 2'ОМе-модификаций не приводит к дополнительному выигрышу в их нуклеазоустойчивости. Отсутствие различий в стабильности 2'ОМе- и ДНК-иРНКаз, может быть, также следствием крайне агрессивных условий 50%-ной БЭС и сыворотки крови мышей, в которых и концентрация нуклеаз, и скорость деградации соединений – крайне высокие.

3.1.2.5 Исследование биологической активности миРНК-направленных 2'ОМеиРНКаз на культуре клеток эпидермоидной карциномы человека КВ-8-5

Высокая эффективность расщепления миРНК-21 под действием модифицированных конъюгатов *in vitro* явилась основанием для исследования их биологической активности в культуре опухолевых клеток. Антипролиферативное и анти-миграционное действие 2'OMe-конъюгатов исследовали с использованием высокорезистентной к химиопрепаратам линии клеток эпидермоидной карциномы человека KB-8-5, для которой ранее был выявлен высокий

уровень экспрессии миРНК-21. В качестве контрольного конъюгата, использовали конъюгат 5'luc-h-6/14.

Оценка антипролиферативного потенциала 2'ОМе-миРНКаз была проведена методом определения жизнеспособности клеток КВ-8-5 в режиме реального времени с помощью системы xCELLigence. Клетки высаживали на специальные планшеты (E-plates), через 24 ч трансфицировали конъюгатами 5'-luc-h-6/14, 5'-h-6/14, 2'OMe-миРНКазой (1), 2'OMeмиРНКазой (2) и олигонуклеотидом 2'OMe-5'-h-6/14 в концентрации 0.5 мкМ в комплексе с Lipofectamine2000TM, а затем в непрерывном режиме регистрировали рост клеток, который выражали в виде клеточного индекса (CI). Оказалось, что 2'OMe-5'-h-6/14 не оказывает статистически значимого влияния на пролиферацию клеток (Рисунок 23). После трансфекции клеток КВ-8-5 конъюгатом 5'-luc-h-6/14 замедление их роста не превышало 10%. Трансфекция клеток 2'ОМе-миРНКазой (1), 2'ОМе-миРНКазой (2) и конъюгатом 5'-h-6/14 приводит к значительному снижению скорости пролиферации клеток: через 72 ч после трансфекции снижение скорости роста опухолевых клеток составило 58%, 48% и 75% для 2'ОМемиРНКазы (1), 2'ОМе-миРНКазы (2) и 5'-h-6/14, соответственно, по сравнению с 23). контрольными клетками (Рисунок Вероятнее всего. более значительный антипролиферативный эффект, наблюдаемый для конъюгата 5'-h-6/14, связан с тем, что в отличие от 2'ОМе-конъюгатов, ДНК-аналог способен рекрутировать внутриклеточную РНКазу Н, в результате чего в клетке происходит синергическое расщепление миРНК-21 конъюгатом **5'-h-6/14** и РНКазой Н.



Рисунок 23. Пролиферация клеток КВ-8-5 после трансфекции ДНК и 2'ОМе-олигонуклеотидпептидными конъюгатами. Скорость роста клеток КВ-8-5 после трансфекции **5'-luc-h-6/14**, **5'h-6/14, 2'ОМе-миРНКазой (1), 2'ОМе-миРНКазой (2)** и олигонуклеотидом 2'*ОМе-5'-h-6/14* в концентрации 0.5 мкМ в комплексе с Lipofectamine2000TM регистрировали в режиме реального времени с использованием системы анализа клеток xCELLigence.

Влияние конъюгатов на миграционную активность клеток КВ-8-5 было исследовано методом зарастания царапины (scratch assay). Анализ проводили для конъюгата **2'OMe-миРНКаза (2)**, который проявил наибольшую рибонуклеазную активность *in vitro*. Клетки трансфицировали конъюгатами **5'-luc-h-6/14**, **5'-h-6/14**, **2'OMe-миРНКаза (2)** и олигонуклеотидами 5'-h-6/14 и 2'OMe-5'-h-6/14 в концентрации 0.5 мкМ с использованием Lipofectamine2000TM (Рисунок 24).



Рисунок 24. Миграционная активность клеток КВ-8-5 после трансфекции ДНК- и 2'ОМеолигонуклеотидами и олигонуклеотид-пептидными конъюгатами. (А) Фотографии монослоя

клеток KB-8-5 после нанесения царапины (4-кратное увеличение). Контроль – клетки KB-8-5 без обработки; **5'-luc-h-6/14**, **5'-h-6/14** и **2'OMe-миРНКаза** (**2**) – клетки, трансфицированные соответствующими конъюгатами в концентрации 0.5 мкМ в комплексе с Lipofectamine2000^{тм}. Пунктирной линией обозначены границы царапины. (**Б**) Степень зарастания царапины через 72 ч после нанесения царапины.

Из Рисунка 24 видно, что для интактных клеток КВ-8-5 и клеток, обработанных Lipofectamine2000TM, степень зарастания царапины клетками КВ-8-5 через 72 ч составляет 90.2% и 83.4% соответственно (Рисунок 24). Процент зарастания царапины после обработки клеток олигонуклеотидами 5'-h-6/14, 2'OMe-5'-h-6/14 и контрольным конъюгатом 5'-luc-h-6/14 составляет 81.2%, 73.1% и 82%, соответственно, что указывает на то, что данные соединения не вызывают достоверного подавления миграционной активности клеток (Рисунок 24). В свою очередь, 2'OMe-миРНКаза (2) оказывает значительный антимиграционный эффект на опухолевые клетки: через 72 ч зарастание царапины клетками КВ-8-5 составляет лишь 45% (Рисунок 24). Для сравнения, за то же время, степень зарастания царапины клетками, трансфицированными немодифицированным конъюгатом 5'-h-6/14, составляет 62%.

Таким образом, согласно полученным данным, введение 2'ОМе-модификаций в структуру миРНК-направленных олигонуклеотид-пептидных конъюгатов приволит к значительному увеличению их сродства к миРНК-мишени. Полная модификация адресующей компоненты миРНКаз в области связывания с миРНК-мишенью негативно сказывается на рибонуклеазной активности конъюгата, снижая скорость расщепления миРНК-субстрата миРНКазой в 2 раза. Подобное снижение эффективности терапевтических нуклеиновых кислот в результате введения химических модификаций в их структуру наблюдалось и ранее. В частности, известно, что введение даже двух 2'ОМе-модификаций в дуплексы siPHK многократно снижает эффективность их действия, а полная модификация приводит к абсолютной [11,12]. 100%-ная модификация 2'Fпотери активности дезоксиарабинонуклеиновыми основаниями способствует снижению эффективности РНК интерференции более чем на 30 %, а введение незамкнутых нуклеиновых кислот (Unlocked Nucleic Acids) в структуру дуплексов – полностью её блокирует [13,14].

В свою очередь, частичная модификация олигонуклеотидной компоненты конъюгатов в области, комплементарной миРНК, значительно увеличивает эффективность деградации миРНК-мишени как в условиях избытка, так и в условиях недостатка конъюгата относительно миРНК. Важным открытием является то, что введение 2'ОМе-модификации не влияет на способность конъюгатов осуществлять миРНК-опосредованную регуляцию пролиферации и миграции опухолевых клеток.

Вероятнее всего, поскольку 2'ОМе-модификация не распознаётся РНКазой Н, активность модифицированных конъюгатов на культурах клеток существенно снижена за счёт отсутствия синергического действия с РНКазой. Поэтому в целях сохранения и увеличения рибонуклеазной активности, нуклеазоустойчивости и сродства к мишени конструируемых миРНКаз вводимые в их состав химические модификации преимущественно должны обладать РНКаза Н-активирующей способностью. При этом модификации адресующей компоненты миРНКаз в области, комплементарной миРНК-мишени, следует вводить по нуклеазочувствительным сайтам в последовательности, исключая область, прилежащую к точке присоединения пептида.

Полученные данные позволяют сформулировать основные принципы дизайна миРНКиРНКаз, сконструированных на основе олигонуклеотида направленных И пептида [(LeuArg)₂Gly]₂, согласно которым (1) для эффективного связывания с мишенью олигонуклеотидная компонента конъюгатов должна иметь с 3'-конца структуру шпильки и содержать область, комплементарную миРНК, длиной 14 или 16 звеньев; (2)олигонуклеотидная компонента должна быть выполнена на основе немодифицированной ДНК или нести химические модификации, совместимые с активностью РНКазы Н. Модификации следует вводить в область, комплементарную миРНК, за исключением трёх нуклеотидов вблизи точки присоединения пептида; (3) для обеспечения высокой рибонуклеазной активности пептид $[(LeuArg)_2Gly]_2$ должен быть присоединен по 5'-, но не 3'-концу шпилечного адресующего олигонуклеотида. Показано, что конъюгаты, сконструированные согласно указанным принципам, обладают высокой нуклеазоустойчивостью, специфически расщепляют миРНК-21 по связям после остатков гуанина, действуют синергически с РНКазой Н и расшепляют миРНК в каталитическом режиме. Важно отметить, что ранее каталитический режим работы не был выявлен ни для одной миРНК-направленной иРНКазы, и является редкой характеристикой металл-независимых иРНКаз.

В рамках представленной работы впервые в мире проведено исследование потенциала миРНК-направленных конъюгатов на опухолевых клетках. Показано, что высокая эффективность искусственных рибонуклеаз in vitro обеспечивает их терапевтическую активность в опухолевых клетках различного гистогенеза, что проявляется в значительном проапоптотическом, противоинвазивном, антимиграционном и антипролиферативном действии, опосредованном специфическим снижением уровня миРНК-21 в клетках. Важнейшим достижением работы является выявление существенного противоопухолевого эффекта миРНКазы на мышиной модели лимфосаркомы RLS₄₀. Это первые в мире данные, демонстрирующие применение миРНК-направленных иРНКаз in vivo.

Полученные данные, вне сомнения, свидетельствуют о том, что применение сиквенсспецифических миРНКаз можно выделить в новое индивидуальное направление миРНКнаправленной терапии, которое в будущем может зарекомендовать себя в качестве высокоэффективного и перспективного подхода борьбы с онкологическими заболеваниями и другими миРНК-ассоциированными патологиями.

3.2 миРНК-направленные олигонуклеотиды, содержащие N-(метансульфонил)фосфорамидные (µ-) модификации межнуклеотидных связей. Сравнение с фосфотиоатными олигонуклеотидами

постранскрипционного подавления экспрессии генов с Технология помощью антисмысловых олигонуклеотидов была впервые предложена около 40 лет назад [244], и быстро зарекомендовала себя в качестве эффективного терапевтического подхода [245,246]. Исследования биологической активности антисмысловых олигодезоксирибонуклеотидов на линиях клеток и *in vivo* быстро обнаружили необходимость защиты межнуклеотидных фосфодиэфирных связей олигонуклеотидов от расщепления нуклеазами [247]. В связи с этим, исследователями было разработано большое число химических модификаций для улучшения биологических свойств антисмысловых олигонуклеотидов. Первое поколение модифицированных антисмысловых олигонуклеотидов представляли собой фосфотиоатные (PS) аналоги, в которых немостиковый атом кислорода межнуклеотидной фосфодиэфирной связи был заменён на серу [248,249]. Такие модифицированные олигонуклеотиды оказались относительно просты в синтезе [250] и обладали высокой нуклеазоустойчивостью [23]. Значительным преимуществом PS-олигонуклеотидов являлась способность активировать при связывании с РНК-мишенью РНКазу Н, что обеспечивало необратимую деградацию РНКмишеней [251,252]. Вдобавок, фосфотиоаты продемонстрировали высокую терапевтическую активность на линиях опухолевых клеток и in vivo [253], причём эффективность PSолигонуклеотидов определялась их благоприятной фармакокинетикой [254] и способностью проникать в клетки без трансфицирующих агентов [255]. Несмотря на то, что за десятилетия исследований было предложено множество других модификаций, в том числе второго (2'OMe-, 2'MOE-) и третьего поколений (PNA, LNA, N3'-N5'-фосфорамидаты), к настоящему моменту не было разработано ни одной модификации, которая сочетала бы в себе такое количество терапевтически выгодных характеристик, которыми обладают фосфотиоаты [256,257]. В связи с этим, PS-модификация до сих пор остаётся основным типом модификации препаратов на основе нуклеиновых кислот, проходящих клинические испытания или уже получивших одобрение Управления по санитарному надзору за качеством продуктов и медикаментов США (FDA) [258].

Несмотря на множество положительных характеристик, существенным недостатком, ограничивающим коммерческий успех и широкое применение фосфотиоатных антисмысловых олигонуклеотидов в клинике, является их значительная токсичность [25,259–261]. Показано, что токсичность PS-олигонуклеотидов связана с высоким сродством фосфотиоатов к белкам клетки [25,259,262]. Значительный токсический эффект фосфотиоатов описан и на уровне организма. Так, следствием введения препарата Мипомерсен (ISIS 301012, Isis Pharmaceuticals), который является 20-звенным фосфотиоатным олигонуклеотидом, адресованным к мРНК аполипопротеина В-100, в количестве 200 мг/кг, было развитие простудо-подобных симптомов, увеличение уровня АЛТ и АСТ в сыворотке крови, а также накопление жировых отложений в клетках печени [263-266]. Клинические испытания препарата Аликафорсена (ISIS 2302, Isis Pharmaceuticals), представляющего собой 20-звенный PS-олигонуклеотид, комплементарный мРНК межклеточной молекулы адгезии-1 человека (ICAM-1) [267], показали, что Аликафорсен в дозах 20-100 мг/кг вызывает сильнейшую стимуляцию иммунной системы [268], летаргию, нарушения свёртываемости крови, развитие атрофических процессов в почках [269], а также увеличение уровней АЛТ и АСТ в сыворотке крови, свидетельствующих о деструктивных изменениях в печени [270]. И хотя уменьшение дозы вводимых препаратов приводило к снижению их токсического действия, некоторые нежелательные эффекты наблюдались даже при использовании препаратов в десятикратно сниженных дозах – 2-3 мг/кг.

В настоящее время для уменьшения или предотвращения токсичности полностью модифицированных PS-олигонуклеотидов исследователи создают различные варианты гибридных молекул. Широко распространены олигонуклеотиды гапмерного типа, в стуктуре которых сочетаются несколько доступных на сегодняшний день химических модификаций, обеспечивающих определённые свойства олигонуклеотидного аналога. В качестве основы гапмеров чаще всего используются фосфотиоатные звенья, которые обеспечивают РНКаза Нактивирующие свойства конструкции, а в качестве модификаций сахарофосфатного остова применяются такие группы, как *О*-метоксиэтильная (МОЕ), замкнутая этильная (cEt), пептидил нуклеиновые кислоты (PNA) или замкнутые нуклеиновые кислоты (LNA), обеспечивающие формирование прочного комплекса с РНК мишенью [248]. Однако, создание миксмеров существенно затрудняет процесс синтеза и увеличивает стоимость антисмысловых олигонуклеотидов.

Таким образом, несмотря на значительный прогресс в области разработки химически модифицированных аналогов антисмысловых олигонуклеотидов, получение новых производных, сочетающих в себе максимальное количество терапевтически благоприятных характеристик, таких как прочное и специфическое связывание с РНК-мишенью, высокая
нуклеазоустойчивость, способность активировать РНКазу Н, низкая токсичность и высокая биологическая активность представляет собой важнейшую исследовательскую задачу.

3.2.1 Дизайн миРНК-направленных µ-олигонуклеотидов

Нелавно В ИХБФМ CO PAH Д.А. Стеценко N-К.Х.Н. была разработана (метансульфонил)фосфорамидная (мезильная или µ-) модификация межнуклеотидных связей, в которой немостиковый атом кислорода фосфодиэфирной связи был заменен на азот с присоединённой к нему метансульфонильной группой (Рисунок 25 А). В данной работе были мезильных исследованы биологические свойства новых олигонуклеотидов (uолигонуклеотидов), в структуре которых все фосфодиэфирные связи были заменены на N-(метансульфонил)фосфорамидные. µ-олигонуклеотиды были полностью комплементарны зрелым миРНК-мишеням, в качестве которых были выбраны высокоонкогенные миРНК-21, миРНК-17 и миРНК-155. Модифицированные миРНК-направленные олигонуклеотиды µмиРНК-21-ON, µ-миРНК-17-ON и µ-миРНК-155-ON, длиной 22, 23 и 24 н, соответственно, были синтезированы в ЛХНК ИХБФМ СО РАН под руководством к.х.н. Д.А. Стеценко. Для выяснения характеристик µ-олигонуклеотидов для сравнения были также синтезированы олигодезоксирибонуклеотиды и фосфотиоатные олигонуклеотиды, комплементарные миРНК-21 (РО-миРНК-21-ОN и PS-миРНК-21-ON, соответственно) (Рисунок 25, Таблица 3). В качестве контроля использовали олигонуклеотиды длиной 22 н., комплементарные фрагменту гена люциферазы (µ-luc-ON, PS-luc-ON и PO-luc-ON) или олигонуклеотиды, имеющие случайную последовательность (µ-Scr-ON и PS-Scr-ON) (Таблица 3).

3.2.2 Исследование гибридизационных свойств µ-олигонуклеотидов

Исследование гибридизационных свойств µ-олигонуклеотидов проводили методом задержки в геле. 5'-[³²P]-миРНК-21 (1 мкМ) инкубировали с олигонуклеотидом (0.1 – 10 мкМ) при 37 °C в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl (pH 7.0), 200 мМ KCl, 1 мМ EDTA, в течение 1 ч, а затем наносили на нативный 15%-ный ПААГ (Рисунок 25 Б). Немодифицированный и фосфотиоатный олигонуклеотиды той же последовательности использовали для сравнения.

Оказалось, что µ-миРНК-21-ОN эффективно связывается с РНК-мишенью, причём его гибридизационные свойства сопоставимы с гибридизационными свойствами немодифицированного олигонуклеотида РО-миРНК-21-ОN: эффективность связывания с миРНК-21 достигает 100% при эквимолярной концентрации (Рисунок 25 Б). Фосфотиоатный олигонуклеотид связывается с миРНК-21 значительно хуже. При эквимолярной концентрации степень гибридизации PS-миРНК-21-ON с миРНК-21 составляет лишь 45% и даже в концентрации олигонуклеотида 10 мкМ не превышает 85% (Рисунок 25 Б). Более слабая гибридизация PS-олигонуклеотидов по сравнению с PO-аналогом согласуется с ранее

полученными данными, свидетельствующими о том, что эффективность связывания полностью модифицированных PS-олигонуклеотидов с мишенью снижается за счёт искажения конформации дуплексов с PHK [271].



Рисунок 25. Структура модификаций, гибридизационные свойства и расщепление миРНК-21 в гетеродуплексе с μ -миРНК-21-ON, PS-миРНК-21-ON или РО-миРНК-21-ON под действием РНКазы Н. (А) Структура РО-, PS-, и μ -межнуклеотидных связей. (Б) Гибридизация олигонуклеотидов с 5'-[³²P]-миРНК-21. Радиоавтографы 15%-ных нативных ПААГ и концентрационная зависимость связывания μ -миРНК-21-ON, PS-миРНК-21-ON и РО-миРНК-21-ON с миРНК-21. 5'-[³²P]-миРНК-21 (1 мкМ) инкубировали с олигонуклеотидами (0.1 – 10 мкМ) при 37 °C в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСІ (рН 7.0), 200 мМ КСІ, 1 мМ ЕDTA, в течение 1 ч. К – миРНК-21 инкубировали в отсутствие конъюгатов. После окончания реакции образцы были нанесены на идущий гель-электрофорез с интервалом в 1 мин. (В) Радиоавтограф

18%-ного денатурирующего ПААГ, демонстрирующий разделение продуктов расщепления миРНК-21 под действием РНКазы Н в гетеродуплексах с μ -миРНК-21-ОN, PS-миРНК-21-ОN и PO-миРНК-21-ON. Дуплексы миРНК-21 (1 мкМ) инкубировали с олигонуклеотидами (1 мкМ) при 37 °C в буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl (pH 7.8), 40 мМ KCl, 8 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT, в течение 30 мин в присутствии РНКазы Н в концентрации 85 ед.акт./мл. Дорожки Im и T1 – частичное расщепление 5'-[³²P]-миРНК-21 РНКазой T1 и в 2 М имидазоле, соответственно. Контроль – РНК инкубировали в отсутствие олигонуклеотидов и в присутствии РНКазы Н. (Г) Кинетические кривые расщепления миРНК-21 под действием РНКазы Н в гетеродуплексах с μ -миРНК-21-ON, PS-миРНК-21-ON и PO-миРНК-21-ON.

3.2.3 Исследование РНКаза Н-активирующей способности µ-олигонуклеотидов

Одной из важнейших характеристик, которая обеспечивает высокую терапевтическую эффективность антисмысловых олигонуклеотидов является наличие РНКаза Н-активирующей способности. Многие модификации сахарофосфатного остова не обладают таковой. В частности, дуплексы РНК с полностью модифицированными 2'-OMe, 2'-MOE, PNA или LNA олигонуклеотидами не являются субстратами РНКазы Н [272]. В противоположность, химические модификации межнуклеотидных связей в ряде случаев не препятствуют распознаванию РНК РНКазой Н в составе гетеродуплекса. Так, показано, что боранофосфатная или 2'-фтор-дезоксиарабиновая модификации олигонуклеотидов не препятствуют активации РНКазы Н [272,273], однако, лишь РЅ-модификация олигонуклеотидов обеспечивает необходимую эффективность расщепления РНК-мишеней под действием РНКазы Н. По этой причине, большой интерес представляло исследование РНКаза Н-активирующей способности µ-олигонуклеотидов.

Формирование дуплексов 5'-[³²P]-миРНК-21 и олигонуклеотидов μ-миРНК-21-ON, PSмиРНК-21-ON или PO-миРНК-21-ON проводили в концентрации 1 мкМ при соотношении 1:1 и затем инкубировали в присутствии РНКазы Н (85 ед.акт./мл) при 37 °C, 30 мин (Рисунок 25 В и Г).

Анализ результатов показал, что степень расщепления миРНК-21 в комплексе с РО-миРНК-21-ON составляет 33% через 30 с, 62% через 3 мин, а полное расщепление миРНК происходит только после 10 мин инкубации (Рисунок 25 В). Расщепление миРНК-21 в комплексе с РSмиРНК-21-ON составляет 39% через 30 с, 81% через 3 мин, а 100% расщепление достигается через 7 мин инкубации (Рисунок 25 В). Расщепление миРНК в комплексе с µ-миРНК-21-ON происходит с ещё более высокой эффективностью: уже через 30 с инкубации степень расщепления миРНК-21 достигает 70%, а по истечении 3 мин эффективность расщепления достигает 100% (Рисунок 25 В).

Скорость расщепления миРНК-21 РНКазой Н в гетеродуплексе с µ-олигонуклеотидом более, чем в 3 раза превосходит скорость расщепления в комплексах с РО- и PS- олигонуклеотидами, о чём свидетельствуют значения эффективных констант скорости

расщепления: $k_{eff} = 28.3 \pm 2.2$, 8.7 ± 0.6 и $6.4 \pm 0.6 \times 10^{-6} c^{-1}$ для µ-миРНК-21-ON, PS-миРНК-21-ON и PO-миРНК-21-ON, соответственно. Таким образом, гетеродуплексы µ-олигонуклеотид/РНК являются субстратом РНКазы H, и расщепление миРНК под действием РНКазы H протекает со значительно большей скоростью, чем для PO- и PS-олигонуклеотидов. На текущий момент только олигонуклеотиды, содержащие 5'-O-метилфосфонатные модификации продемонстрировали схожие РНКаза H-активирующие свойства [257], однако данная модификация пока не получила широкого применения в качестве прототипа терапевтического препарата.

3.2.4 Исследование нуклеазоустойчивости µ-олигонуклеотидов в ростовой среде

При конструировании аналогов антисмысловых олигонуклеотидов важной задачей является повышение нуклеазоустойчивости, необходимой увеличения ИХ для терапевтического эффекта. Исследование стабильности продолжительности μолигонуклеотидов в сравнении с фосфотиоатными аналогами проводили в ростовой среде, содержащей 10%-ную БЭС (Рисунок 26). Оказалось, что в этих условиях µ-миРНК-21-ОN проявляет крайне высокую нуклеазоустойчивость и остаётся интактным в течение всего времени эксперимента – 168 ч. В этих же условиях лишь 42% фосфотиоатного олигонуклеотида остаются интактными.



Рисунок 26. Стабильность µ- и PS-олигонуклеотидов в среде с 10%-ной сывороткой. Фотография 12%-ного денатурирующего ПААГ и кинетическая зависимость деградации олигонуклеотидов в среде с 10%-ной БЭС. Окрашивание геля stains-All. Олигонуклеотиды инкубировали в среде с 10%-ной БЭС при 37 °C в течение 168 ч.

Сравнение полученных данных ранее опубликованными результатами с свидетельствуют о том, что введение µ-модификации обеспечивает чрезвычайно высокую нуклеазоустойчивость олигонуклеотидам. Так, например, олигонуклеотиды, модифицированные 2'ОМе-группами, остаются интактными в среде с 10%-ной БЭС не более 2 ч [122]. Введение 2'-фтор-D-арабинонуклеотидов в стуктуру ДНК аптамеров приводит к увеличению времени полужизни аналогов до 9.5 ч [122]. В зависимости от длины и состава, гапмерные олигонуклеотиды, содержащие чередующиеся ДНК и LNA звенья, демонстрируют $\tau_{1/2}$, равные 15–17 ч [274]. Фосфотиоатная модификация является одной из наиболее устойчивых среди всех разработанных на сегодняшний день модификаций [122]. По нашим данным $\tau_{1/2}$ PS-олигонуклеотида составляет приблизительно 96 ч, что указывает на крайне высокую стабильность аналога. Несмотря на это, PS-аналоги всё же значительно уступают по нуклеазоустойчивости μ -олигонуклеотидам.

Таким образом, *in vitro* исследования свойств мезильных олигонуклеотидов выявили, что:

(1) µ-миРНК-21-ОN эффективно связываются с РНК-мишенью; по гибридизационным свойствам µ-олигонуклеотиды сопоставимы с природным РО-аналогом, и значительно превосходят гибридизационные свойства PS-олигонуклеотидов;

(2) гетеродуплекс мезильного олигонуклеотида с РНК-мишенью является субстратом РНКазы Н, характеризуется приблизительно вдвое более высокой скоростью расщепления миРНК, по сравнению с гетеродуплексами, образованными PS- и PO-олигонуклеотидами;

(3) μ-олигонуклеотиды проявляют крайне высокую нуклеазоустойчивость в среде с 10%-ной БЭС; μ-олигонуклеотиды остаются интактными в этих условиях более 168 ч.

3.2.5 Исследование биологической активности µ-олигонуклеотидов на культуре клеток меланомы В16 мыши

3.2.5.1 Влияние µ-олигонуклеотидов на уровень миРНК в опухолевых клетках: концентрационные и кинетические параметры подавления онкогенных миРНК

Для определения биологической активности мезильных олигонуклеотидов была проведена оценка эффективности подавления миРНК-21 в клетках меланомы В16. Изменение уровня миРНК-21 после трансфекции клеток миРНК-21-направленными или контрольными олигонуклеотидами с помощью Lipofectamine2000TM оценивали методом stem-loop ПЦР. Для определения концентрационных параметров подавления миРНК-21 µ-миРНК-21-ОN и РОмиРНК-21-ОN использовали в концентрации 0.1 – 1 мкМ, а PS-аналоги в концентрации до 0.2 мкМ. поскольку применение этого типа олигонуклеотидов вызывало сильную неспецифическую цитотоксичность. Кинетические параметры ингибирования миРНК-21 в течение 144 Ч. Ингибирующее действие миРНК-21-специфических оценивали олигонуклеотидов оценивали относительно эффекта контрольных олигонуклеотидов PO-luc-ON, PS-luc-ON и µ-luc-ON. Результаты приведены на Рисунке 27.

Контрольные олигонуклеотиды PO-luc-ON, PS-luc-ON и µ-luc-ON не оказывали достоверно значимого снижения уровня миРНК-21 в клетках во всём диапазоне концентраций. PO-миРНК-21-ON вызывал 10 и 15%-ное снижение уровня миРНК-21 при концентрациях 0.1 и



0.5 мкМ, соответственно, и 30%-ное снижение – при увеличении концентрации до 1 мкМ через 24 ч после трансфекции.

Рисунок 27. Уровень онкогенных миРНК-21, миРНК-17 и миРНК-155 в клетках меланомы B16 после трансфекции µ-, РО- и РS-олигонуклеотидами. (А) Степень подавления миРНК-21, миРНК-17 и миРНК-155 под действием µ-, РО- и РS-олигонуклеотидов в зависимости от

концентрации олигонуклеотидов через 24 ч после трансфекции. (Б) Кинетика подавления миРНК-21 специфическими µ- и PS-олигонуклеотидами. (В), (Д) и (Ж) уровень миРНК-21, миРНК-155 и миРНК-17 в клетках В16 через 48 ч после трансфекции µ-миРНК-21-ON, µ-миРНК-17-ON и µ-миРНК-155-ON, соответственно. Кинетика подавления (Г) миРНК-155 и (Е) миРНК-17 специфическими µ-олигонуклеотидами. Контроль (черная кривая) и LF (серая кривая) – интактные клетки В16 и клетки, инкубированные с Lipofectamine2000TM, соответственно; µ-миРНК-21-ON (красная кривая), µ-миРНК-155-ON (фиолетовая кривая) и µ-миРНК-17-ON (темно-синяя кривая) – клетки В16, трансфицированные µ-олигонуклеотдами, направленными к миРНК-21, миРНК-155 и миРНК-17, соответственно; PS-миРНК-21-ON (оранжевая кривая) – клетки В16, трансфицированные миРНК-21-направленным PS-олигонуклеотидом; µ-Scr-ON (зелёная кривая) и PS-Scr-ON (светло-голубая) – клетки, трансфицированные контрольными µ- или PS-олигонуклеотидами, соответственно. Уровень миРНК нормализовали на уровень малой ядерной РНК U6.

Ингибирующий эффект PS-миPHK-21-ON детектировался в диапазоне концентраций 0.05 – 0.2 мкМ, при котором степень подавления миPHK-21 составляла 25% (Рисунок 27 А). Эти результаты согласуются с литературными данными, свидетельствующими о том, что PO- и PS-олигонуклеотиды слабо подавляют миPHK-мишени в клетках в силу недостаточно высокой нуклеазоустойчивости немодифицированных PO-олигонуклеотидов и низкой аффиности к мишеням фосфотиоатов [275,276]. µ-миPHK-21-ON значительно эффективнее снижал уровень миPHK-21, чем PO-и PS-аналоги. Результаты ПЦР показали дозо-зависимое снижение уровня миPHK-21 в клетках B16, которое составило 34% при концентрации µ-миPHK-21-ON 0.05 мкМ, а при увеличении его концентрации до 0.1 мкМ достигало 60% (Рисунок 27 А). Схожей эффективностью обладали и мезильные олигонуклеотиды, направленные к онкогенным миPHK-17 и миPHK-155: наиболее эффективное подавление миPHK-мишеней в клетках B16 олигонуклеотидами µ-миPHK-17-ON и µ-миPHK-155-ON, как и в случае миPHK-21, наблюдалось при концентрации олигонуклеотидов 0.05 – 0.1 мкМ и в среднем составляет 50% (Рисунок 27 А).

Исследование кинетики изменения уровня миРНК-21 в опухолевых клетках показало, что после однократного введения длительность эффекта µ-миРНК-21-ОN составляла более чем 144 ч, т.к. уровень миРНК-21 оставался сниженным в течение всего времени наблюдения. При этом, максимум подавления, наблюдался через 72 ч после трансфекции и составлял 75%, (Рисунок 27 Б). Схожая кинетика изменения уровня миРНК-мишеней наблюдалась и для олигонуклеотидов µ-миРНК-17-ON и µ-миРНК-155-ON, направленных к миРНК-17 и миРНК-155, соответственно, ингибирующий эффект которых также продолжался более 144 ч и достигал максимума ингибирования 80-90% через 72 ч (Рисунок 27 Г и Е). В свою очередь, ингибирующий эффект PS-миРНК-21-ON составлял не более 50% через 48 ч и полностью нивелировался через 72 ч после трансфекции (Рисунок 27 Б).

Стоит отметить, что мезильные олигонуклеотиды µ-миРНК-21-ON, µ-миРНК-17-ON и µмиРНК-155-ON способствовали подавлению только комплементарных им миРНК мишеней, не оказывая перекрёстного влияния на уровень других миРНК, что указывает на высокую специфичность их действия (Рисунок 27 В, Д, Ж). Таким образом, выявлено, что замена в последовательности олигонуклеотида всех межнуклеотидных связей на мезильные обеспечивает более эффективное и продолжительное ингибирующее действие таких олигонуклеотидов по сравнению с фосфотиоатными аналогами.

3.2.5.2 Влияние µ-олигонуклеотидов на пролиферативный потенциал опухолевых клеток

Оценка антипролиферативного потенциала миРНК-21-направленных олигонуклеотидов была проведена на клетках меланомы B16 с помощью системы xCELLigence (Рисунок 28 А и Б). Как видно из представленных на Рисунке 28 данных, трансфекция клеток µ-миРНК-21-ОN в концентрации 100 нМ значительно подавляет пролиферацию опухолевых клеток (Рисунок 28 А). Через 72 ч после трансфекции наблюдается специфическое замедление роста опухолевых клеток, которое составляет 55% по сравнению с интактными клетками и 20% по сравнению с олигонуклеотидом µ-luc-ON (Рисунок 28 А). К 115 ч инкубации антипролиферативный эффект и-миРНК-21-ОN возрастает до 32% по сравнению с и-luc-ON. В то же время, PS-миРНК-21-ON вызывает 65%-ное подавление пролиферации клеток по сравнению с контролем и только 19%ное по сравнению с контрольным олигонуклеотидом PS-luc-ON (Рисунок 28 A). Основываясь на данных об эффективности подавления миРНК-21 в опухолевых клетках под действием PSмиРНК-21-ON, которое составляет лишь 25%, можно предположить, что значительное подавление пролиферации клеток пол действием **PS-олгионуклеотида** вызвано неспецифической цитотоксичностью данного олигонуклеотида.

Исследование пролиферации клеток под действием олигонуклеотидов в концентрации 200 нМ показало, что специфическое антипролиферативное действие µ-миРНК-21-ON сохраняется: разница между эффектами µ-миРНК-21-ON и µ-luc-ON, как и в случае 100 нМ концентрации олигонуклеотидов, составляет 30%, и степень подавления роста опухолевых клеток относительно контроля насчитывает 63% и 34%, соответственно (Рисунок 28 Б). Для PSолигонуклеотидов оказалось, что при концентрации 200 нМ как специфический олигонуклеотид PS-миРНК-21-ON, так и контрольный PS-luc-ON вызывают сходное снижение пролиферативной активности клеток, которое составляет 80% по сравнению с интактным контролем, причем PS-миРНК-21-ON и PS-luc-ON не отличаются друг от друга по эффективности действия. Полученные данные указывают на то, что при концентрации 200 нМ специфический эффект PS-миPHK-21-ON полностью элиминируется, что ещё раз подтверждает высокую токсичность фосфотиоатной модификации (Рисунок 28 Б).

3.2.5.3 Исследование индукции апоптоза в опухолевых клетках под действием µолигонуклеотидов

Анализ про-апоптотического действия миРНК-21-направленных µ-олигонуклеотидов проводили через 48 ч после трансфекции клеток меланомы В16 µ- и PS-олигонуклеотидами в концентрации 100 нМ путём окрашивания клеток Annexin V-FITC и PI с последующей цитофлуориметрией. Результаты приведены на Рисунке 28 В и Г.



Рисунок. 28. Антипролиферативное и про-апоптотическое действие µ- и PS-олигонуклеотидов в клетках меланомы B16. Оценка влияния µ- и PS-олигонуклеотидов в концентрации 100 нМ (А) и 200 нМ (Б) на пролиферативную активность клеток B16 в режиме реального времени. (В) Апоптотические профили клеток B16 после трансфекции µ- и PS-олигонуклеотидами в концентрации 100 нМ. Цитофлуориметрический анализ клеток B16, окрашенных Annexin V-FITC/PI через 48 ч после трансфекции олигонуклеотидами. Q1, популяция живых клеток; Q2, Annexin V-FITC+/PI-, ранний апоптоз; Q3, Annexin V-FITC+/PI+, поздний апоптоз; Q4, Annexin

V-FITC-/PI+, некроз. (Γ) Процент клеток меланомы B16 в состоянии апоптоза (ранний и поздний апоптоз) через 48 ч после трансфекции μ- и PS-олигонуклеотидов в концентрации 100 нМ. Данные представлены как среднее ± ст. отклонение от трёх независимых экспериментов.

Выявлено, что µ-миРНК-21-ОN способствует индукции апоптоза в клетках меланомы В16: через 48 ч после трансфекции процент апоптотических клеток возрастает до 17%, что в три раза выше по сравнению с интактными клетками, клетками, инкубированными с Lipofectamine2000TM или контрольным µ-luc-ON, для которых это значение составляет в среднем 5-7% (Рисунок 28 В и Г). При трансфекции клеток PS-luc-ON и PS-миPHK-21-ON наблюдается более существенное приблизительно до 25% увеличение количества апоптотических клеток, однако, PS-luc-ON и PS-миPHK-21-ON статистически значимо между собой не различаются. Эти данные свидетельствуют о том, что высокая про-апоптотическая активность PS-олигонуклеотидов, вероятнее всего, связана со значительной неспецифической цитотоксичностью данного типа аналогов олигонуклеотидов (Рисунок 28 В и Г).

3.2.5.4 Влияние µ-олигонуклеотидов на миграционные свойства опухолевых клеток

Исследование способности миРНК-21-направленных µ-олигонуклеотидов подавлять миграционную активность клеток В16 проводили методом «зарастания царапины» (scratchтест). Для этого клетки трансфицировали олигонуклеотидами в комплексе с Lipofectamine2000TM, через 24 ч после трансфекции на монослой клеток наносили царапины и проводили фотосъёмку клеток с помощью микроскопа каждые 24 ч в течение 3-х суток.

Как видно из представленных данных, µ-миРНК-21-ОN многократно снижает скорость миграции клеток меланомы: степень зарастания царапины составляла не более 1% через 24 ч, 3% через 48 ч и 5% через 72 ч инкубации (Рисунок 29). Это свидетельствует о замедлении миграции опухолевых клеток в 19 раз по сравнению с контролем и в 6 раз по сравнению с контрольным олигонуклеотидом µ-luc-ON, для которого степень зарастания царапины составила 10%, 21% и 30% через 24, 48 и 72 ч, соответственно (Рисунок 29). Ингибирование миграции клеток меланомы под действием µ-олигонуклеотидов значительно превышало эффект PS-миРНК-21-ON, для которого было показано, что процент зарастания царапины составлял 12% через 24 ч, 18% через 48 ч и 21% через 72 ч, что в 5 раз ниже по сравнению с контролем и в два раза ниже по сравнению с контрольным PS-luc-ON (Рисунок 29).

Таким образом, выявлено, что миРНК-21-направленные µ-олигонуклеотиды длительно и эффективно снижают уровень миРНК-21 в опухолевых клетках, обеспечивая подавление процессов канцерогенеза. Сравнение с имеющимися в литературе данными о миРНК-21направленных модифицированных олигонуклеотидах, показало, что µ-олигонуклеотиды обладают схожим или более высоким биологическим потенциалом. Так, анти-пролиферативное действие анти-миРНК-21 µ-олигонуклеотидов сравнимо по эффективности с действием антимиРНК-21 LNA и 2'-OMe аналогов [72,141]. Помимо антипролиферативного действия, µолигонуклеотиды оказывают мощный антимиграционный эффект, который в 4 раза превышает эффективность PS-аналогов и почти в 7 раз превосходит действие коммерческих ингибиторов миРНК-21, для которых характерно 2-3-кратное снижение скорости миграции опухолевых клеток [243]. Кроме того, µ-олигонуклеотиды оказывают в клетках существенный проапоптотический эффект, который сопоставим по эффективности с действием анти-миРНК-21 LNA и 2'OMe-олигонуклеотидов [72].



Рисунок 29. Миграционная активность клеток меланомы B16 после трансфекции µ- и PSолигонуклеотидами. (А) Фотографии, отражающие степень зарастания царапины через 24, 48 и

72 ч инкубации клеток B16 с μ- или PS-олигонуклеотидами (4×увеличение). Контроль – интактные клеки меланомы B16. Пунктирными линиями обозначены границы царапин. (**Б**) Степень зарастания царапин через 24, 48 и 72 ч.

Стоит отметить, что влияние µ-олигонуклеотидов на процессы канцерогенеза реализуется за счёт специфического подавления миРНК-21 и отсутствия влияния на другие онкогенные миРНК в клетках, в частности миРНК-17 и миРНК-155. В свою очередь, эффекты PS-олигонуклеотидов связаны с общей высокой неспецифической цитотоксичностью фосфотиоатной модификации [263–266,268–270].

3.2.5.5 Исследование биораспределения µ-олигонуклеотидов у мышейопухоленосителей

Для исследования биораспределения и определения фармакокинетических параметров миРНК-направленных олигонуклеотидов мышам линии SCID с ксенографтом опухоли эпидермоидной карциномы KB-8-5 человека перитюморально и внутривенно вводили 40 мкг µ-или PS-олигонуклеотидов, меченных флуорофором Cy5.5. В качестве доставляющего агента использовали фолат-содержащие катионные липосомы F, которые, согласно ранее полученным данным, эффективно доставляют siPHK в опухоль KB-8-5, характеризующуюся высоким уровнем представленности фолатных рецепторов на поверхности клеток [277]. Анализ биораспределения олигонуклеотидов был проведён совместно с Д.В. Гладких (ЛБНК, ИХБФМ СО РАН).

Анализ показал, что при перитюморальном введении µ- и PS-олигонуклеотиды накапливаются в основном в почках и опухолевой ткани (Рисунок 30). Через 4 ч после инъекции содержание µ- и PS-олигонуклеотидов в почках составило 71% и 36%, соответственно, от общего количества препарата в организме, а в опухолевой ткани 23% и 63%, соответственно (Рисунок 30 Б). К 24 ч выведение µ-олигонуклеотида замедлилось и его относительное содержание в опухоли увечилось до 48% (Рисунок 30 Б). В свою очередь, содержание PS-олигонуклеотида в опухолевой ткани к 24 ч снизилось до 48% в силу более активного накопления в почках. Согласно данным флуоресцентной визуализации внутренних органов мышей, PS-олигонуклеотиды остаются заякоренными в области введения, тогда как µ-олигонуклеотиды распределяются по организму, обеспечивая эффективное накопление в опухолевой ткани (Рисунок 30 А).

После внутривенного введения основная доля обоих модифицированных олигонуклеотидов была локализована в почках и печени животных. Содержание µ- и PS- олигонуклеотидов в почках через 24 ч составило 90% и 77%, соответственно (Рисунок 30 А и Б). За это же время в печени аккумулировалось 16% PS-олигонуклеотидов. При внутривенном

введении накопление олигонуклеотидов в опухолевой ткани было низким: через 24 ч после инъекции относительное содержание обоих олигонуклеотидов в опухоли не превышало 2% (Рисунок 30 А и Б). Согласно полученным данным, перитюморальное введение было выбрано для исследования противоопухолевого потенциала µ-олигонуклеотидов *in vivo*.



Рисунок 30. Биораспределение Су5.5-меченных µ- и PS-олигонуклеотидов в мышахопухоленосителях линии SCID. (А) Визуализация флуоресценции мышей-опухоленосителей линии SCID и их органов через 4 и 24 ч после перитюморального (pt) и внутривенного (iv) введения модифицированных олигонуклеотидов в дозе 40 мкг/мышь. Контроль – мышь без инъекции. (Б) Биораспределение модифицированных олигонуклеотидов во внутренних органах и опухоли в процентах через 4 и 24 ч после перитюморального (pt) и внутривенного (iv) введения. 3.2.6 Исследование биологической активности µ-олигонуклеотидов *in vivo* на модели эпидермоидной карциномы человека KB-8-5

3.2.6.1 Влияние µ-олигонуклеотидов на скорость роста опухоли КВ-8-5 у мышей

Исследование противоопухолевого потенциала миРНК-21-направленных µолигонуклеотидов проводили на мышах линии SCID с ксенографтом опухоли эпидермоидной карциномы KB-8-5 человека. Для этого клетки KB-8-5 подкожно трансплантировали животным и через 12 дней, когда опухоли начинали пальпироваться, мышам проводили перитуморальные инъекции мезильных или фосфотиоатных олигонуклеотидов в комплексе с фолат-содержащими катионными липосомами F в дозе 10 мкг/мышь. Инъекции проводили каждые три дня, основываясь на данных о стабильности олигонуклеотидов в сыворотке и кинетике подавления миРНК в опухолевых клетках. Всего было проведено 4 инъекции. В контрольных группах мышам вводили культуральную среду Opti-MEM, липосомы F без олигонуклеотидов и контрольные µ- и PS-олигонуклеотиды в комплексе с липосомами F (Рисунок 31 А).



Рисунок 31. Противоопухолевый эффект µ- и PS-олигонуклеотидов. (А) Схема *in vivo* эксперимента, включающая подкожную трансплантацию клеток эпидермоидной карциномы KB-8-5 человека мышам линии SCID и перитюморальные инъекции µ-миPHK-21-ON, PS-миPHK-21-ON или контрольных µ-Scr-ON и PS-Scr-ON олигонуклеотидов (10 мкг/мышь) в комплексе с фолат-содержащими катионными липосомами F. Инъекции выполняли на 12, 16,

20 и 24 день после трансплантации опухолевых клеток. (Б) Кинетика роста опухоли КВ-8-5 после введения μ - и PS-олигонуклеотидов. Дни инъекций помечены стрелками. (В) Время удвоения размера опухолевого узла КВ-8-5 после введения олигонуклеотидов. Статистически достоверные отличия от всех групп помечены красным цветом и звездочкой. (Г) Вес опухоли на 30 день эксперимента. Данные статистически проанализированы с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и апостериорного критерия Тьюки; значение *p*-value отражает статистически достоверные отличия.

Анализ кинетики опухолевого роста показал, что на 30-ый день после трансплантации опухоли введение PS-миPHK-21-ON вызывало лишь 2-кратное торможение роста опухоли, что достоверно не отличается от действия контрольного олигонуклеотида PS-Scr-ON (Рисунок 31 Б). В то же время, введение µ-миPHK-21-ON способствовало значительному подавлению роста опухоли: объем опухоли в этой группе животных был в 8 раз меньше по сравнению с контролем, в 5 раз меньше по сравнению с фосфотиоатным аналогом и в 4 раза меньше по сравнению с сравнению с контрольным олигонуклеотидом µ-Scr-ON (Рисунок 31 Б).

Введение µ-миРНК-21-ОN приводило к увеличению времени удвоения объёма опухоли до 10 дней, что в среднем в 2 раза выше, чем в других группах, для которых время удвоения объёма опухоли составляло от 4 до 5 суток (Рисунок 31 В).

Сравнение веса опухоли показало, что средний вес опухоли в группе после терапии µмиРНК-21-ОN в 12 раз меньше по сравнению с контролем и в 6 раз меньше по сравнению с контрольным олигонуклеотидом µ-Scr-ON (Рисунок 31 Г). В свою очередь, вес опухоли в группе, получавшей инъекции PS-миРНК-21-ON, только в 2 раза меньше по сравнению с контролем без достоверных отличий от PS-Scr-ON (Рисунок 31 Г).

3.2.6.2 Определение уровня миРНК-21 и её белков-мишеней в опухолевой ткани после терапии µ-олигонуклеотидами

Для подтверждения специфичности противоопухолевого эффекта µ-миРНК-21-ON было проведено исследование уровня миРНК-21 и её прямых белковых мишеней РТЕN и PDCD4 в опухолевой ткани после проведённой терапии олигонуклеотидами. Было показано, что эффект контрольного олигонуклеотида µ-Scr-ON на уровень миРНК-21 не превышает 10% и достоверно не отличается от контроля (Рисунок 32 А).

В группе мышей, получавших µ-миРНК-21-ON, уровень миРНК-21 был снижен на 50% по сравнению с контролем. В отличие от этого, в группе мышей, получавших PS-миРНК-21-ON, уровень целевой миРНК был снижен лишь на 25% без статистически значимого отличия от контрольного PS-олигонуклеотида (Рисунок 32 А). Важно отметить, что подавление миРНК-21 под действием µ-миРНК-21-ON в опухолевой ткани было специфичным, статистически значимого снижения в опухолевой ткани уровня других миРНК, таких как миРНК-155 и миРНК-17, выявлено не было (Рисунок 32 Б).



Рисунок 32. Уровень миРНК и белков РТЕN и PDCD4 в клетках эпидермоидной карциномы KB-8-5 человека после введения μ - и PS-олигонуклеотидов. (**A**) Уровень миРНК-21 в опухолевой ткани после терапии μ - и PS-олигонуклеотидами. (**Б**) Уровень миРНК-21, миРНК-155 и миРНК-17 в опухолевой ткани после терапии μ -миРНК-21-ОN. Уровень миРНК был измерен методом stem-loop ПЦР и нормирован на уровень малой ядерной РНК U6. (**B**) и (**Г**) Уровень белков супрессоров опухоли РТЕN и PDCD4, соответственно, в опухолевой ткани после терапии μ - и PS-олигонуклеотидами. (**Б**) уровень болт гибридизации. Уровень белков супрессоров опухоли РТЕN и PDCD4, соответственно, в опухолевой ткани после терапии μ - и PS-олигонуклеотидами, определённый методом Вестерн блот гибридизации. Уровни белков нормировали на уровень белка домашнего хозяйства GAPDH. 1 – контроль; 2 – фолат-содержащие катионные липосомы F; 3 – μ -миРНК-21-ON; 4 – μ -Scr-ON; 5 – PS-миРНК-21-ON; 6 – Ps-Scr-ON. Анализ данных был проведён с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и апостериорного критерия Тьюки; Значение *p*-value отражает статистически значимые отличия.

Исследование уровня белков-мишеней миРНК-21 РТЕN и PDCD4 показало, что их уровень в опухоли значительно повышался после терапии µ-миРНК-21-ON по сравнению с контролем: в 1.5 раза для PDCD4 и в 3.5 раза для РТЕN. В то же время, µ-Scr-ON, PS-миРНК-21-ON и PS-Scr-ON не оказывали статистически значимого влияния на уровни этих белков в опухолевой ткани (Рисунок 32 В и Г).

Из полученных данных можно заключить, что противоопухолевый эффект µ-миРНК-21-ОN реализуется за счёт снижения в опухолевой ткани уровня протоонкогенной миРНК-21 и восстановления экспрессии её белков-мишеней, в частности, онкосупрессоров PDCD4 и PTEN. Такие изменения способствуют реорганизации сигнальных путей в опухолевых клетках, подавляя развитие патологических процессов и вызывая торможение роста опухоли.

3.2.7 Гистологический анализ опухолей КВ-8-5 после терапии µ-олигонуклеотидами

В рамках данной работы был проведен гистологический анализ опухолей KB-8-5 после введения μ- и PS-олигонуклеотидов. Морфометрический анализ органов и опухолей животных, а также биохимический анализ крови был выполнен к.м.н. Сеньковой А.В. (ЛБНК, ИХБФМ СО РАН).

Гистологическое исследование опухолей КВ-8-5 показало, что опухолевые ткани представлены полиморфными эпидермальными клетками с ацидофильной цитоплазмой, крупными ядрами с 2-3 гиперхромическими ядрышками и высокой скоростью митоза (Рисунок 33). Некротические изменения и воспалительная инфильтрация, представленная в основном, лимфоцитами и малым числом нейтрофилов и макрофагов, локализованных на границе неизменённой опухолевой ткани и некрозов, были обнаружены в опухолях всех исследуемых групп (Таблица 10). Стоит отметить, что в группе, получившей лечение µ-миРНК-21-ON, области некроза и воспаления были гораздо меньше, чем в других группах (Таблица 10). Меньший размер опухолевого узла в этой группе и более низкий уровень питания и васкуляризации могло иметь существеное влияние на эти параметры.

В рамках исследования свойств миРНК-направленных олигонуклеотидов, содержащих μ -модификацию, был проведен морфометрический анализ митотической активности и апоптоза клеток опухолевой ткани путём определения численной плотности митозов после окрашивания тонких срезов опухоли гематокислином и эозином и количества каспаза-3 положительных клеток в тонких срезах опухоли, обработанных моноклональными антителами к каспазе-3. Гистологический анализ показал, что в группе, получившей лечение μ -миРНК-21-ON, численная плотность митозов составляет 1.4±0.1, что отражает снижение митотической активности клеток в 4 и 2 раза по сравнению с контролем и μ -Scr-ON, для которых число митозов составило 5.4±0.3 и 2.26±0.2, соответственно (Рисунок 33 A и Б, Таблица 10). Между группами, получавшими инъекции PS-миРНК-21-ON и PS-Scr-ON достоверных отличий выявлено не было, и численная плотность митозов составила 3±0.2 и 3.3±0.2, соответственно, что в 2 раза выше, по сравнению с μ -миРНК-21-ON (Рисунок 33 A и Б, Таблица 10).

Морфометрический анализ каспаза-3 иммуногистохимии показал, что в контрольной группе без лечения, опухолевая ткань характеризуется малым числом клеток в состоянии апоптоза (Рисунок 33 В и Г). В свою очередь, в группе животных, которым проводили инъекции µ-миРНК-21-ОN наблюдалось увеличение каспаза-3-положительных клеток в 12.8 раз по сравнению с контролем (Рисунок 33 Г). Несмотря на то, что введение олигонуклеотидов вне зависимости от специфичности и типа модификации стимулирует переход клеток в состояние апоптоза, в группе, которой вводили µ-миРНК-21-ON среднее число апоптотических клеток было в 1.5 раза выше по сравнению с другими олигонуклеотидами, что отражает специфическую миРНК-21-опосредованную гибель клеток опухоли (Рисунок 33 Г).



Рисунок 33. Митотическая и апоптотическая активность в опухолевой ткани КВ-8-5 после лечения µ-миРНК-21-ОN и PS-миРНК-21-ON. (А) Типичные изображения тонких срезов опухолей после окраски гематоксилином и эозином. Митотические события обозначены

стрелками (×400 увеличение). Шкала соответствует масштабу 50 мкм. (**Б**) Морфометрический анализ опухолевых тканей с подсчётом клеток в состоянии митоза. (**B**) Типичные изображения тонких срезов опухолей после иммуногистохимического окрашивания моноклональными антителами к каспазе-3. Примеры каспаза-3-положительных клеток отмечены стрелками (×400 увеличение). (**Г**) Морфометрический анализ опухолевой ткани с подсчётом клеток в состоянии апоптоза. Nv × 400. Nv – численная плотность, соответствующая числу частиц на единицу объёма опухоли. Анализ данных был проведён с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и апостериорного критерия Тьюки; Значение *p*-value отражает статистически значимые отличия.

Таблица 10. Морфометрический анализ опухолевой ткани мышей, получавших лечение µ-и PS-олигонуклеотидами

Морфологические параметры	Контроль (KB-8-5)	F	μ-миРНК-21	µ-Scr	РЅ-миРНК-21	PS-Scr
Нормальная ткань, Vv, %	31.9±4.8	40.3±5.8	53.3±3.3*	46±4.1	47.4±6.5	43.9±4.2
Лимфоидная инфильтрация, Vv,	30.4±2.7	27.2±3.7	16.8±2.3*	17.9±2.7*	18.9±4.3	17.7±2.8 [*]
Некроз, Vv, %	37.6±6	32.4±4.5	29.5±2.8	36±3.8	33.5±3.7	38.3±3.2
Суммарные деструктивные изменения, Vv, %	68±4.8	59.6±5.8	46.3±3.4 [*]	53.9±4.4	52.5±7	56±4.2
Митозы, Nv	5.4±0.3	4.5±0.2	1.4±0.1 ^{*, ‡, †, ‡}	2.26±0.2*	3±0.2 ^{*, ‡}	3.3±0.2 ^{*, ‡}

Объёмная плотность (Vv) – объёмная доля ткани, занятая данным компартментом. Численная плотность (Nv) – количество морфологических структур в единице тестового поля. Vv, % ×100. Nv ×400. Анализ данных был проведён с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и апостериорного критерия Тьюки. ^{*, ‡, †, ‡} статистически значимые отличия от контроля, F, PS-миPHK-21-ON и PS-Scr-ON, соответственно (p < 0.05).

3.2.8 Оценка токсичности µ-олигонуклеотидов

Неспецифическую токсичность µ-олигонуклеотидов оценивали путём морфометрического анализа деструктивных изменений печени и почек животныхопухоленосителей, а также посредством биохимического анализа крови.

Показано, что развитие опухоли KB-8-5 само по себе оказывает существенный токсический эффект на печень животных-опухоленосителей, что выражается в деструктивных изменениях тканей печени, таких как дистрофия и некроз, достигающих 35% всей паренхимы органа. Показано, что введение µ- и PS-олигонуклеотидов не оказывает дополнительных деструктивных эффектов на печень животных. Более того, введение µ-миPHK-21-ON и PS-миPHK-21-ON способствует существенному снижению процента деструктивных изменений паренхимы печени, что свидетельствует о терапевтическом эффекте препаратов (Таблица 11).

Морфологические параметры печени	Здоровые мыши	Контроль (KB-8-5)	F	µ- миРНК- 21	µ-Scr	РЅ-миРНК-21	PS-Scr
Нормальная ткань, Vv, %	80.1±0.3	64.8±1.7 [#]	69.9±2.3	69.2±1.7	65.5±1.7 [#]	70.6±2.4	66.7±1.8 [#]
Дистрофия, Vv, %	9.9±1.3	10.8±0.9	9.8±0.9	11.4±0.5	11.6±0.9	9.9±0.8	10.7±0.9
Некроз, Vv, %	9.9±0.4	24.3±1.4 [#]	20.1±1.5 [#]	19.4±1.7	22.8±1.6 [#]	19.4±1.9	22.5±1.6 [#]
Суммарные деструктивные изменения, Vv, %	19.8±0.9	35.1±1.7	29.9±2.3	30.7±1.7 [#]	34.4±1.7	29.3±2.4 ^{#,*,‡,‡,}	33.1±1.8
Бинуклеарные гепатоциты, Nv	6.9±0.9	8.5±0.8	7.5±1.4	7±0.8	6±0.7	6.9±0.6	5.8±0.6

Таблица 11. Морфометрический анализ ткани печени мышей после терапии µ- и PSолигонуклеотидами

Объёмная плотность (Vv) – объёмная доля ткани, занятая данным компартментом. Численная плотность (Nv) – количество морфологических структур в единице тестового поля. Vv, % ×100. Nv ×400. Анализ данных был проведён с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и апостериорного критерия Тьюки. ^{#, *, ‡, \$} статистически значимые отличия от здоровых мышей, контроля, F, μ -Scr-ON и PS-Scr-ON, соответственно (p < 0.05).

Морфометрический анализ почек показал, что развитие опухоли вызывало снижение нормальной ткани органа на 25% (Таблица 12). Введение µ-олигонуклеотидов не оказывало дополнительного токсического влияния на ткани почек, и процент дистрофии эпителия проксимальных канальцев в этой группе составил не более 24% (Таблица 12). В свою очередь, в группе, получавшей инъекции PS-олигонуклеотидов, было обнаружено увеличение деструктивных изменений в почках до 27% (Таблица 12).

Таблица	12.	Морфометрический	анализ	ткани	почек	мышей	после	терапии	μ-	И	PS-
олигонукл	іеоти	дами									

Морфологические параметры печени	Здоровые мыши	Контроль (KB-8-5)	F	μ- миРНК- 21	µ-Scr	РS-миРНК-21	PS-Scr
Нормальная ткань, Vv, %	89±1.8	75.3±0.9 [#]	75.9±0.9 [#]	76.2±0.6 [#]	75.1±0.8 [#]	74.5±1 [#]	73.2±1 [#]
Дистрофия, Vv, %	10.9±1.8	17.4±1 [#]	16.7±0.7 [#]	17.3±0.8 [#]	19.5±0.8 [#]	20±0.7 ^{#, *, †} , †	21.6±0.8 ^{#, *, ‡,} †
Некроз, Vv, %	2.3±0.2	6.9±0.8 [#]	7.3±0.3 [#]	6.3±0.4 [#]	5.3±0.4	6.3±0.6 [#]	5.1±0.5
Суммарные деструктивные изменения, Vv, %	13.2±1.6	24.3±1 [#]	23.9±0.9 [#]	23.6±0.6 [#]	24.8±0.8 [#]	25.3±1 [#]	26.7±1 [#]

Объёмная плотность (Vv) – объёмная доля ткани, занятая данным компартментом. Анализ данных был проведён с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и апостериорного критерия Тьюки. ^{#, *, †, †} статистически значимые отличия от здоровых мышей, контроля, F и μ -миPHK-21-ON, соответственно (p < 0.05).

Биохимический анализ крови показал, что µ- и PS-олигонуклеотиды не оказывают токсического влияния на печень и почки мышей. Статистически значимых изменений уровня таких показателей в крови, как АЛТ, щелочная фосфатаза, общий белок, креатинин и азот мочевины у всех исследуемых групп, включая здоровых мышей, выявлено не было.

Таким образом, проведено исследование биологических характеристик миРНКнаправленных олигонуклеотидов, содержащих ранее не изученную N-(метансульфонил)фосфорамидную модификацию межнуклеотидных связей в сравнении с широко применяемыми фосфотиоатными аналогами. Основные свойства модифицированных олигонуклеотидов суммированы в Таблице 13.

Выявлено, что введение µ-модификации в состав олигонуклеотидов обеспечивает значительную нуклеазоустойчивость, высокие гибридизационные свойства и РНКаза-Н активирующую способность, а также низкую токсичность, многократно превосходящие свойства PS-олигонуклеотидов.

Сбалансированность биологических свойств µ-олигонуклеотидов напрямую отражается на времени их функционирования и эффективности ингибирующего действия в клетках. Специфическое снижение уровня миРНК-мишеней под действием µ-олигонуклеотидов длится не менее 6 дней, а эффективность подавления миРНК составляет 80-95%. Для сравнения, PSаналоги оказывают только двукратное снижение уровня миРНК, и продолжительность ингибирующего эффекта не превышает 48 ч. Следствием эффективного подавления активности онкогенной миРНК-мишени под действием µ-олигонуклеотидов является многократное снижение скорости пролиферации и миграции опухолевых клеток, а также переход значительного процента клеток в состояние апоптоза.

Исследование терапевтического потенциала миРНК-21-направленного µолигонуклеотида *in vivo* показало, что данный олигонуклеотид обеспечивает 90%-ное торможение опухолевого роста уже на третьи сутки после первой инъекции, и ингибирующий эффект при последующих введениях сохраняется до 30 дней. Противоопухолевое действие µолигонуклеотида ассоциировано со значительным снижением митотической активности клеток опухоли и их переходом в состояние апоптоза (Таблица 13). Установлено, что наблюдаемый противоопухолевый эффекти имеет специфический характер, что подтверждается сохранением снижения уровня миРНК-21 и увеличения экспрессии регулируемых ею белков мишеней РТЕN и PDCD4 в ткани опухоли даже через неделю после последней инъекции миРНК-21направленного µ-олигонуклеотида. При введении миРНК-21-направленного PSолигонуклеотида такого продолжительного специфического эффекта не наблюдалось. Кроме того, введение модифицированных олигонуклеотидов не оказывает токсического действия на внутренние органы животных-опухоленосителей и даже способствует снижению общих деструктивных изменений в тканях печени.

In vitro								
Биол	огические свойства	N-(метансульфонил)- фосфорамидный	Фосфотиоатный олигонуклеотид					
Эффективнос эквимо	ть связывания с миРНК-21 в лярной концентрации	100%	46%					
Стабильн	юсть в 10%-ной БЭС, <i>t</i> _{1/2}	>168 ч	96 ч					
Скорости гетеродуплек	ь расщепления миРНК в се с РНКазой Н, <i>k eff, 10⁻⁶ с⁻¹</i>	28.3±2.2	8.7±0.6					
Эффективн кл	ость подавления миРНК в тетках через 72 ч	75-90%	_					
Продолжител оп	ьность подавления миРНК в ухолевых клетках	>144 ч	<72 ч					
Подавление м	играции опухолевых клеток через 72 ч	в 19 раз	в 5 раз					
In vivo								
Подавление опухолевого роста [#]	Средний объём опухоли	↓ в 8 раз	↓ в 2 раза					
	Средний вес опухоли	↓ в 12 раз	↓ в 2 раза					
	Время удвоения опухоли, сутки	9.9±2.9	4.3±1.2					
	Митозы	↓ в 3.9 раз	↓ в 1.8 раз					
	Количество каспаза-3 положительных клеток	↑ в 12.8 раз	↑ в 8.5 раз					
Эффективн оп	ость подавления миРНК в ухолевой ткани [#]	50%	25%					
Увеличение уровня онкосупрессорных белков в опухолевой ткани [#]		РDCD4 в 1.5 раза РТЕN в 3.5 раза	_					
	Биохимия крови	нет	нет					
Токсичность	Печень	нет	нет					
	Почки	нет	умеренная					

Таблица 13. Сравнение биологических свойств µ-и PS-олигонуклеотидов

[#] Оценка проводилась через 7 дней после последней инъекции олигонуклеотидов. $t_{1/2}$ – время полужизни – период времени, за который деградирует 50% соединения. *k eff* – эффективная константа скорости реакции.

Известно, что PS-олигонуклеотиды в высоких дозах способны проникать в клетки без трансфицирующих агентов [239,263]. В отличие от этого, проникающая способность свободных µ-олигонуклеотидов значительно ниже. В данной работе при исследовании противоопухолевой активности на мышах для создания единых условий доставку обоих олигомеров проводили в комплексе с фолат-содержащими липосомами. Анализ первичной фармакокинетики показал, что µ-олигонуклеотиды в составе катионных липосом быстро распределяются по организму мышей и с высокой эффективностью накапливаются в опухолевой ткани. В свою очередь, фосфотиоатные олигонуклеотиды в тех же условиях характеризуются заякориванием в области инъекции и более низкой скоростью проникновения в опухолевую ткань.

Таким образом, разработанные µ-олигонуклеотиды сочетают в себе ряд ключевых биологических свойств, обеспечивающих эффективную инактивацию миРНК-мишени в клетках, без необходимости введения дополнительных модификаций для увеличения терапевтического эффекта. Иными словами, µ-модификация может быть успешно использована как для создания эффективных моно-модифицированных антисмысловых олигонуклеотидов, так и в качестве альтернативы PS-олигонуклеотидам для разработки гапмерных конструкций в сочетании с другими модификациями, не обладающими РНКаза Н-активирующей способностью. Кроме того, мезильные группы могут быть использованы не только для конструирования антисмысловых олигонуклеотидов, но и в других целях, например, для частичной модификации синтетических гидовых РНК, входящих в состав CRISPR/Cas9 систем, для улучшения эффективности и специфичности редактирования генома.

Заключение

В настоящий момент в области молекулярной и клеточной биологии исследователи продолжают активный поиск эффективных средств борьбы с онкологическими заболеваниями. Одним многообещающих ИЗ направлений является разработка антисмысловых олигонуклеотидных конструкций, способных сиквенс-специфически блокировать гиперактивность молекул РНК, ассоциированных с развитием патологий. В качестве мишени для олигонуклеотидных препаратов особую терапевтическую значимость получили короткие регуляторные РНК – миРНК, осуществляющие контроль фундаментальных процессов жизнедеятельности клетки. На данный момент в области разработки миРНК-направленных олигонуклеотидных ингибиторов уже достигнут существенный прогресс, однако, поиск новых соединений, обладающих высоким биологическим потенциалом *in vivo*, всё ещё представляет собой актуальную задачу в наши дни.

В качестве перспективных конструкций для регуляции активности РНК могут выступать таргетно-направленные искусственные рибонуклеазы, катализирующие сиквенс-специфическое расщепление РНК-мишеней. В таких ингибиторах антисмысловые олигонуклеотиды используются в качестве адресной компоненты, распознающей и комплементарно связывающейся с РНК-мишенями, что обеспечивает высокую специфичность и эффективность взаимодействия разрабатываемых препаратов.

В зависимости от структуры каталитического домена разрабатываемые иРНКазы можно разделить на две группы: (1) металл-зависимые и (2) металл-независимые иРНКазы. Первая группа иРНКаз представляет собой конъюгаты, в которых РНК-распознающие элементы соединены с лигандами, координирующими металлы. В качестве лигандов исследователи используют такие химические группы, как макроциклические и тетрааминовые комплексы, терпиридильные производные и неокупроин, координирующие ионы меди, цинка, кобальта, европия и лантаноидов, выступающие в качестве кофакторов в реакциях трансэтерификации и гидролиза РНК [264–266]. Представителями таких металл-зависимых иРНКаз являются конъюгаты 2'ОМе-олигонуклеотида и терпиридинового комплекса меди [267], ДНК олигомера и иминдиацетата, координирующего ион лантанида [268], а также ДНК-олигонуклеотида и терпиридинового комплекса европия [269], для которых показано сиквенс-специфическое расщепление синтетических РНК-мишеней. Существенным преимуществом металл-зависимых конъюгатов является их сравнительно высокая рибонуклеазная активность и способность расщеплять РНК-мишень в каталитическом режиме [270,271], что предполагает быструю диссоциацию конъюгатов из комплекса с мишенью после акта расщепления и последующую атаку новой молекулы РНК. Несмотря на высокую эффективность, применение данных иРНКаз

в биологических системах ограничено из-за присутствия белков, конкурирующих за связывание металла и вызывающих диссоциацию катионов металлов из комплексов с конъюгатами, что делает поведение металл-зависимых иРНКаз в биологических средах малопредсказуемым [264]. В свою очередь, потеря иона металла из координационного центра конъюгата вызывает токсическое повреждение клеток и организма.

В качестве альтернативы металл-зависимым иРНКазам был предложен другой тип конъюгатов – металл-независимые мимики природных рибонуклеаз. Такие иРНКазы имитируют действие природных ферментов, например, РНКазы А, РНКазы Н или стрептококковой нуклеазы, которые осуществляют расщепление РНК мишеней по механизму внутримолекулярной трансэтерификации [32,272,273]. В качестве каталитического домена металл-независимые РНКазы содержат группы, сходные с аминокислотными остатками, формирующими активный центр природных ферментов. Например, мимики стрептококковой нуклеазы имеют в своем составе гуанидиниевые группы, имитирующие боковые радикалы аргининов, а РНКаза А-подобные иРНКазы содержат остатки имидазола, моделирующие действие двух гистидинов активного центра фермента [28,274]. Примером таких иРНКаз является конъюгат 17-звенного олигонуклеотида и бисимидазола, для которого показано сайтнаправленное расщепление фенилаланиновой тРНК дрожжей [275]. В качестве каталитических групп в структуре иРНКаз исследователи нередко используют короткие пептиды. В частности, высокой активностью обладают различные структурные варианты конъюгатов адресующих олигонуклеотидов и пептида [(LeuArg)₂Gly]₂, способные к высокоэффективному сайтнаправленному расщеплению фенилаланиновой тРНК [31,32]. Металл-независимые иРНКазы обладают преимуществом для применения в клетках и организме, поскольку обладают низкой токсичностью и значительно более стабильны в биологической среде. В то же время, их эффект может быть снижен в условиях существенного избытка РНК-мишени из-за отсутствия каталитического режима работы [29,34].

Среди разработанных нуклеаз подавляющее большинство нацелено на деградацию синтетических РНК-субстратов или модельных природных РНК и лишь небольшая доля адресована к биологически значимым мишеням. Так, например, разработаны металл-зависимые конъюгаты 2'-МОЕ-модифицированных олигонуклеотидов и комплекса иона европия, осуществляющие специфическое расщепление транскриптов мРНК серин-треониновой протеинкиназы с-raf-1 человека [238]. Также сконструирована иРНКаза на основе акридин-модифицированной ДНК и лантанид иона (III), катализирующая специфическую деградацию 40-звенного фрагмента гена аполипопротеина Е человека [239]. Опубликовано несколько работ, описывающих сайт-направленное расщепление *in vitro* онкогенных миРНК с помощью иРНКаз

на основе PNA олигонуклеотида и различных каталитических групп, включая ДЭТА, пептид [His(Gly)2]•Си и трис(2-аминобензимидазол) [27,29].

Несмотря на высокую эффективность и перспективность применения иРНКаз, данных об исследовании их активности в эукариотических клетках исчезающе мало. Одним из редких примеров является иРНКаза на основе антисмыслового фосфотиоатного олигонуклеотида и обеспчечивает остатка имидазола, которая сиквенс-специфическое расщепление комплементарной последовательности gag-мРНК вируса иммунодефицита человека HIV-1 и подавляет репликацию этого вируса в клетках МТ-4 [240]. Кроме того показано, что лантанидный макроциклический комплекс Eu(THED)³⁺, присоединённый к антисмысловому олигонуклеотиду, который обеспечивает более значительное подавление экспрессии белка ICAM-1 в эндотелиальных клетках по сравнению с неконъюгированным олигонуклеотидом [241]. В свою очередь данные об использовании миРНК-направленных иРНКаз в культуре клеток ранее опубликованы не были. Также стоит отметить, что в литературе полностью отсутствуют упоминания о применении каких-либо вариантов сиквенс-специфических иРНКаз на опухолевых моделях in vivo.

В рамках данной работы были созданы металл-независимые миРНК-направленные иРНКазы («миРНКазы») – конъюгаты шпилечных олигонуклеотидов, распознающих онкогенную миРНК-21, и каталитического пептида [(LeuArg)₂Gly]₂, осуществляющего расщепление миРНК-мишени в реакции трансэтерификации. Такие искусственные рибонуклеазы количественно связываются с миРНК-мишенью и обеспечивают её расщепление связям после остатков гуанина. Установлено, ЧТО миРНКазы способны ПО К высокоэффективной деградации миРНК-21 в условиях избытка субстрата, демонстрируя каталитический режим работы, что является редким свойством металл-независимых иРНКаз. Важным достоинством разработанных миРНКаз является высокая стабильность к действию сывороточных нуклеаз, которая обеспечивается шпилечной структурой олигонуклеотидного домена и наличием пептида в составе конъюгата.

Существенным открытием данной работы является синергическое действие миРНКаз с внутриклеточной РНКазой Н, осуществляющей расщепление РНК-мишеней в гетеродуплексах ДНК-РНК. Эта особенность может способствовать многократному усилению биологической активности конъюгатов в клетках и, как следствие, существенному подавлению процессов канцерогенеза, что было продемонстрировано на клетках лимфосаркомы RLS₄₀ и меланомы В16 мыши. В частности, показано, что разработанные миРНКазы обеспечивают миРНК-опосредованное 50%-ное подавление инвазии, 40-55%-ное ингибирование миграции, 50-75%-ное снижение пролиферативного потенциала клеток, а также индуцируют апоптоз 28% популяции опухолевых клеток. Биологические эффекты, продемонстрированные

разработанными миРНК-специфическими конъюгатами, сопоставимы или превосходят действие доступных на сегодняшний день ингибиторов миРНК-21. В частности, разработанные конъюгаты проявляют более высокую активность по сравнению с 2'OMe-миРНК-21направленным олигонуклеотидом, обеспечивающим 50%-ное подавление инвазии клеток глиобластомы [72]; олигонуклеотидами, содержащими комбинации фосфотиоатной, 2'F, 2'-МОЕ или cEt модификаций, подавляющими опухолевый рост гепатоцеллюлярной карциномы *ex vivo* на 40-80% в зависимости от типа клеток, имплантированных мышам [242]; коммерческим ингибитором миРНК-21 («Ambion» CША), способствующим 50%-ному подавлению инвазии и индукции апоптоза в 15% популяции клеток эзофагеального рака человека [243], и коммерческим ингибитором миРНК-21 («GenePharma» Китай), способным к 50%-ному подавлению пролиферации, индукции апоптоза в 25% популяции клеток рака поджелудочной железы и 45%-ному подавлению опухолевого роста данной модели *in vivo* [157].

Важным достижением этой работы является обнаружение способности миРНКаз обеспечивать существенное торможение опухолевого роста у мышей. Полученные данные впервые в мире продемонстрировали эффективность и перспективность применения миРНКнаправленных иРНКаз на культуре клеток и опухолевой мышиной модели и, вне сомнения, свидетельствуют о том, что разработанные рибонуклеазы могут стать перспективной альтернативой технологиям, использующим антисмысловые олигонуклеотиды и siPHK.

Второй тип разработанных в данной работе миРНК-направленных ингибиторов представляет собой антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие в своей структуре ранее не изученную N-(метансульфонил)фосфорамидную модификацию межнуклеотидных связей. В истории разработки терапевтических нуклеиновых кислот исследователями было предложено более двух десятков модификаций межнуклеотидных связей, включая различные варианты фосфотиоатов, метилфосфонатов, фосфоамидитов, фосфодитиоатов или производных S-[255,276,277]. метилтиомочевины Среди предложенных модификаций наибольшее распространение для создания олигонуклеотидных препаратов получили фосфотиоаты, сочетающие в себе такие положительные свойства, как повышенная нуклеазоустойчивость, способность рекрутировать РНКазу Н и возможность проникать В клетки без трансфицирующих агентов. Тем не менее, применение фосфотиоатов не лишено существенных недостатков, ограничивающих их применение *in vivo*, к которым относят низкую гибридизационную способность, недостаточную специфичность и высокую токсичность, в связи с чем, поиск новых модификаций не теряет актуальности [25,243,253,278,279]. В данной работе было показано, что несовершенство фосфотиоатов может быть преодолено путём N-(метансульфонил)фосфорамидной введения В структуру олигонуклеотидов новой

модификации. µ-модификация обеспечивает не только значительную нуклеазоустойчивость, многократно превосходящую свойства PS-олигонуклеотидов, но и гарантирует высокие гибридизационные свойства. Одно из главных преимуществ, которое обеспечивает введение µмодификации, заключается в том, что гетеродуплекс мезильных олигонуклеотидов с РНК является субстратом РНКазы Н, и расщепление миРНК в таком гетеродуплексе происходит с более высокой скоростью по сравнению с ДНК и PS-аналогами. Данные биологические параметры мезильных олигонуклеотидов явились основой длительного специфического снижения уровня миРНК-мишени в опухолевых клетках, следствием которого стало снижение скорости пролиферации, уменьшение миграционной активности и индукция апоптоза опухолевых клеток. Существенным результатом проведённого исследования является выяснение противоопухолевого потенциала миРНК-21-направленных µ-олигонуклеотидов in vivo. Показано, что подавление миРНК-21 с помощью мезильных аналогов способствует многократному снижению скорости опухолевого роста у мышей. Причём, наблюдаемый эффект является специфическим и исключает воздействие разработанных µ-олигонуклеотидов на другие миРНК. Проводимая терапия не оказывает токсического воздействия на организм животных и даже способствует снижению деструктивных изменений в печени мышей, возникающих вследствие развития опухоли. Полученные результаты демонстрируют перспективность использования N-(метансульфонил)фосфорамидной модификации как для создания эффективных моно-модифицированных антисмысловых олигонуклеотидов, так и в качестве альтернативы PS-олигонуклеотидам для разработки гапмерных конструкций в сочетании с другими модификациями, не обладающими РНКаза Н-активирующей способностью.

Результаты, полученные в данной работе, безусловно, подтверждают перспективность миРНК-21 в качестве терапевтической мишени противоопухолевой терапии. Известно, что миРНК-21, играет ключевую роль в регуляции большинства клеточных процессов, таких как пролиферация, дифференциация, апоптоз, миграция и ангиогенез [5,280–282]. В следствие этого, направленное подавление патологической гиперактивности миРНК-21 в опухолевой ткани способствует глобальной реорганизации сигнальных путей в клетках и обеспечивает многократное увеличение уровня белков-супрессоров опухоли, таких как РТЕN, PDCD4, RhoB, LATS1, MGMT и TP53, оказывающих мощное противоопухолевое действие за счёт комплексного влияния на процессы карциногенеза [283,284].

Важно отметить, что направленное подавление миРНК-21 может быть также эффективно для борьбы с широким спектром других заболеваний, ассоциированных с высоким уровнем миРНК-21. В частности, ингибирование миРНК-21 может препятствовать развитию болезни Паркинсона за счёт снижения продукции провоспалительных цитокинов IL-6, IL-1β и фактора

некроза опухоли α (TNFα), а также увеличения выживаемости нейронов путём активации биосинтеза белка LAMP2A и нейропротекторных факторов BDNF и GDNF [285,286]. Также, подавление миРНК-21 может тормозить развитие нефропатии при диабете 1-го типа за счёт увеличения активности белка PTEN и блокирования работы сигнального пути Akt/TORC1 [287]. Вдобавок к этому, снижение миРНК-21 у больных диабетом 1-го типа может восстанавливать экспрессию белков RGC1, SEL1L, MTPN и TNFAIP3, участвующих в регуляции роста эпителия поджелудочной железы и глюкозо-стимулированного выброса инсулина [288]. Помимо этого, блокирование активности миРНК-21 может препятствовать развитию фиброза печени, за счёт снижения скорости накопления межклеточного матрикса и восстановления архитектуры тканей печени путём ингибирования сигнального пути TGF-β [289]. Снижения уровня миРНК-21 может также препятствовать развитию язвенного колита, причём введение анти-миРНК-21 препаратов может обеспечить восстановление функций эпителиального барьера пищеварительного тракта путём нормализации уровня белка RhoB прямой мишени миРНК-21, и подавления воспаления за счёт ингибирования сигнальных путей STAT3 и NF-кβ [290]. Ингибирование активности миРНК-21 может быть эффективно и при борьбе с синдромом Альпорта – патологией почек, которая характеризуется протеиноурией, фиброзом почек и нарушением функции митохондрий почечной ткани [291], а также с ишемической болезнью сердца, при которой миРНК-21 снижает стабильность тромбоцитов, что предшествует возникновению инфаркта миокарда [292]. Эти данные, вне сомнения, указывают на то, что снижение уровня миРНК-21 является эффективным способом борьбы с широким спектром заболеваний, а разработанные в рамках диссертации миРНК-21-направленные олигонуклеотидные конструкции могут являться универсальными средствами терапии миРНК-21-ассоциированных патологий.

Сформулированные в данной работе принципы дизайна миРНК-направленных препаратов на основе олигонуклеотидов могут быть использованы при разработке ингибиторов для специфического подавления не только миРНК, но и других типов РНК-мишеней. В частности, мишенями шпилечных иРНКаз могут являться короткие линейные молекулы piwiвзаимодействующих РНК [293]. В свою очередь, мишенями µ-олигонуклеотидов могут быть и другие протяженные РНК-молекулы, обладающие сложной вторичной структурой, такие как длинные некодирующие РНК, кольцевые РНК, а также матричные РНК. В связи с этим, спектр терапевтических РНК-мишеней иРНКаз и µ-олигонуклеотидов оказывается практически неограниченным.

Таким образом, в данной работе разработаны и исследованы биологические свойства двух типов миРНК-направленных препаратов: олигонуклеотид-пептидных конъюгатов и антисмысловых олигонуклеотидов, содержащих новую N-(метансульфонил)фосфорамидную

модификацию межнуклеотидных связей, представляющие собой перспективные кандидаты для создания прототипов лекарственных препаратов для терапии онкологических заболеваний и других миРНК-ассоциированных патологий. Полученные многообещающие результаты являются основанием для постановки целого ряда новых биомедицинских задач для дальнейших исследований. В частности, большой интерес представляет объединение разработанных подходов, а именно, создание и исследование биологических свойств миРНКаз, N-(метансульфонил)фосфорамидную модификацию олигонуклеотидной содержащих компоненты. Кроме того, одной из крайне интересных задач является создание опухолеспецифичных миРНКаз, например, содержащих холестерин или несущих остатки Nацетилгалактозамина Gal(NAc) для решения проблем таргетной доставки препарата в опухолевые ткани. Помимо этого, перспективным направлением исследований представляется создание комбинаций нескольких миРНКаз или µ-олигонуклеотидов, направленных к различным онкогенным миРНК-мишеням, а также использование их сочетаний с химиопрепаратами для увеличения эффективности противоопухолевой терапии.

Выводы

Разработан дизайн и исследована биологическая активность *in vitro* и *in vivo* двух типов миРНК-21-направленных препаратов на основе олигонуклеотидов: олигонуклеотид-пептидных конъюгатов (ОПК) и антисмысловых олигонуклеотидов, несущих на каждом межнуклеотидном атоме фосфора N-(метансульфонил)фосфорамидную группу (µ-олигонуклеотидов).

1. Для эффективного связывания олигодезоксирибонуклеотидов, имеющих структуру шпильки, со зрелой миРНК длина участка, комплементарного ей, должна быть 14-16 нуклеотидов. Присоединение к 5'- или 3'-концу таких олигонуклеотидов пептида [(LeuArg)₂Gly]₂ не препятствует эффективному связыванию олигонуклеотид-пептидных конъюгатов (ОПК) с миРНК-21.

2. ОПК с пептидом [(LeuArg)₂Gly]₂, присоединенным по 5'-концу, но не 3'-концу адресующего олигонуклеотида, осуществляют эффективное расщепление миРНК-21 в условиях однооборотной и многооборотной реакции преимущественно по связям после остатков гуанина, расположенным в области локализации пептида. Скорость расщепления миРНК-21 5'-ОПК многократно возрастает в присутствии РНКазы Н за счёт синергического действия ОПК и фермента.

3. Получены первые в мире миРНК-направленные ОПК, терапевтическая эффективность которых доказана *in vitro* и *in vivo*. Показано, что результатом эффективного и селективного расщепления миРНК-21 под действием 5'-ОПК в клетках является снижение скорости пролиферации, индукция апоптоза и уменьшение инвазивного потенциала клеток лимфосаркомы RLS₄₀ и меланомы B16 мыши *in vitro* и подавление роста опухоли RLS₄₀ *in vivo*.

4. Введение 2'ОМе-модификаций в состав 5'-ОПК шпилечной структуры способствует увеличению эффективности их связывания с миРНК-21. Полная замена дезоксирибонуклеотидов на 2'ОМе-модифицированные в области, комплементарной миРНК-21, снижает рибонуклеазную активность ОПК, тогда как отсутствие модификаций вблизи точки присоединения пептида, способствует увеличению рибонуклеазной активности ОПК по сравнению с немодифицированным конъюгатом той же структуры. Введение 2'ОМе-модификаций не влияет на способность ОПК подавлять пролиферацию и миграцию клеток эпидермоидной карциномы человека КВ-8-5.

5. Гибридизационные свойства N-(метансульфонил)фосфорамидных (μ-) олигонуклеотидов совпадают с гибридизационными свойствами немодифицированных ДНК аналогов и значительно превосходят эффективность связывания фосфотиоатных (PS) олигонуклеотидов. Гетеродуплексы миPHK-21 и μ-олигонуклеотида являются субстратом для PHKaзы H, при этом

расщепление миРНК РНКазой Н происходит со скоростью в три раза выше, чем в гетеродуплексах с PS-олигонуклеотидами. µ-олигонуклеотиды обладают высокой нуклеазоустойчивостью и остаются интактными в среде с 10%-ной FBS в течение не менее 168 ч.

6. миРНК-21-направленные µ-олигонуклеотиды эффективно снижают скорость пролиферации, уменьшают миграционный потенциал и способствуют индукции апоптоза клеток меланомы B16 за счёт эффективного и специфического подавления миРНК-21. µ-олигонуклеотиды снижают скорость роста эпидермоидной карциномы человека KB-8-5 у мышей линии SCID, что является результатом длительного специфического снижения уровня миРНК-21 в опухоли. При перитюморальном введении µ-олигонуклеотиды не оказывают токсического эффекта на организм животных и эффективно накапливаются в опухоли. Полученные данные доказывают высокий терапевтический потенциал и селективность действия миРНК-21-направленных µолигонуклеотидов.

Список литературы

- 1. Mattick J.S., Makunin I.V. Non-coding RNA // Hum Mol Genet. 2006. V. 15. P. 17–29.
- 2. Hutvágner G., Zamore P.D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex // Science. 2002. V. 297. P. 2056–2060.
- 3. Bartel D.P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions // Cell. 2009. V. 136. P. 215–233.
- 4. Salmanidis M. et al. Direct transcriptional regulation by nuclear microRNAs // International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 2014. V. 54. P. 304–311.
- Zhou B. et al. Effect of miR-21 on Apoptosis in Lung Cancer Cell Through Inhibiting the PI3K/ Akt/NF-κB Signaling Pathway in Vitro and in Vivo // Cell. Physiol. Biochem. – 2018. – V. 46.– P. 999–1008.
- Kong W. et al. Upregulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triple-negative breast cancer // Oncogene. – 2014. – V. 33. – P. 679–689.
- 7. Tian X.M. et al. Inhibition of invasion and migration of prostate cancer cells by miRNA-509-5p via targeting MDM2 // Genet. Mol. Res. 2017. V. 16. P. 1–10.
- 8. Ambros V. The functions of animal microRNAs // Nature. 2004. V. 431. P. 350–355.
- 9. Rupaimoole R., Slack F.J. MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases // Nat. Rev. Drug Discov. 2017. V. 16. P. 203–221.
- Singh A., Sen D. MicroRNAs in Parkinson's disease // Experimental Brain Research. 2017. V. 235. – P. 2359–2374.
- 11. Nucera S. et al. miRNA-126 Orchestrates an Oncogenic Program in B Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia // Cancer Cell. 2016. V. 29. P. 905–921.
- 12. O'Bryan S. et al. The roles of oncogenic miRNAs and their therapeutic importance in breast cancer // European Journal of Cancer. 2017. V. 72. P. 1–11.
- Lu J. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers // Nature. 2005. V. 435. P. 834–838.
- 14. Volinia S. et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006. V. 103. P. 2257–2261.
- Michael M.Z. et al. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia // Mol Cancer Res. – 2004. – V. 1. – P. 882–891.
- 16. Michelfelder S., Trepel M. Adeno-Associated Viral Vectors and Their Redirection to Cell-Type Specific Receptors // Advances in Genetics. Adv Genet. 2009. V. 67. P. 29–60.
- Boutla A., Delidakis C., Tabler M. Developmental Defects by Antisense-Mediated Inactivation of micro-RNAs 2 and 13 in Drosophila and the Identification of Putative Target Genes // Nucleic Acids Res. – 2003. – V. 31. – P. 4973–4980.
- 18. Meng L. et al. Small RNA zippers lock miRNA molecules and block miRNA function in mammalian cells // Nat. Commun. 2017. V. 8. P. 1–10.

- 19. Choi W.Y., Giraldez A.J., Schier A.F. Target protectors reveal dampening and balancing of nodal agonist and antagonist by miR-430 // Science. 2007. V. 318. P. 271–274.
- 20. Mignacca L. et al. Sponges against miR-19 and miR-155 reactivate the p53-Socs1 axis in hematopoietic cancers // Cytokine. 2016. V. 82. P. 80–86.
- 21. Mercatelli N. et al. The inhibition of the highly expressed mir-221 and mir-222 impairs the growth of prostate carcinoma xenografts in mice // PLoS One. 2008. V. 3. P. 1–10.
- 22. Stein C.A. et al. Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides // Nucleic Acids Res. 1988. V. 16. P. 3209–3221.
- Campbell J.M., Bacon T.A., Wickstrom E. Oligodeoxynucleoside phosphorothioate stability in subcellular extracts, culture media, sera and cerebrospinal fluid // J. Biochem. Biophys. 1990.
 V. 20. P. 259–267.
- 24. Crooke S.T. et al. Kinetic characteristics of Escherichia coli RNase H1: Cleavage of various antisense oligonucleotide-RNA duplexes // Biochem. J. 1995. V. 312. P. 599–608.
- 25. Shen W. et al. Chemical modification of PS-ASO therapeutics reduces cellular protein-binding and improves the therapeutic index // Nat. Biotechnol. 2019. V. 37. P. 640–650.
- 26. Zamaratski E., Pradeepkumar P.I., Chattopadhyaya J. A critical survey of the structure-function of the antisense oligo/RNA heteroduplex as substrate for RNase H // J Biochem Biophys Methods. 2001. V. 48. P. 189–208.
- 27. Gaglione M. et al. PNA-based artificial nucleases as antisense and anti-miRNA oligonucleotide agents // Mol. Biosyst. 2011. V. 7. P. 2490–2499.
- 28. Gnaccarini C. et al. Site-specific cleavage of RNA by a metal-free artificial nuclease attached to antisense oligonucleotides // J. Am. Chem. Soc. 2006. V. 128. P. 8063–8067.
- 29. Danneberg F. et al. Sequence-specific RNA cleavage by PNA conjugates of the metal-free artificial ribonuclease tris(2-aminobenzimidazole) // Beilstein J. Org. Chem. 2015. V. 11. P. 493–498.
- 30. Zellmann F. et al. Site-specific cleavage of RNAs derived from the PIM1 30-UTR by a metal-free artificial ribonuclease // Molecules. 2019. V. 24. P. 1–11.
- 31. Staroseletz Y. et al. "Dual" peptidyl-oligonucleotide conjugates: Role of conformational flexibility in catalytic cleavage of RNA. // Biomaterials. 2017. V. 112. P. 44–61.
- 32. Williams A. et al. Peptidyl-Oligonucleotide Conjugates Demonstrate Efficient Cleavage of RNA in a Sequence-Specific Manner // Bioconjug. Chem. 2015. V. 26. P. 1129–1143.
- 33. Mironova N.L. et al. G-specific rna-cleaving conjugates of short peptides and oligodeoxyribonucleotides // J. Biomol. Struct. Dyn. 2006. V. 23. P. 591–602.
- Mironova N.L. et al. RNase T1 mimicking artificial ribonuclease. // Nucleic Acids Res. 2007.
 V. 35. P. 2356–2367.
- 35. Lee Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II // EMBO J. 2004. V. 23. P. 4051–4060.
- 36. Daugaard I., Hansen T.B. Biogenesis and Function of Ago-Associated RNAs // Trends in Genetics. 2017. V. 33. P. 208–219.

- Kim V.N., Han J., Siomi M.C. Biogenesis of small RNAs in animals // Nature Reviews Molecular Cell Biology. Nat Rev Mol Cell Biol. – 2009. – V. 10. – P. 126–139.
- 38. Sheu-Gruttadauria J., MacRae I.J. Phase Transitions in the Assembly and Function of Human miRISC // Cell. 2018. V. 173. P. 946-957.e16.
- 39. Sheu-Gruttadauria J. et al. Structural Basis for Target-Directed MicroRNA Degradation // Mol. Cell. 2019. V. 75. P. 1243-1255.e7.
- 40. Ameres S.L. et al. Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs // Science. 2010. V. 328. P. 1534–1539.
- 41. Cazalla D., Steitz J.A. Down-Regulation of a host microRNA by a viral noncoding RNA // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2010. V. 75. P. 321–324.
- Marcinowski L. et al. Degradation of cellular miR-27 by a novel, highly abundant viral transcript is important for efficient virus replication in vivo // PLoS Pathog. 2012. V. 8. P. 1–16.
- 43. Ghini F. et al. Endogenous transcripts control miRNA levels and activity in mammalian cells by target-directed miRNA degradation // Nat. Commun. 2018. V. 9. P. 1–15.
- 44. Bitetti A. et al. MicroRNA degradation by a conserved target RNA regulates animal behavior // Nat. Struct. Mol. Biol. 2018. V. 25. P. 244–251.
- 45. Haas G. et al. Identification of Factors Involved in Target RNA-directed microRNA Degradation // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. P. 2873–2887.
- 46. Warkocki Z. et al. Terminal nucleotidyl transferases (TENTs) in mammalian RNA metabolism // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2018. V. 373. P. 1–16.
- 47. Boele J. et al. PAPD5-mediated 3' adenylation and subsequent degradation of miR-21 is disrupted in proliferative disease // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2014. V. 111. P. 11467–11472.
- 48. la Mata M. et al. Potent degradation of neuronal mi RNA s induced by highly complementary targets // EMBO Rep. 2015. V. 16. P. 500–511.
- 49. Yashiro Y., Tomita K. Function and regulation of human terminal uridylyltransferases // Front. Genet. 2018. V. 9. P. 1–14.
- 50. Chang H.M. et al. A role for the Perlman syndrome exonuclease Dis3l2 in the Lin28-let-7 pathway // Nature. 2013. V. 497. P. 244–248.
- 51. Luan S. et al. Regulation of RNA decay and cellular function by 3'-5' exoribonuclease DIS3L2 // RNA Biology. 2019. V. 16. P. 160–165.
- 52. Heo I. et al. Mono-uridylation of pre-microRNA as a key step in the biogenesis of group II let-7 microRNAs // Cell. 2012. V. 151. P. 521–532.
- 53. Rupaimoole R. et al. MiRNA deregulation in cancer cells and the tumor microenvironment // Cancer Discovery. 2016. V. 6. P. 235–246.
- 54. Tan W. et al. miR-106b-25/miR-17-92 clusters: Polycistrons with oncogenic roles in hepatocellular carcinoma // World J. 2014. V. 20. P. 5962–5972.

- 55. Li H. et al. The miR-17-92 cluster as a potential biomarker for the early diagnosis of gastric cancer: Evidence and literature review // Oncotarget. 2017. V. 8. P. 45060–45071.
- 56. Minami Y. et al. SS18-SSX-regulated miR-17 promotes tumor growth of synovial sarcoma by inhibiting p21WAF1/CIP1. // Cancer Sci.– 2014. V. 105. P. 1152–1159.
- 57. Lian R. et al. MiR-132 plays an oncogenic role in laryngeal squamous cell carcinoma by targeting FOXO1 and activating the PI3K/AKT pathway // Eur. J. Pharmacol. 2016. V. 792. P. 1–6.
- Masoudi M.S., Mehrabian E., Mirzaei H. MiR-21: A key player in glioblastoma pathogenesis // J. Cell. Biochem. – 2018. – V. 119. – P. 1285–1290.
- 59. Zhang P. et al. The correlation between microRNA-221/222 cluster overexpression and malignancy: An updated meta-analysis including 2693 patients // Cancer Manag. Res. – 2018. – V. 10. – P. 3371–3381.
- 60. Fornari F. et al. MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma // Oncogene. 2008. V. 27. P. 5651–5661.
- 61. Zhang Q. et al. MicroRNA-130b targets PTEN to induce resistance to cisplatin in lung cancer cells by activating Wnt/β-catenin pathway // Cell Biochem. 2018. V. 36. P. 194–202.
- 62. Matuszyk J., Klopotowska D. miR-125b lowers sensitivity to apoptosis following mitotic arrest: Implications for breast cancer therapy // Journal of Cellular Physiology. – 2020. – P. 1–10.
- 63. Buscaglia L.E.B., Li Y. Apoptosis and the target genes of microRNA-21. // Chin. J. Cancer. 2011. V. 30. P. 371–380.
- 64. Nip H. et al. Oncogenic microRNA-4534 regulates PTEN pathway in prostate cancer // Oncotarget.– 2016. V. 7. P. 68371–68384.
- 65. Chan J.A., Krichevsky A.M., Kosik K.S. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells // Cancer Res. 2005. V. 65. P. 6029–6033.
- 66. Gao S. et al. MiRNA oligonucleotide and sponge for miRNA-21 inhibition mediated by PEI-PLL in breast cancer therapy // Acta Biomater. – 2015. – V. 25. – P. 184–193.
- 67. Selcuklu S.D., Donoghue M.T.A., Spillane C. miR-21 as a key regulator of oncogenic processes // Biochemical Society Transactions. – 2009. – V. 37. – P. 918–925.
- Asangani I.A. et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer // Oncogene. – 2008. – V. 27. – P. 2128–2136.
- 69. Zhu S. et al. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1) // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 14328–14336.
- Li T. et al. MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2009. – V. 383. – P. 280–285.
- 71. Kang. PUMA is a novel target of miR-221/222 in human epithelial cancers // Int. J. Oncol. 2010. V. 37. P. 1621–1626.
- 72. Dong C.G. et al. Co-inhibition of microRNA-10b and microRNA-21 exerts synergistic inhibition on the proliferation and invasion of human glioma cells // Int. J. Oncol. 2012. V.
41. – P. 1005–1012.

- 73. D'Urso P.I. et al. miR-155 is up-regulated in primary and secondary glioblastoma and promotes tumour growth by inhibiting GABA receptors // Int. J. Oncol. 2012. V. 41. P. 228–234.
- 74. Li S. et al. MicroRNA-155 silencing inhibits proliferation and migration and induces apoptosis by upregulating BACH1 in renal cancer cells // Mol. Med. Rep. 2012. V. 5. P. 949–954.
- 75. O'Donnell K.A. et al. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression // Nature. 2005. V. 435. P. 839–843.
- Yang F. et al. miR-17-5p promotes migration of human hepatocellular carcinoma cells through the p38 mitogen-activated protein kinase-heat shock protein 27 pathway // Hepatology. 2010.
 V. 51. P. 1614–1623.
- 77. Quintavalle C. et al. MiR-221/222 overexpession in human glioblastoma increases invasiveness by targeting the protein phosphate PTP // Oncogene. 2012. V. 31. P. 858–868.
- Liu S. et al. A microRNA 221- and 222-mediated feedback loop maintains constitutive activation of NFκB and STAT3 in colorectal cancer cells // Gastroenterology. – 2014. – V. 147. – P. 847-859.
- Liang A.L. et al. MiRNA-10b sponge: An anti-breast cancer study in vitro // Oncol. Rep. 2016. – V. 35. – P. 1950–1958.
- 80. Tian Y. et al. MicroRNA-10b promotes migration and invasion through KLF4 in human esophageal cancer cell lines // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. P. 7986–7994.
- 81. Pal R., Greene S. MicroRNA-10b is overexpressed and critical for cell survival and proliferation in medulloblastoma // PLoS One. 2015. V. 10. P. 1–15.
- 82. Chen L. et al. A lentivirus-mediated miR-23b sponge diminishes the malignant phenotype of glioma cells in vitro and in vivo // Oncol. Rep. 2014. V. 31. P. 1573–1580.
- Zhang T. et al. Downregulation of miR-522 suppresses proliferation and metastasis of non-small cell lung cancer cells by directly targeting DENN/MADD domain containing 2D // Sci. Rep. – 2016. – V. 6. – P. 1–15.
- 84. Shang C., Lu Y.M., Meng L.R. MicroRNA-125b down-regulation mediates endometrial cancer invasion by targeting ERBB2 // Med. Sci. Monit. 2012. V. 18. P. 149–155.
- 85. Boufraqech M., Klubo-Gwiezdzinska J., Kebebew E. MicroRNAs in the thyroid // Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism. 2016. V. 30. P. 603–619.
- 86. Viré E. et al. The breast cancer oncogene EMSY represses transcription of antimetastatic microRNA miR-31 // Mol. Cell. 2014. V. 53. P. 806–818.
- 87. Hashemi Z.S. et al. Inhibition of breast cancer metastasis by co-transfection of miR-31/193bmimics // Iran. J. Basic Med. Sci. – 2018. – V. 21. – P. 427–433.
- 88. Wei Y.Z. et al. MiR-9-5p could promote angiogenesis and radiosensitivity in cervical cancer by targeting SOCS5 // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2019. V. 23. P. 7314–7326.
- 89. Chen X. et al. MiR-9 promotes tumorigenesis and angiogenesis and is activated by MYC and OCT4 in human glioma // J. Exp. Clin. Cancer Res. 2019. V. 38. P. 99–115.
- 90. Lee S.H. et al. Targeting of RUNX3 by miR-130a and miR-495 cooperatively increases cell

proliferation and tumor angiogenesis in gastric cancer cells // Oncotarget. – 2015. – V. 6. – P. 33269–33278.

- 91. Yang Y. et al. MicroRNA-210 promotes cancer angiogenesis by targeting fibroblast growth factor receptor-like 1 in hepatocellular carcinoma // Oncol. Rep. 2016. V. 36. P. 2553–2562.
- 92. Veliceasa D. et al. Therapeutic manipulation of angiogenesis with miR-27b // Vasc. Cell. 2015. V. 7. P. 1–13.
- 93. Liu Y.S. et al. MIR-181b modulates EGFR-dependent VCAM-1 expression and monocyte adhesion in glioblastoma // Oncogene. 2017. V. 36. P. 5006–5022.
- 94. Pan Z. et al. Role of microRNAs in remodeling the tumor microenvironment (Review) // Int. J. Oncol. 2020. V. 56. P. 407–416.
- 95. Li T., Pan H., Li R. The dual regulatory role of miR-204 in cancer // Tumor Biology. 2016. V. 37. P. 11667–11677.
- 96. KJ C. et al. Reexpression of Let-7g microRNA Inhibits the Proliferation and Migration via K-Ras/HMGA2/snail Axis in Hepatocellular Carcinoma // Biomed Res. Int. 2014. V. 2014. P. 1–13.
- 97. Markopoulos G.S. et al. A step-by-step microRNA guide to cancer development and metastasis // Cellular Oncology. – 2017. – V. 40. – P. 303–339.
- Devulapally R. et al. Polymer nanoparticles mediated codelivery of AntimiR-10b and AntimiR-21 for achieving triple negative breast cancer therapy // ACS Nano. 2015. V. 9. P. 2290–2302.
- 99. Mohamad M. et al. Roles of MicroRNA21 and MicroRNA29a in Regulating Cell Adhesion Related Genes in Bone Metastasis Secondary to Prostate Cancer // Asian. Rac. J. Cancer Prev. – 2016. – V. 17. – P. 3437–3445.
- Khalaj M. et al. Pathogenic MicroRNA's in myeloid malignancies // Front. Genet. -2014. V.
 5. P. 1-10.
- 101. Zhang Y. et al. MiRNA-3978 regulates peritoneal gastric cancer metastasis by targeting legumain // Oncotarget. 2016. V. 7. P. 83223–83230.
- Kota J. et al. Therapeutic microRNA Delivery Suppresses Tumorigenesis in a Murine Liver Cancer Model // Cell. – 2009. – V. 137. – P. 1005–1017.
- 103. Wang Z.M. et al. miR-15a-5p Suppresses Endometrial Cancer Cell Growth via Wnt/β-catenin Signaling Pathway by Inhibiting WNT3A // Eur Rev Med Pharmacol Sci. – 2017. – V. 21. – P. 4810–4818.
- 104. Wang Y. et al. miR-218 inhibits acute promyelocytic leukemia cell growth by targeting BMI-1 // Oncol. Lett.- 2017. V. 14. P. 8078-8083.
- 105. Li Y.J. et al. MicroRNA-455 suppresses non-small cell lung cancer through targeting ZEB1 // Cell Biol. Int. – 2016. – V. 40. – P. 621–628.
- Li X., Li Y., Lu H. MiR-1193 suppresses proliferation and invasion of human breast cancer cells through directly targeting IGF2BP2 // Oncol. Res. – 2017. – V. 25. – P. 579–585.
- 107. Wang S. et al. The potent tumor suppressor miR-497 inhibits cancer phenotypes in

nasopharyngeal carcinoma by targeting ANLN and HSPA4L // Oncotarget. – 2015. – V. 6. – P. 35893–35907.

- 108. Wang Z. et al. MiR-142-5p Suppresses Tumorigenesis by Targeting PIK3CA in Non-Small Cell Lung Cancer // Cell. Physiol. Biochem. 2017. V. 43. P. 2505–2515.
- 109. Yan L., Yao J., Qiu J. miRNA-495 suppresses proliferation and migration of colorectal cancer cells by targeting FAM83D // Biomed. Pharmacother. 2017. VI. 96. P. 974–981.
- 110. Kim K. et al. A MicroRNA196a2* and TP63 Circuit Regulated by Estrogen Receptor-α and ERK2 that Controls Breast Cancer Proliferation and Invasiveness Properties // Horm. Cancer. – 2013. – V. 4. – P. 78–91.
- 111. Colangelo T. et al. The MIR-27a-calreticulin axis affects drug-induced immunogenic cell death in human colorectal cancer cells // Cell Death Dis. 2016. V. 7. P. 1–11.
- 112. Drago-Ferrante R. et al. Suppressive role exerted by microRNA-29b-1-5p in triple negative breast cancer through SPIN1 regulation // Oncotarget. 2017. V. 8. P. 28939–28958.
- 113. Munoz J.L. et al. Temozolomide resistance in glioblastoma occurs by miRNA-9-targeted PTCH1, independent of sonic hedgehog level // Oncotarget. 2015. V. 6. P. 1190–1201.
- 114. Bridge G. et al. The microRNA-30 family targets DLL4 to modulate endothelial cell behavior during angiogenesis // Blood. 2012. V. 120. P. 5063–5072.
- 115. Tay F.C. et al. Using artificial microRNA sponges to achieve microRNA loss-of-function in cancer cells // Advanced Drug Delivery Reviews. 2015. V. 81. P. 117–127.
- 116. Haraguchi T., Ozaki Y., Iba H. Vectors Expressing Efficient RNA Decoys Achieve the Long-Term Suppression of Specific microRNA Activity in Mammalian Cells // Nucleic Acids Res. – 2009. – V. 37. – P. 1–13.
- 117. Ma L. et al. MiR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis // Nat. Cell Biol. 2010. V. 12. P. 247–256.
- 118. Yang J. et al. CRISPR/Cas9-mediated noncoding RNA editing in human cancers // RNA Biology. - 2018. - V. 15. - P. 35-43.
- 119. Aquino-Jarquin G. Emerging role of CRISPR/Cas9 technology for MicroRNAs editing in cancer research // Cancer Res. 2017. V. 77. P. 6812–6817.
- Huo W. et al. Lentiviral CRISPR/Cas9 vector mediated miR-21 gene editing inhibits the epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer cells // J. Cancer. - 2017. - V. 8. - P. 57-64.
- 121. Chang H. et al. CRISPR/cas9, a novel genomic tool to knock down microRNA in vitro and in vivo // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 1–12.
- 122. Lennox K.A., Behlke M.A. A direct comparison of anti-microRNA oligonucleotide potency // Pharm. 2010. V. 27. P. 1788–1799.
- Watts J.K. Locked nucleic acid: Tighter is different // Chemical Communications. 2013. V. 49. – P. 5618–5620.
- 124. Zhang R. et al. The effect of antisense inhibitor of miRNA 106b~25 on the proliferation, invasion, migration, and apoptosis of gastric cancer cell // Tumor Biol. – 2016. – V. 37. – P. 10507–10515.

- 125. Quan J. et al. Oncogenic miR-23a-5p is associated with cellular function in RCC // Mol. Med. Rep. 2017. V. 16. P. 2309–2317.
- 126. Haghpanah V. et al. Antisense-miR-21 enhances differentiation/apoptosis and reduces cancer stemness state on anaplastic thyroid cancer // Tumor Biol. 2016. V. 37. P. 1299–1308.
- 127. Liang C. et al. MicroRNA-18a-5p functions as an oncogene by directly targeting IRF2 in lung cancer // Cell Death Dis. 2017. V. 8. P. 1–10.
- 128. Teplyuk N.M. et al. Therapeutic potential of targeting micro RNA -10b in established intracranial glioblastoma: first steps toward the clinic // EMBO Mol. Med. -2016. - V. 8. - P. 268-287.
- 129. Babar I.A. et al. Nanoparticle-based therapy in an in vivo microRNA-155 (miR-155)-dependent mouse model of lymphoma // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2012. V. 109. P. 1–6.
- Huynh C. et al. Efficient in vivo microRNA targeting of liver metastasis // Oncogene. 2011. V. 30. – P. 1481–1488.
- 131. Yoo B. et al. Therapy targeted to the metastatic niche is effective in a model of stage IV breast cancer // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 1–9.
- 132. van Zandwijk N. et al. Safety and activity of microRNA-loaded minicells in patients with recurrent malignant pleural mesothelioma: a first-in-man, phase 1, open-label, dose-escalation study // Lancet Oncol. – 2017. – V. 18. – P. 1386–1396.
- 133. Qi Y. et al. Prognostic value of the MicroRNA-29 family in multiple human cancers: A metaanalysis and systematic review // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 2017. – V. 44. – P. 441–454.
- Beg M.S. et al. Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors // Invest. New Drugs. -2017. - V. 35. - P. 180-188.
- 135. Pfeffer S.R., Yang C.H., Pfeffer L.M. The Role of miR-21 in Cancer // Drug Dev. Res. 2015. – V. 76. – P. 270–277.
- 136. Wang W. Study of miR-10b regulatory mechanism for epithelial-mesenchymal transition, invasion and migration in nasopharyngeal carcinoma cells // Oncol. Lett. – 2017. – V. 14. – P. 7207–7210.
- Ren L.H. et al. MicroRNA-183 promotes proliferation and invasion in oesophageal squamous cell carcinoma by targeting programmed cell death 4 // Br. J. Cancer. – 2014. – V. 111. – P. 2003–2013.
- Yan Z. et al. MiR-96/HBP1/Wnt/β-catenin regulatory circuitry promotes glioma growth // FEBS Lett. – 2014. – V. 588. – P. 3038–3046.
- 139. Zhang Y. et al. MiR-182 promotes cell growth and invasion by targeting forkhead box F2 transcription factor in colorectal cancer // Oncol. Rep. 2015. V. 33. P. 2592–2598.
- 140. Ma Y. et al. Dysregulation and functional roles of miR-183-96-182 cluster in cancer cell proliferation, invasion and metastasis // Oncotarget. 2016. V. 7. P. 42805–42825.
- 141. Matsubara H. et al. Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92 // Oncogene. – 2007. – V. 26. – P. 6099– 6105.

- 142. Zhang Q. et al. MicroRNA-183/182/96 cooperatively regulates the proliferation of colon cancer cells // Mol. Med. Rep. 2015. V. 12. P. 668–674.
- 143. Zhang C. et al. Co-suppression of miR-221/222 cluster suppresses human glioma cell growth by targeting p27kip1 in vitro and in vivo // Int. J. Oncol. 2009. V. 34. P. 1653–1660.
- 144. Brognara E. et al. High levels of apoptosis are induced in human glioma cell lines by coadministration of peptide nucleic acids targeting miR-221 and miR-222 // Int. J. Oncol. – 2016. – V. 48. – P. 1029–1038.
- 145. Ma J. et al. ZEB1 induced miR-99b/let-7e/miR-125a cluster promotes invasion and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma // Cancer Lett. 2017. V. 398. P. 37–45.
- Li L. et al. MicroRNA-155 and MicroRNA-21 Promote the Expansion of Functional Myeloid-Derived Suppressor Cells // J. Immunol. – 2014. – V. 192. – P. 1034–1043.
- 147. Lu Y. et al. A Single anti-microRNA Antisense Oligodeoxyribonucleotide (AMO) Targeting Multiple microRNAs Offers an Improved Approach for microRNA Interference // Nucleic Acids Res. – 2009. – V. 37. – P. 1–10.
- 148. Jung J. et al. Simultaneous inhibition of multiple oncogenic miRNAs by a multi-potent microRNA sponge // Oncotarget. 2015. V. 6. P. 20370–20387.
- 149. Kluiver J. et al. Rapid generation of microRNA sponges for microRNA inhibition // PLoS One. 2012. V. 7. P. 1–8.
- 150. Li P. et al. MiR-183/-96/-182 cluster is up-regulated in most breast cancers and increases cell proliferation and migration // Breast Cancer Res. 2014. V. 16. P. 1–17.
- 151. Niu W.Y. et al. Anti-leukemia mechanism of miR-17 and miR-20a silencing mediated by miRNA sponge // Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2014. V. 22. P. 932–937.
- 152. Kasinski A.L. et al. A combinatorial microRNA therapeutics approach to suppressing non-small cell lung cancer // Oncogene. 2015. V. 34. P. 3547–3555.
- 153. Feng S. De et al. Simultaneous overexpression of miR-126 and miR-34a induces a superior antitumor efficacy in pancreatic adenocarcinoma // Onco. Targets. Ther. – 2017. – V. 10. – P. 5591–5604.
- 154. Han Z. et al. MiR-497 and miR-34a retard lung cancer growth by co-inhibiting cyclin E1 (CCNE1) // Oncotarget.- 2015. V. 6. P. 13149-13163.
- 155. Tan Z., Zhao J., Jiang Y. MiR-634 sensitizes glioma cells to temozolomide by targeting CYR61 through Raf-ERK signaling pathway // Cancer Med. 2018. V. 7. P. 913–921.
- Chaudhary A.K. et al. Chemosensitization and inhibition of pancreatic cancer stem cell proliferation by overexpression of microRNA-205 // Cancer Lett. – 2017. – V. 402. – P. 1– 8.
- 157. Li Y. et al. Co-delivery of microRNA-21 antisense oligonucleotides and gemcitabine using nanomedicine for pancreatic cancer therapy // Cancer Sci. 2017. V. 108. P. 1493–1503.
- 158. Dai X. et al. Combined Delivery of Let-7b MicroRNA and Paclitaxel via Biodegradable Nanoassemblies for the Treatment of KRAS Mutant Cancer // Mol. Pharm. – 2016. – V. 13. – P. 520–533.
- 159. Chen X. et al. The potential combinational effect of miR-34a with celecoxib in osteosarcoma //

Anticancer. Drugs. - 2017. - V. 28. - P. 888-897.

- 160. Fan L. et al. Dual loading miR-218 mimics and Temozolomide using AuCOOH@FA-CS drug delivery system: Promising targeted anti-tumor drug delivery system with sequential release functions // J. Exp. Clin. Cancer Res. – 2015. – V. 34. – P. 1–9.
- Li J.-C., Zheng J.-Q. Effect of microRNA-145 on proliferation and apoptosis of human nonsmall cell lung cancer A549 cells by regulating mTOR signaling pathway // J. Cell. Biochem. – 2017. – P. 1–30.
- 162. Huang G. et al. MiRNA-34a reversed TGF-β-induced epithelial-mesenchymal transition via suppression of SMAD4 in NPC cells // Biomed. Pharmacother. 2018. V. 106. P. 217–224.
- 163. Ren F.H. et al. Analysis of microarrays of miR-34a and its identification of prospective target gene signature in hepatocellular carcinoma // BMC Cancer. 2018. V. 18. P. 1–10.
- 164. Bandi N., Vassella E. MiR-34a and miR-15a/16 are co-regulated in non-small cell lung cancer and control cell cycle progression in a synergistic and Rb-dependent manner // Mol. Cancer. – 2011. – V. 10. – P. 1–11.
- 165. Liep J. et al. Cooperative effect of miR-141-3p and miR-145-5p in the regulation of targets in clear cell renal cell carcinoma // PLoS One. 2016. V. 11. P. 1–21.
- 166. Su J. et al. MiR-143 and MiR-145 regulate IGF1R to suppress cell proliferation in colorectal cancer // PLoS One. 2014. V. 9. P. 1–15.
- 167. Sun J. et al. MicroRNA-99a/100 promotes apoptosis by targeting mTOR in human esophageal squamous cell carcinoma // Med. Oncol. 2013. V. 30. P. 1–9.
- 168. Cheng H. et al. Co-targeting of IGF1R/mTOR pathway by miR-497 and miR-99a impairs hepatocellular carcinoma development // Oncotarget. V. 8. P. 47984–47997.
- 169. Yang Y. et al. MiR-137 and miR-197 induce apoptosis and suppress Tumorigenicity by targeting MCL-1 in multiple Myeloma // Clin. Cancer Res. 2015. V. 21. P. 2399–2411.
- 170. Li H. et al. A regulatory circuitry between miR-193a/miR-600 and WT1 enhances leukemogenesis in acute myeloid leukemia // Exp. Hematol. 2018. V. 61. P. 59-68.
- 171. Ohba S., Hirose Y. Current and Future Drug Treatments for Glioblastomas // Curr. Med. Chem. 2016. V. 23. P. 4309–4316.
- 172. Patel K. et al. Sunitinib in metastatic renal cell carcinoma: Experience from single center study, efficacy and safety // Indian J. Cancer. 2016. V. 53. P. 118–122.
- 173. Song Y., Baba T., Mukaida N. Gemcitabine induces cell senescence in human pancreatic cancer cell lines // Biochem. Biophys. Res. 2016. V. 477. P. 515–519.
- Li X.X. et al. Standard chemotherapy with cetuximab for treatment of colorectal cancer // World J. Gastroenterol. – 2015. – V. 21. – P. 7022–7035.
- Yardley D.A. Nab-Paclitaxel mechanisms of action and delivery // Journal of Controlled Release. – 2013. – V. 170. – P. 365–372.
- 176. Schlack K. et al. The safety and efficacy of gemcitabine for the treatment of bladder cancer // Expert Rev. Anticancer Ther. 2016. V. 16. P. 255–271.
- 177. Mikamori M. et al. MicroRNA-155 controls exosome synthesis and promotes gemcitabine

resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma // Sci. Rep. - 2017. - V. 7. - P. 1-14.

- 178. Yamaguchi N. et al. Identification of microRNAs involved in resistance to sunitinib in renal cell carcinoma cells // Anticancer Res. 2017. V. 37. P. 2985–2992.
- 179. Ge X. et al. Hypoxia-mediated mitochondria apoptosis inhibition induces temozolomide treatment resistance through miR-26a/Bad/Bax axis // Cell Death Dis. 2018. V. 9. P. 1–16.
- 180. Aakko S. et al. MYC-Induced miR-203b-3p and miR-203a-3p Control Bcl-xL Expression and Paclitaxel Sensitivity in Tumor Cells // Transl. Oncol. 2019. V. 12. P. 170–179.
- 181. Wang M. et al. Paclitaxel-resistant gastric cancer MGC-803 cells promote epithelial-tomesenchymal transition and chemoresistance in paclitaxel-sensitive cells via exosomal delivery of miR-155-5p // Int. J. Oncol. – 2019. – V. 54. – P. 326–338.
- 182. Wang H. et al. MicroRNA-195 reverses the resistance to temozolomide through targeting cyclin E1 in glioma cells // Anticancer. Drugs. – 2019. – V. 30. – P. 81–88.
- 183. Amponsah P.S. et al. microRNA-210 overexpression inhibits tumor growth and potentially reverses gemcitabine resistance in pancreatic cancer // Cancer Lett. – 2017. – V. 388. – P. 107– 117.
- 184. Hu H. et al. micorRNA-101 silences DNA-PKcs and sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2017. V. 483. P. 725–731.
- 185. Yao J. et al. MiR-125a Regulates Chemo-Sensitivity to Gemcitabine in Human Pancreatic Cancer Cells Through Targeting A20 // Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). – 2016. – V. 48. – P. 1–10.
- Lin Y. et al. MiRNA-145 increases therapeutic sensibility to gemcitabine treatment of pancreatic adenocarcinoma cells // Oncotarget. – 2016. – V. 7. – P. 70857–70868.
- 187. Takiuchi D. et al. Involvement of microRNA-181b in the gemcitabine resistance of pancreatic cancer cells // Pancreatology. 2013. V. 13. P. 517–523.
- 188. Xiao W. et al. Mir-144-3p Promotes Cell Proliferation, Metastasis, Sunitinib Resistance in Clear Cell Renal Cell Carcinoma by Downregulating ARID1A // Cell. Physiol. Biochem. – 2017. – V. 43. – P. 2420–2433.
- 189. Mussnich P. et al. MiR-199a-5p and miR-375 affect colon cancer cell sensitivity to cetuximab by targeting PHLPP1 // Expert Opin. Ther. Targets. 2015. V. 19. P. 1017–1026.
- 190. Wu Q., Zhao Y., Wang P. miR-204 inhibits angiogenesis and promotes sensitivity to cetuximab in head and neck squamous cell carcinoma cells by blocking JAK2-STAT3 signaling // Biomed. Pharmacother. – 2018. – V. 99. – P. 278–285.
- 191. Chen Z. et al. 20(S)-ginsenoside-Rg3 reverses temozolomide resistance and restrains epithelialmesenchymal transition progression in glioblastoma // Cancer Sci. – 2019. – V. 110. – P. 389– 400.
- 192. Fan P. et al. MicroRNA-101-3p reverses gemcitabine resistance by inhibition of ribonucleotide reductase M1 in pancreatic cancer // Cancer Lett. 2016. V. 373. P. 130–137.
- 193. Jiang J. et al. Up-regulation of miR-383-5p suppresses proliferation and enhances chemosensitivity in ovarian cancer cells by targeting TRIM27 // Biomed. Pharmacother. 2019. V. 109. P. 595–601.

- 194. Tu M.J. et al. Bioengineered miRNA-1291 prodrug therapy in pancreatic cancer cells and patient-derived xenograft mouse models // Cancer Lett. 2019. V. 442. P. 82–90.
- 195. Chen H. et al. MicroRNA-1294 Inhibits the Proliferation and Enhances the Chemosensitivity of Glioma to Temozolomide via the Direct Targeting of TPX2 // Am J Cancer Res. – 2018. – V. 8. – P. 291–301.
- 196. Yu G. et al. MicroRNA-429 Sensitizes Pancreatic Cancer Cells to Gemcitabine Through Regulation of PDCD4 // Am J Transl Res. 2017. V. 9. P. 5048–5055.
- 197. Mittal A. et al. Efficacy of gemcitabine conjugated and miRNA-205 complexed micelles for treatment of advanced pancreatic cancer // Biomaterials. 2014. V. 35. P. 7077–7087.
- 198. Zeng A. et al. Exosomal transfer of miR-151a enhances chemosensitivity to temozolomide in drug-resistant glioblastoma // Cancer Lett. 2018. V. 436. P. 10–21.
- 199. Khella H.W.Z. et al. miR-221/222 are involved in response to sunitinib treatment in metastatic renal cell carcinoma // Mol. Ther. 2015. V. 23. P. 1748–1758.
- 200. Costa P.M. et al. MiRNA-21 silencing mediated by tumor-targeted nanoparticles combined with sunitinib: A new multimodal gene therapy approach for glioblastoma // J. Control. Release. – 2015. – V. 207. – P. 31–39.
- 201. Liu H. et al. Synthetic miR-145 Mimic Enhances the Cytotoxic Effect of the Antiangiogenic Drug Sunitinib in Glioblastoma // Cell Biochem. 2015. V. 72. P. 551–557.
- 202. Huang S. et al. Synergistic Effect of MiR-146a Mimic and Cetuximab on Hepatocellular Carcinoma Cells // Biomed Res. Int. 2014. V. 2014. P. 1–16.
- 203. Mondal G. et al. EGFR-Targeted Cationic Polymeric Mixed Micelles for Codelivery of Gemcitabine and miR-205 for Treating Advanced Pancreatic Cancer // Mol. Pharm. – 2017. – V. 14. – P. 3121–3133.
- 204. Zhang Y. et al. Inhibition of microRNA-17/20a suppresses cell proliferation in gastric cancer by modulating UBE2C expression // Oncol. Rep. 2015. V. 33. P. 2529–2536.
- 205. Damha M.J., Ogilvie K.K. Oligoribonucleotide synthesis. The silyl-phosphoramidite method. // Methods Mol. Biol. 1993. V. 20. P. 81–114.
- 206. Mironova N. et al. Animal model of drug-resistant tumor progression // Annals of the New York Academy of Sciences. 2006. V. 1091. P. 490–500.
- 207. Kanamaru H. et al. MDR1 RNA Levels in Human Renal Cell Carcinomas: Correlation With Grade and Prediction of Reversal of Doxorubicin Resistance by Quinidine in Tumor Explants // J Natl Cancer Inst. 1989. V. 81. P. 844–849.
- 208. Silberklang M., Gillum A.M., RajBhandary U.L. Use of in Vitro32P Labeling in the Sequence Analysis of Nonradioactive tRNAs // Methods Enzymol. 1979. V. 59. P. 58–109.
- 209. Petersheim M., Turner D.H. Base-Stacking and Base-Pairing Contributions to Helix Stability: Thermodynamics of Double-Helix Formation with CCGG, CCGGp, CCGGAp, ACCGGp, CCGGUp, and ACCGGUp // Biochemistry. 1983. V. 22. P. 256–263.
- 210. Ozono S. et al. Tumor doubling time of renal cell carcinoma measured by CT: collaboration of Japanese Society of Renal Cancer. // Jpn. J. Clin. Oncol. 2004. V. 34. P. 82–85.
- 211. Chen C. et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR // Nucleic Acids

Res. - 2005. - V. 33. - P. e179-e189.

- 212. Häner R., Hall J. The sequence-specific cleavage of RNA by artificial chemical ribonucleases // Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 1997. V. 7. P. 423–430.
- 213. Kimura E. et al. Phosphodiester Hydrolysis by a New Zinc(II) Macrocyclic Tetraamine Complex with an Alcohol Pendant: Elucidation of the Roles of Ser-102 and Zinc(II) in Alkaline Phosphatase // J. Am. Chem. Soc. – 1995. – V. 117. – P. 8304–8311.
- 214. Shelton V.M., Morrow J.R. Catalytic Transesterification and Hydrolysis of RNA by Zinc(II) Complexes // Inorg. Chem. 1991. V. 30. P. 4295–4299.
- 215. Inoue H. et al. Two-terpyridine.Cu(II) complexes-containing antisense systems for rapid and highly site-specific RNA cleavage. // Nucleic Acids Symp. Ser. 2000. P. 279–280.
- 216. Matsumura K., Endo M., Komiyama M. Lanthanide complex-oligo-DNA hybrid for sequenceselective hydrolysis of RNA // J. Chem. Soc. Chem. Commun. – 1994. – P. 2019–2020.
- 217. Hall J. et al. Efficient sequence-specific cleavage of RNA using novel europium complexes conjugates to oligonucleotides // Chemistry&Biology. 1994. V. 1. P. 185–191.
- 218. Trawick B.N., Osiek T.A., Bashkin J.K. Enhancing sequence-specific cleavage of RNA within a duplex region: Incorporation of 1,3-propanediol linkers into oligonucleotide conjugates of serinol-terpyridine // Bioconjug. Chem. – 2001. – V. 12. – P. 900–905.
- 219. Murtola M., Wenska M., Strömberg R. PNAzymes that are artificial RNA restriction enzymes // J. Am. Chem. Soc. 2010. V. 132. P. 8984–8990.
- 220. Beloglazova N.G. et al. Site-selective artificial ribonucleases: oligonucleotide conjugates containing multiple imidazole residues in the catalytic domain // J. Nucleic Acids. – 2011. – V. 2011. – P. 1–18.
- 221. Beloglazova N.G. et al. Cleavage of yeast tRNAPhe with complementary oligonucleotide conjugated to a small ribonuclease mimic // FEBS Lett. 2000. V. 481. P. 277–280.
- 222. Sunami T. et al. Structure of d(GCGAAAGC) (hexagonal form): A base-intercalated duplex as a stable structure // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 2004. V. 60. P. 90–96.
- 223. Ломзов А.А., Пышный Д.В. Расчет температуры плавления нативных и модифицированных комплексов днк при различных концентрациях катионов металлов с помощью расширенной модели конденсации противоионов // Вестник НГУ. Серия Физика. – 2008. – Т 3. – С. 61–75.
- 224. Woolf T.M. Review: To Cleave or Not To Cleave: Ribozymes and Antisense // Antisense Res. Dev. 1995. V. 5. P. 227–232.
- 225. Hall J., Husken D., Haner R. Towards Artificial Ribonucleases: The Sequence-Specific Cleavage of RNA in a Duplex // Nucleic Acids Res. 1996. V. 24. P. 3522–3526.
- 226. Cerritelli S.M., Crouch R.J. Ribonuclease H: The enzymes in eukaryotes // FEBS Journal. 2009. V. 276. P. 1494–1505.
- 227. Bennett C.F., Swayze E.E. RNA Targeting Therapeutics: Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides as a Therapeutic Platform // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2010. – V. 50. – P. 259–293.
- 228. Lai E.C. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative

post-transcriptional regulation // Nat. Genet. - 2002. - V. 30. - P. 363-364.

- 229. Brennecke J. et al. Principles of microRNA-target recognition // PLoS Biology. 2005. V. 3. P. 404–418.
- 230. Hosono K. et al. Properties of base-pairing in the stem region of hairpin antisense oligonucleotides containing 2'-methoxynucleosides // BBA 1995. V. 1244. P. 339–344.
- 231. Lennox K.A., Behlke M.A. Chemical modification and design of anti-miRNA oligonucleotides // Gene Ther. – 2011. – V. 18. – P. 1111–1120.
- 232. Vermeulen A. et al. Double-stranded regions are essential design components of potent inhibitors of RISC function // RNA. 2007. V. 13. P. 723–730.
- 233. Hu H. et al. Antisense oligonucleotide against miR-21 inhibits migration and induces apoptosis in leukemic K562 cells // Leuk. Lymphoma. 2010. V. 51. P. 694–701.
- 234. Lu Z. et al. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene // Oncogene. 2008. V. 27. P. 4373–4379.
- 235. Tao Y.J. et al. Antisense oligonucleotides against microRNA-21 reduced the proliferation and migration of human colon carcinoma cells // Cancer Cell Int. 2015. V. 15. P. 1–10.
- 236. Wang G., Xu X.S. Peptide nucleic acid (PNA) binding-mediated gene regulation // Cell Research. 2004. V. 14. P. 111–116.
- 237. Malek-Adamian E. et al. Adjusting the Structure of 2'-Modified Nucleosides and Oligonucleotides via C4'-α-F or C4'-α-OMe Substitution: Synthesis and Conformational Analysis // J. Org. Chem. – 2018. – V. 83. – P. 9839–9849.
- 238. Canaple L. et al. Artificial ribonucleases: Efficient and specific in vitro cleavage of human c-raf-1 RNA // Bioconjug. Chem. 2002. V. 13. P. 945–951.
- 239. A K. et al. Novel approach for SNP genotyping based on site-selective RNA scission // Nucleic Acids Res. Suppl. 2002. V. 2. P. 129–130.
- 240. Ushijima K. et al. Anti-HIV-1 activity of an antisense phosphorothioate oligonucleotide bearing imidazole and primary amine groups // Bioorganic Med. Chem. 2001. V. 9. P. 2165–2169.
- 241. Baker B.F. et al. Oligonucleotide-europium complex conjugate designed to cleave the 5' cap structure of the ICAM-1 transcript potentiates antisense activity in cells // Nucleic Acids Res. 1999. V. 27. P. 1547–1551.
- 242. Wagenaar T.R. et al. Anti-miR-21 suppresses Hepatocellular carcinoma growth via broad transcriptional network deregulation // Mol. Cancer Res. 2015. V. 13. P. 1009–1021.
- 243. Wu Y.R. et al. MicroRNA-21 promotes cell proliferation, migration, and resistance to apoptosis through PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in esophageal cancer // Tumor Biol. 2016. V. 37. P. 12061–12070.
- 244. Zamecnik P.C., Stephenson M.L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1978. – V. 75. – P. 280–284.
- 245. Uhlmann E., Peyman A. Antisense Oligonucleotides: A New Therapeutic Principle // Chem. Rev. 1990. V. 90. P. 543–584.

- 246. Cohen J.S. Oligonucleotides as therapeutic agents // Pharmacol. Ther. 1991. V. 52. P. 211–225.
- 247. Goodchild J., Kim B., Zamecnik P.C. The Clearance and Degradation of Oligodeoxynucleotides Following Intravenous Injection into Rabbits // Antisense Res. Dev. – 1991. – V. 1. – P. 153– 160.
- 248. Shen X., Corey D.R. Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs // Nucleic Acids Res. 2018. V. 46. P. 1584–1600.
- 249. Crooke S.T. et al. Perspective RNA-Targeted Therapeutics // Cell Metab. 2018. V. 27. P. 714–739.
- 250. Stec W.J. et al. Automated Solid-Phase Synthesis, Separation, and Stereochemistry of Phosphorothioate Analogues of Oligodeoxyribonucleotides // J. Am. Chem. Soc. – 1984. – V. 106. – P. 6077–6079.
- 251. Furdon P.J., Dominski Z., Kole R. RNase H cleavage of RNA hybridized to oligonucleotides containing methylphosphonate, phosphorothioate and phosphodiester bonds // Nucleic Acids Res. 1989. V. 17. P. 9193–9204.
- 252. Liang X.H. et al. RNase H1-Dependent Antisense Oligonucleotides Are Robustly Active in Directing RNA Cleavage in Both the Cytoplasm and the Nucleus // Mol. Ther. – 2017. – V. 25. – P. 2075–2092.
- 253. Stein C.A., Tonkinson J.L., Yakubov L. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides-anti-sense inhibitors of gene expression? // Pharmacol. Ther. 1991. V. 52. P. 365–384.
- 254. Srinivasan S.K., Iversen P. Review of in vivo pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate oligonucleotides // J. Clin. Lab. Anal. 1995. V. 9. P. 129–137.
- 255. Crooke S.T. et al. Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides // Nat. Biotechnol. 2017. V. 35. P. 230–237.
- 256. Eckstein F. Phosphorothioates, Essential Components of Therapeutic Oligonucleotides // Nucleic Acid Ther. 2014. V. 24. P. 374–387.
- 257. Šĭpová H. et al. 5'-O-Methylphosphonate nucleic acids New modified DNAs that increase the Escherichia coli RNase H cleavage rate of hybrid duplexes // Nucleic Acids Res. 2014. V. 42. P. 5378–5389.
- 258. Iannitti T., Morales-Medina J., Palmieri B. Phosphorothioate Oligonucleotides: Effectiveness and Toxicity // Curr. Drug Targets. 2014. V. 15. P. 663–673.
- 259. Migawa M.T. et al. Site-specific replacement of phosphorothioate with alkyl phosphonate linkages enhances the therapeutic profile of gapmer ASOs by modulating interactions with cellular proteins // Nucleic Acids Res. 2019. V. 47. P. 5465–5479.
- 260. Kamola P.J. et al. Strategies for In Vivo Screening and Mitigation of Hepatotoxicity Associated with Antisense Drugs // Mol. Ther. Nucleic Acids. 2017. V. 8. P. 383–394.
- 261. Kakiuchi-Kiyota S. et al. Comparison of Hepatic Transcription Profiles of Locked Ribonucleic Acid Antisense Oligonucleotides: Evidence of Distinct Pathways Contributing to Non-target Mediated Toxicity in Mice // Toxicol. Sci. 2014. V. 138. P. 234–248.
- 262. Kamola P.J. et al. In silico and in vitro evaluation of exonic and intronic off-target effects form

a critical element of therapeutic ASO gapmer optimization // Nucleic Acids Res. – 2015. – V. 43. – P. 8638–8650.

- 263. Raal F.J. et al. Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, for lowering of LDL cholesterol concentrations in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial // Lancet. 2010. V. 375. P. 998–1006.
- 264. Stein E.A. et al. Apolipoprotein B Synthesis Inhibition with Mipomersen in Heterozygous Familial Hypercholesterolemia: Results of a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial to Assess Efficacy and Safety as Add-On Therapy in Patients with Coronary Artery Disease // Circulation. – 2012. – V. 126. – P. 2283–2292.
- 265. McGowan M.P. et al. Randomized, Placebo-Controlled Trial of Mipomersen in Patients with Severe Hypercholesterolemia Receiving Maximally Tolerated Lipid-Lowering Therapy // PLoS One. 2012. V. 7. P. 1–10.
- 266. Thomas G.S. et al. Mipomersen, an apolipoprotein b synthesis inhibitor, reduces atherogenic lipoproteins in patients with severe hypercholesterolemia at high cardiovascular risk: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial // J. Am. Coll. Cardiol. 2013. V. 62. P. 2178–2184.
- 267. Greuter T. et al. Alicaforsen, an Antisense Inhibitor of Intercellular Adhesion Molecule-1, in the Treatment for Left-Sided Ulcerative Colitis and Ulcerative Proctitis // Dig. Dis. S. – 2018. – V. 36. – P. 123–129.
- 268. Henry S.P. et al. Evaluation of the toxicity of ISIS 2302, a phosphorothioate oligonucleotide, in a 4-week study in CD-1 mice // Antisense Nucleic Acid Drug Dev. – 1997. – V. 7. – P. 473– 481.
- 269. Henry S.P. et al. Evaluation of the toxicity of ISIS 2302, a phosphorothioate oligonucleotide, in a four-week study in cynomolgus monkeys. // Toxicology. 1997. V. 120. P. 145–155.
- Henry S.P. et al. Correlation of toxicity and pharmacokinetic properties of a phosphorothioate oligonucleotide designed to inhibit ICAM-1 // Toxicologic Pathology. – 1999. – V. 27. – P. 95– 100.
- 271. De Mesmaeker A. et al. Backbone modifications in oligonucleotides and peptide nucleic acid systems. // Curr. Opin. Struct. Biol. 1995. V. 5. P. 343–355.
- 272. Toulmé J.J. New candidates for true antisense // Nature Biotechnology. 2001. V. 19. P. 17–18.
- 273. Kalota A. et al. 2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleic acid (2'F-ANA) modified oligonucleotides (ON) effect highly efficient, and persistent, gene silencing // Nucleic Acids Res. - 2006. - V. 34. - P. 451-461.
- 274. Kurreck J. et al. Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids // Nucleic Acids Res. 2002. V. 30. P. 1911–1918.
- 275. Lennox K.A. et al. Characterization of modified antisense oligonucleotides in Xenopus laevis embryos // Oligonucleotides. 2006. V. 16. P. 26–42.
- 276. Brown D.A. et al. Effect of phosphorothioate modification of oligodeoxynucleotides on specific protein binding // J Biol Chem. 1994. V. 269. P. 26801–26805.
- 277. Kabilova T.O. et al. Targeted delivery of nucleic acids into xenograft tumors mediated by novel

folate-equipped liposomes. // Eur. J. Pharm. Biopharm. - 2018. - V. 123. - P. 59-70.

- 278. Šípová H. et al. 5'-O-Methylphosphonate nucleic acids—new modified DNAs that increase the Escherichia coli RNase H cleavage rate of hybrid duplexes // Nucleic Acids Res. 2014. V. 42. P. 5378–5389.
- 279. Meng M., Ducho C. Oligonucleotide analogues with cationic backbone linkages // Beilstein J. Org. Chem. 2018. V. 14. P. 1293–1308.
- 280. Hovingh K., Besseling J., Kastelein J. Efficacy and safety of mipomersen sodium (Kynamro) // Expert Opin. Drug Saf. 2013. V. 12. P. 569–579.
- 281. Swayze E.E. et al. Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals // Nucleic Acids Res. – 2007. – V. 35. – P. 687– 700.
- 282. Juliano R.L., Carver K. Cellular uptake and intracellular trafficking of oligonucleotides. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2015. V. 87. P. 35–45.
- 283. Seystahl K. et al. Biological role and therapeutic targeting of TGF-b3 in glioblastoma // Mol. Cancer Ther. 2017. V. 16. P. 1177–1186.
- 284. Ma Y. et al. Structural optimization and additional targets identification of antisense oligonucleotide G3139 encapsulated in a neutral cytidinyl-lipid combined with a cationic lipid in vitro and in vivo // Biomaterials.- 2019. - V. 197. - P. 182–193.
- 285. Nair J.K. et al. Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. // J. Am. Chem. Soc. 2014. V. 136. P. 16958–16961.
- 286. Prakash T.P. et al. Targeted delivery of antisense oligonucleotides to hepatocytes using triantennary N -acetyl galactosamine improves potency 10-fold in mice // Nucleic Acids Res. – 2014. – V. 42. – P. 8796–8807.
- 287. Yu R.Z. et al. Disposition and Pharmacology of a GalNAc3-conjugated ASO Targeting Human Lipoprotein (a) in Mice // Mol. Ther. Nucleic Acids. 2016. V. 5. P. 1-10.
- 288. Sewing S. et al. GalNAc Conjugation Attenuates the Cytotoxicity of Antisense Oligonucleotide Drugs in Renal Tubular Cells // Mol. Ther. Nucleic Acids. 2019. V. 14. P. 67-79.
- 289. Koutsioumpa M. et al. MKAD-21 Suppresses the Oncogenic Activity of the miR-21/PPP2R2A/ERK Molecular Network in Bladder Cancer // Mol. Cancer Ther. – 2018. – V. 17. – P. 1430–1440.
- 290. Wang W.J. et al. MiR-21 promotes ECM degradation through inhibiting autophagy via the PTEN/akt/mTOR signaling pathway in human degenerated NP cells // Biomed. Pharmacother. 2018. V. 99. P. 725–734.
- 291. Su Y. et al. The IGF-I/JAK2-STAT3/miR-21 signaling pathway may be associated with human renal cell carcinoma cell growth // Cancer Biomarkers. 2017. V. 19. P. 289–296.
- 292. An F., Liu Y., Hu Y. miR-21 inhibition of LATS1 promotes proliferation and metastasis of renal cancer cells and tumor stem cell phenotype // Oncol. Lett. 2017. V. 14. P. 4684–4688.
- 293. Carabia J. et al. Microenvironment regulates the expression of MIR-21 and tumor suppressor

genes PTEN, PIAS3 and PDCD4 through ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia // Sci. Rep. -2017. - V. 7. - P. 1-10.

294. Zhou J. et al. Combinational treatment with microRNA-133b and cetuximab has increased inhibitory effects on the growth and invasion of colorectal cancer cells by regulating EGFR // Mol. Med. Rep. – 2015. – V. 12. – P. 5407–5414.

Приложение

Таблица 1 Приложения. Эффективность биологического действия миРНК-регулирующих препаратов по отдельности и в комбинациях в опухолевых клетках *in vitro* и на опухолевых моделях *in vivo*

миРНК- регулирующие препараты	Тип препарата	Эффекты монотерапии	Эффекты комбинированной терапии	In vitro/ In vivo	Тип опухоли, клеточная линия	Лит. Источник
Комбин	ации антисмысло	вых олигонуклеотидов или	мультитаргетных спонжей, на	правленнь	их к онкогенным миРН	К
Анти-миРНК-17 и анти-миРНК- 20а	LNA ONs	Пролиферация*: 50% (анти-миРНК-17); 90% (анти-миРНК-20а); 90% (scramble контроль)	Пролиферация: 30%	In vitro	Рак лёгкого, АСС- LC-172	[141]
Анти-миРНК- 183, анти- миРНК-182 и анти-миРНК-96 Китай)	Коммерческий ингибитор	Пролиферация*: 0.78 (анти-миРНК-183); 0.75 (анти-миРНК-182 и анти- миРНК-96);	Продиферация *: 0.2.		<i>го</i> Рак толстой кишки, HT-29	
	("GeneChem", Китай)	Колониеобразование*: 0.35 (анти-миРНК-183); 0.45 (анти-миРНК-182); 0.55 (анти-миРНК-96); 1.05 (scramble контроль)	Колониеобразование *: 0	In vitro		[142]
Анти-миРНК- 130а и анти- миРНК-495	Коммерческий ингибитор ("Qiagen", Нидерланды)	Ангиогенез*: Уровень гемоглобина: 0.6 (анти- миРНК-495); 0.4 (анти- миРНК-130а)	Ангиогенез*: Уровень гемоглобина: 0.3	In vitro	Рак желудка, SNU5, SNU16, SNU484, MKN1, и MKN45	[90]
Анти-миРНК- 221 и анти- миРНК-222	PNA конъюгаты с пептидом [Arg] ₈	Поздний апоптоз: U251: 2.13% (анти-миРНК-221); 2.14% (анти-миРНК-222); 1.54% (контроль); U373: 3.03% (анти-миРНК-221); 3.13% (контроль); T98G: 5.2% (анти-миРНК-221); 5.4% (анти-миРНК-222); 2.79% (контроль)	Поздний апоптоз : U251: 9.4%; U373: 8.2%; T98G: 14.4%	In vitro	Глиома, U251, U373 и T98G	[144]

				r		
Анти-миРНК- 106b, анти- миРНК-93 и анти- миРНК-25	Коммерческий ингибитор ("GenePharma Co. Ltd ", Китай)	Пролиферация: 10 ⁵ кл(анти-миРНК-106b, анти-миРНК-93 и анти- миРНК-25); 1.3×10 ⁵ кл (контроль); Миграция (число клеток): 50 (анти-миРНК- 106b); 63(анти-миРНК-93); 82(анти-миРНК-25); 85(контроль); Инвазия (число клеток): 40 ± 6 кл (анти-миРНК-106b); 45± 3 кл (анти-миРНК-106b); 45± 3 кл (анти-миРНК-93); 92± 5 кл (анти-миРНК-25); 103 ± 6 кл (контроль); Апоптоз: 10.6 ± 1.7 % (анти-миРНК- 106b); 8.9 ± 0.5% (анти- миРНК-93); 11.5 ± 1.5% (анти-миРНК-25); 8.4± 1.1 (контроль)	Пролиферация: 5×10 ⁴ кл; Миграция (число клеток): 40; Инвазия: 24 ± 4 кл; Апоптоз: 16.1 ± 2.1%	In vitro	Рак желудка, МGC 803	[124]
Анти-миРНК-221 и анти-миРНК- 222	2'OMe ON	Пролиферация*: 0.64 (анти-миРНК-221 и анти- миРНК-222); 0.95(scramble контроль); Клетки в G1 фазе клеточного цикла: 30.6% (анти-миРНК-221); 29.8% (анти-миРНК-222); 26.0% (scramble контроль); Объём опухоли: 2500 мм ³ (анти-миРНК-221) и анти-миРНК-222); 3100 мм ³ (контроль)	Пролиферация*:0.42; Клетки в G1 фазе клеточного цикла: 46.2%; Объём опухоли: 1600 мм ³	In vitro, In vivo	Глиобластома, U251	[143]

Анти-миРНК-21 и анти-миРНК-10b	2'OMe ON	Пролиферация*: 65±5.12% (анти-миРНК -10b); 75.2 ±9.00% (анти-миРНК-21); 95 ± 2.5% (scramble контроль); Клетки в G1 фазе клеточного цикла: 50% (анти-миРНК-10b); 57% (анти-миРНК-21); 35% (scramble контроль); Инвазия: 200 кл/поле (анти- миРНК-10b); 170 кл/поле (анти-миРНК-21); 350	Пролиферация*: 52.80 ±10.18%; Клетки в G1 фазе клеточного цикла: 67%; Инвазия: 50 кл/поле	In vitro	Глиобластома, U87MG	[72]
Анти-миРНК-21/ миРНК-155/ миРНК-17 МТg ON	ДНК МТд- АМО	кл/поле (scramble контроль) Пролиферация*: 40% (анти-миРНК-155); 52% (анти-миРНК-21); 78% (анти-миРНК-17)	Пролиферация*: 18% МТg- AMO; 35%(микс отдельных анти-миРНК ONs)	In vitro	Рак молочной железы, MCF-7	[156]
Поли- функциональный спонж к миРНК- 155, миРНК-21, миРНК-221 и миРНК-222	Эндогенная экспрессия	(анти-мигнк-17) Пролиферация*: 0.92 (анти-миРНК-21 спонж); 0.85 (анти-миРНК-155 спонж); 0.8 (анти-миРНК- 221 спонж)	Пролиферация*: 0.5	In vitro	Рак молочной железы, MDA-MB- 436, MCF-7	[157]
Поли- функциональный спонж к миРНК- 17, миРНК-18а, миРНК-19, и миРНК-92	Эндогенная экспрессия	Пролиферация*: 65% (анти-миРНК -18а спонж); 50% (анти-миРНК -19 спонж); 25% (анти-миРНК - 17 и анти-миРНК -20 спонж); 20% (анти-миРНК - 92 спонж); 90%(scramble контроль)	Пролиферация*: 10% (миРНК- 17, миРНК-18а, миРНК-19, и миРНК-92 полифункциональный спонж)	In vitro	Лимфома Ходжкина, КМ-Н2	[158]

миРНК- регулирующие препараты	Тип препарата	Эффекты монотерапии	Эффекты комбинированной терапии	In vitro/ In vivo	Тип опухоли/клеточная линия	Ссылка
	Комбинации синт	етических миРНК мимико	в для восстановления функций о	нкосупрес	сорных миРНК	
Пре-миРНК-34а, пре-миРНК-15а и пре-миРНК-16	Коммерческие препараты ("Ambion", США)	Клетки в G1 фазе клеточного цикла: 20% (pre-миРНК-15а/-16); 42% (pre-миРНК-34а); 5% (контроль)	Клетки в G1 фазе клеточного цикла: 57%	In vitro	Немелкоклеточный Рак лёгкого, А549, H2009, H1299 и H358	[164]
МиРНК-34а и миРНК-let-7b мимики	Коммерческие препараты ("Ambion", США)	Пролиферация*: 75% (миРНК-Let-7b); 60% (миРНК-34а); Инвазия (число клеток): 80 кл/поле (миРНК-34а); 53 кл/поле (миРНК-1et- 7b); 55 кл/поле (контроль); Размер опухоли *: 0.75 (миРНК-1et-7b);	Пролиферация*: 48%; Инвазия (число клеток): 10 кл/поле; Размер опухоли*: 0.45	In vitro, in vivo	Рак лёгкого, А549, H441 и H23	[147]
		(миг пк-кс-76), 0.7(миРНК-34а)				
Пре-миРНК-141 и пре-миРНК- 145	Коммерческие препараты ("Ambion" и "Life Technologies", США)	Миграция*: 0.84 (пре- миРНК-141 и пре-миРНК- 145)	Миграция *: 0.67	In vitro	Карцинома почек, 786-О и АСНN	[165]
Пре-миРНК-143 и пре-миРНК- 145	Коммерческие препараты ("GenePharma Co., Ltd", Китай)	Пролиферация *: 0.65 (пре-миРНК-143); 0.6 (пре-миРНК-145)	Пролиферация *: 0.35	In vitro	Колоректальный рак, Caco2, HT29 и SW480	[166]
Пре-миРНК-99а и пре-миРНК- 100	Коммерческие препараты	Пролиферация *: 0.6 (пре-миРНК-99а); 0.75 (пре-миРНК-100); 1.25 (scramble контроль)	Пролиферация *: 0.5	In vitro	Эзофагеальная плоскоклеточная карцинома, ЕС9706	[167]

МиРНК-99а и миРНК-497 мимики	Коммерческие препараты ("Ribo", Китай)	Пролиферация *: 0.8 (миРНК-99а мимик); 0.77 (миРНК-497 мимик); 1.1 (scramble контроль); Апоптоз: 19.22% (миРНК-99а); 26.28% (миРНК-497); 4.87% (контроль); Объём опухоли: 750 мм ³ (миРНК-497); 600 мм ³ (миРНК-99а); 1300 мм ³ (контроль); Вес опухоли: 0.8 г (миРНК-497); 0.6 г (миРНК-99а); 1.33 г (контроль)	Пролиферация *: 0.6; Апоптоз: 28.27%; Объём опухоли: 250 мм ³ ; Вес опухоли: 0.25 г	In vitro, in vivo	Гепатоцеллюлярная карцинома, Нер2G и Нер3В	[168]
МиРНК-497 и миРНК-34а мимики	Коммерческие препараты ("GenePharma Co., Ltd", Китай)	Пролиферация *: 0.43 (миРНК-34а мимик); 0.45 (миРНК-497 мимик); Колониеобразование *: 55% (миРНК-34а мимик); 60% (миРНК-497 мимик); Объём опухоли 200 мм ³ (миРНК-497); 450 мм ³ (миРНК-497); 450 мм ³ (контроль); Вес опухоли : 0.55 г (миРНК-34а); 0.45г (миРНК-497); 0.75г (контроль)	Пролиферация *: 0.28; Колониеобразование *:40%; Объём опухоли: 50 мм ³ ; Вес опухоли:0.2 г	In vitro, ex vivo	Рак лёгкого, А549, H1299, H460, H446, и QG56	[149]

МиРНК-193а и миРНК-600 мимики	Эндогенная экспрессия с помощью лентивирусного вектора	Колониеобразование (число колоний): 90 (миРНК-193а мимик); 100 (миРНК-600 мимик); 160 (scramble контроль); Апоптоз: 23% (миРНК- 193а); 17% (миРНК-600); 7% (контроль)	Колониеобразование (число колоний): 50; Апоптоз: 35%	In vitro, in vivo	Острая миелоидная лейкемия, К562 и THP1	[170]
МиРНК-126 и миРНК-34а мимики	Эндогенная экспрессия с помощью аденовирусного вектора	Пролиферация*: 80%(миРНК-126 и миРНК-34а мимики); 83% (scramble контроль); Миграция (число клеток): Panc-1 : 90 (миРНК-126); 80 (миРНК- 34а); 140 (контроль); Инвазия (число клеток): Рапс-1 : 75(миРНК-126 мимик); 70 (миРНК-34а мимик); 125 (контроль); Апоптоз: Panc1 : 13% (миРНК-126); 25%(миРНК-34а); 8%(контроль); Сара-2 : 5%(миРНК-34а); 8%(контроль); Объём опухоли : 1600 мм ³ (миРНК-126); 1450 мм ³ (миРНК-34а); 2250 мм ³ (контроль); Вес опухоли : 2 г (миРНК- 126); 1.6 г (миРНК-34а); 2.7 г (контроль)	Пролиферация*: 25%; Миграция (число клеток): Panc-1: 50; Инвазия (число клеток): Panc-1: 30; Апоптоз: Panc1:50%; Сара-2: 30%; Объём опухоли: 1000 мм ³ ; Вес опухоли: 1 г	In vitro, in vivo	Аденокарцинома поджелудочной железы, Panc-1 и SW1990	[148]

	Комбинации химиопрепаратов и миРНК-регулирующих олигонуклеотидных конструкций					
Пре-миРНК-429 и гемцитабин (Gem)	Коммерческий ингибитор ("Ribobio", Китай)	IC50 Gem: 215 мкМ; Объём опухоли: 620 мм ³ (Gem)	IC50 Gem: 115 мкМ; Объём опухоли: 300мм ³	In vitro, in vivo	Рак поджелудочной железы, SW1990	[196]
МиРНК-101 мимик и гемцитабин	Коммерческий ингибитор ("Quiagen", Германия):	Пролиферация *: PANC- 1: 0.35 (Gem); 0.39 (миРНК-101 мимик); Вх: 0.84 (Gem); 1.0 (миРНК- 101 мимик); AsPC-1: 0.53 (Gem или миРНК-101 мимик)	Пролиферация *: PANC-1: 0.19; Bx: 0.61; AsPC-1: 0.38	In vitro	Аденокарцинома поджелудочной железы, PANC-1, AsPC-1, MIA-PaCa2 и BxPC-3	[192]
МиРНК-634 и темозоломид (TMZ)	Коммерческий препарат ("GeneCopoecia", Китай)	IC50 TMZ: U87: 240 мкМ; U251: 260 мкМ; Пролиферация*: U87: 25% (TMZ); U251: 45% (TMZ); Апоптоз: 15% (миРНК-634); 16% (TMZ); 7% (контроль); Колониеобразование *: 55% (миРНК-634); 57% (TMZ)	IC50 TMZ: U87: 120 мкМ; U251: 100 мкМ; Пролиферация *: U87: 8%; U251: 10%; Апоптоз: 27%; Колониеобразование *: 18%	In vitro	Глиома, U251 и U87	[150]
МиРНК-1294 мимик и темозоломид	Коммерческий препарат ("GenePharma" , Китай)	IC50 TMZ: U87: >400 мкМ; U251: >400 мкМ; Пролиферация*: U87 и U251: 60% (TMZ)	IC50 TMZ : U87: 150 мкМ; U251: 200 мкМ; Пролиферация *: U87: 20%; U251: 35%	In vitro	Глиома, U87, U251, LN229 и A172	[195]
МиРНК-383 мимик и паклитаксел	Коммерческий препарат ("GenePharma" , Китай)	IC50 Паклитаксел: OVCAR-3: 3.0 мкМ; A2780: 1.5 мкМ; Aпоптоз: A2780: 13% (паклитаксел); 4% (контроль); OVCAR-3: 8% (паклитаксел); 3% (контроль)	IC50 Паклитаксел : OVCAR- 3: 1.8 мкМ; A2780: 0.3 мкМ; Апоптоз: A2780: 27%; OVCAR-3: 22%	In vitro	Рак шейки матки, A2780 и OVCAR-3	[193]

МиРНК-1291 prodrug и гемцитабин и nab-паклитаксел	Эндогенная экспрессия	ЕС50 GEM/nP: PANC-1: 155±33 нМ; AsPC-1 cells: 40.4±1.8 нМ; Вес опухоли: 200 мг (миРНК-1291 prodrug); 240 мг(gem/nP); 400 мг (контроль)	EC50 GEM/nP: PANC-1: 52.3±20.3 нМ; AsPC-1: 14.6±5.5 нМ; Вес опухоли: 100 мг	In vitro, in vivo	Рак поджелудочной железы, AsPC-1, PANC-1, и HEK293	[194]
МиРНК-205 мимик и гемцитабин	Эндогенная экспрессия с помощью лентивирусного вектора	МІА РаСа-2R клетки в G0/G1 фазе клеточного цикла: 52.62 ±0.002% (миРНК-205 мимик); 43.52 ±0.06% (контроль); Объём опухоли: 172.85 ± 17 мм ³ (gem); 298.46±54 мм ³ (миРНК-205 мимик); 475±100 мм3 ³ (контроль)	МІА РаСа-2R клетки в G0/G1 фазе клеточного цикла: 78.54 ± 0.01%; Объём опухоли: 77.83 ± 21 мм ³	In vitro, in vivo	Рак поджелудочной железы, MIA PaCa- 2, HPAF-II, BXPC- 3, HPDE и MIA PaCa-2R	[151]
МиРНК-151а мимик и темозоломид	Коммерческий вектор, экспрессирующи й миРНК ("Genechem", Китай)	Колониеобразование (число колоний): 330 (миРНК-151а мимик); 300 (TMZ); 380(контроль); IC50 TMZ: 400 мкМ; Объём опухоли: 1.0 см ³ (миРНК-151а мимик); 0.8 см ³ (TMZ); 1.1 см ³ (контроль); Продолжительность жизни: 87 суток (TMZ); 75 суток (миРНК-151а мимик); 65 суток (контроль)	Колониеобразование (число колоний): 100; IC50 TMZ: 150 мкМ; Объём опухоли: 0.3 см ³ ; Продолжительность жизни: 150 суток	In vitro, in vivo	Глиобластома, U251, T98G, LN229 и A172	[198]

МиРНК-222 мимик и сунитиниб	Коммерческий препарат ("Applied Biosystems", CIIIA)	Ангиогенез (общая длина сосудов)*: 0.63 (миРНК- 222 мимик); 0.2 (сунитиниб)	Ангиогенез общая длина сосудов)*: 0.1	In vitro	Рак почки, ACHN	[199]
Анти-миРНК-21 ON и сунитиниб	Коммерческий ингибитор LNA asON ("Exiqon", Дания)	Активность каспаз 3/7 *: 1.6 (сунитиниб); 4.5 (анти- миРНК-21 ON); 2.0 (scramble контроль); Пролиферация *: 78.2±10.8 (сунитиниб ог анти-миРНК-21)	Активность каспаз 3/7 *: 8.15; Пролиферация *: 56.52±14.48	In vitro	Глиобластома, U87	[200]
МиРНК-145 мимик и сунитиниб	Коммерческий препарат ("Dharmacon", США)	Пролиферация *: 42.8±6.2% (сунитиниб); 50±2 % (миРНК-145 мимик); Апоптоз: 18% (миРНК-145 мимик); 15% (сунитиниб); 5% (контроль); Клетки в G0/G1 фазе клеточного цикла: 65% (сунитиниб); 78% (миРНК- 145 мимик); 55% (контроль)	Пролиферация *: 28.5±5.1%; Апоптоз : 36%; Клетки в G0/G1 фазе клеточного цикла: 90%	In vitro	Глиобластома, U87	[201]
Пре-миРНК- 133b и сетуксимаб	Эндогенная экспрессия с вирусного вектора	Инвазия *: 0.3(сетуксимаб); 0.27 (пре- миРНК-133b); 0.43 (scramble контроль)	Инвазия *: 0.15	In vitro	Колоректальный рак, HT-29, SW480, SW620, Caco-2 и HCT-116	[294]
МиРНК-146а мимик и сетуксимаб	Коммерческий препарат ("Life Technologies", США)	Пролиферация (HepG2) *: 45% (миРНК-146а мимик ог сетуксимаб); Активность каспаз 3/7 *: 1.3 (миРНК-146а мимик); 4 (сетуксимаб)	Пролиферация (НерG2) *: 30%; Активность каспаз 3/7*: 5.5	In vitro	Гепатоцеллюлярная карцинома, НерG2, НерB3 и SNU449	[202]

Анти-миРНК-21 и гемцитабин	Коммерческий ингибитор ("GenePharma", Китай)	IC ₅₀ GEM: PANC-1: 38.92 мкМ; Mia PaCa-2: 38.29 мкМ; Апоптоз: PANC-1: 15% (gem); 25% (анти-миРНК- 21); 10% (контроль); Mia PaCa-2: 15% (gem); 25% (анти-миРНК-21); 9% (контроль); Пролиферация (Mia PaCa-2) *: 65% (gem); 50% (анти-миРНК-21); 105% (scramble контроль); Вес опухоли: 0.5 г (анти- миРНК-21); 0.65 г (gem); 0.9 г (контроль); Объём опухоли: 300 мм ³ (анти-миРНК-21); 560 мм ³ (gem); 800 мм ³ (контроль); Метастазы в печени (число/поле): 1.5/поле (анти-миРНК-21); 3 8/поле (gem): 3 3/поле	IC ₅₀ GEM: PANC-1: 22.38 мкМ; Mia PaCa-2: 6.65 мкМ; Апоптоз: PANC-1: 50%; Mia PaCa-2: 45%; Пролиферация (Mia PaCa-2) *:30%; Вес опухоли: 0.11 ± 0.01 г; Объём опухоли: 145.00 ± 7.25 MM ³ ; Метастазы в печени (число/поле): Полная элиминация метастазов	In vitro, in vivo	Рак поджелудочной железы, РАNC-1 и MIA PaCa-2	[152]
МиРНК let-7b мимик и паклитаксел	Коммерческий препарат ("Bioneer", США)	Апоптоз: 11.2% (паклитаксел); 4.4% (let-7b мимик); 2% (контроль); Инвазия: 150 кл/поле (паклитаксел); 180 кл/поле (let-7b мимик); 280 кл/поле (контроль); Объём опухоли: 450 мм ³ (паклитаксел); 650мм ³ (let- 7b мимик); 850 мм ³ (контроль)	Апоптоз: 27.7%; Инвазия: 50 кл/поле; Объём опухоли: 150 мм ³	In vitro, in vivo	Немелкоклеточный Рак лёгкого, А549	[153]

МиРНК-34а мимик и целекоксиб	Коммерческий препарат	Пролиферация*: 62.9% (миРНК-34а мимик); 53.1% (целекоксиб); Инвазия: 25.2 кл (миРНК- 34а мимик); 21.3 кл (целекоксиб); 30 кл (контроль); Миграция: 135 мкм (целекоксиб); 80 мкм (миРНК-34а мимик); 180мкм (контроль)	Пролиферация*: 44.9%; Инвазия: 12.6 кл; Миграция: 35 мкм	In vitro	Остеосаркома, MG63	[154]
МиРНК-205 мимик и гемцитабин	Коммерческий препарат ("Life Technologies", США)	Инвазия *: 60% (миРНК- 205 мимик); 145% (gem); Миграция *: 75% (миРНК-205 мимик); 110% (gem); Пролиферация *: MIA PaCa-2 ^R : 90% (gem); CAPAN-1 ^R : 85% (gem); Bec опухоли : 0.53 г (gem); 0.93 г (Контроль)	Инвазия*: 55%; Миграция*: 30%; Пролиферация*: MIA PaCa- 2 ^R : 42%; CAPAN-1 ^R : 46%; Вес опухоли: 0.14 г	In vitro, in vivo	Рак поджелудочной железы, М IA PaCa- 2 ^R и CAPAN-1 ^R	[197]
Анти-миРНК-21 и сунитиниб	Коммерческий ингибитор LNA ON ("Exiqon", Дания)	Объём опухоли: 90.9 ± 18.2 мм ³ (сунитиниб); 98.2 ± 43.8 мм ³ (контроль)	Обьём опухоли: 53.7 ± 43.7 _{ММ³}	In vivo	Глиобластома, GL261	[200]
МиРНК-205 мимик и гемцитабин	Коммерческий препарат ("Life Technologies", CША)	Вес опухоли: 0.75 г (gem); 0.9 г (контроль); Объём опухоли: 800 мм ³ (gem); 900 мм ³ (контроль)	Вес опухоли: 0.2 г; Объём опухоли: 100 мм ³	In vivo	Аденокарцинома поджелудочной железы	[151]
МиРНК-218 мимик и темозоломид	Коммерческий препарат	Вес опухоли: 0.2 г (миРНК-218 мимик); 0.05 г (темозоломид); 0.42 г (контроль)	Вес опухоли: 0.01 г	In vivo	Глиобластома, U87MG	[155]

*Эффект, выраженный в долях от показателя контрольных клеток (принят за 100% или 1.0).