

На правах рукописи



ГАПОНОВА СВЕТЛАНА КОНСТАНТИНОВНА

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

03.01.04 – биохимия

Автореферат  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2020

Работа выполнена в Институте химической биологии и фундаментальной  
медицины СО РАН

**Научный руководитель:**

**Патутина Ольга Александровна**, к.б.н.

**Официальные оппоненты:**

**Ажикина Татьяна Леодоровна**, д.б.н., профессор,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова РАН, зав. лабораторией

**Малыгин Алексей Аркадьевич**, д.х.н.  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО  
РАН, в.н.с.

**Сорокина Ирина Васильевна**, д.б.н., профессор  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Новосибирский институт органической химии имени Н.Н.  
Ворозцова СО РАН, в.н.с.

Защита состоится « 20 » ноября 2020 г. в 12 часов  
на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 при Институте  
химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу:  
630090, Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической  
биологии и фундаментальной медицины СО РАН

С авторефератом можно ознакомиться на сайте [www.niboch.nsc.ru](http://www.niboch.nsc.ru)

Автореферат разослан « 20 » октября 2020 г.

Учёный секретарь диссертационного совета  
к.х.н.

Коваль В. В.



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** В настоящее время большое внимание исследователей в области биологии привлекают короткие регуляторные молекулы микроРНК (миРНК). Нарушение баланса в экспрессии миРНК приводит к глобальной реорганизации фундаментальных процессов клетки, и нередко способствует инициации и прогрессированию целого ряда трудноизлечимых заболеваний, включая онкологические. При этом развитие злокачественных неоплазий в большинстве случаев ассоциировано с повышением экспрессии онкогенных миРНК.

Эффективным способом терапии миРНК-ассоциированных заболеваний может служить регуляция уровня и активности миРНК в клетке с помощью терапевтических нуклеиновых кислот, среди которых наиболее широкое применение получили антисмысловые олигонуклеотиды (asON). asON, являясь одноцепочечными фрагментами ДНК, комплементарно связываются с миРНК и либо блокируют её функцию, либо вызывают её деградацию под действием внутриклеточной РНКазы Н. Поиск новых химических модификаций asON остаётся актуальной и важной задачей на сегодняшний день, поскольку может обеспечить более высокий терапевтический потенциал нуклеиновых кислот.

Помимо антисмысловой технологии, перспективным подходом для снижения уровня миРНК может стать создание миРНК-направленных искусственных рибонуклеаз (иРНКаз), способных распознавать миРНК-мишень с помощью адресующего олигонуклеотида и вызывать её избирательную необратимую деградацию с помощью присоединенной к нему каталитической группы.

**Целью настоящей работы** являлась разработка и исследование биологических свойств двух типов миРНК-направленных препаратов на основе олигонуклеотидов: олигонуклеотид-пептидных конъюгатов и антисмысловых олигонуклеотидов, содержащих новую N-(метансульфонил)фосфорамидную ( $\mu$ -) модификацию.

В ходе работы решались следующие задачи:

1. Разработка структуры миРНК-направленных олигонуклеотид-пептидных конъюгатов путем отбора адресующих олигодезоксирибонуклеотидов по эффективности их связывания с миРНК-мишенью и анализ их гибридизационных свойств.
2. 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 олигонуклеотид-пептидных конъюгатов на их рибонуклеазную активность и биологические свойства.

5. Исследование гибридизационных свойств, нуклеазоустойчивости и РНКазы Н-активирующей способности миРНК-направленных олигонуклеотидов, содержащих N-(метансульфонил)фосфорамидную модификацию, в сравнении с природными и фосфотиоатными олигонуклеотидами.

6. 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 и практическая ценность работы.** Впервые в мире сконструированы и исследованы олигонуклеотид-пептидные конъюгаты, осуществляющие сиквент-специфическое расщепление биологически значимой миРНК-мишени – миРНК-21 в каталитическом режиме, которые действуют синергически с РНКазой Н. Впервые показано, что введение 2'-Оме-модификаций в состав олигонуклеотидной компоненты миРНК-направленных конъюгатов улучшает гибридизационные свойства и рибонуклеазную активность конъюгатов, сохраняя их способность подавлять пролиферацию и миграцию опухолевых клеток. Установлено, что за счёт специфического ингибирования миРНК-21 олигонуклеотид-пептидные конъюгаты индуцируют апоптоз, подавляют пролиферацию и инвазию опухолевых клеток, а также обеспечивают многократное снижение скорости опухолевого роста у мышей.

Впервые созданы и исследованы свойства миРНК-направленных антисмысловых олигонуклеотидов, содержащих новую N-(метансульфонил)фосфорамидную модификацию всех межнуклеотидных связей. Показано, что  $\mu$ -олигонуклеотиды обладают высокой нуклеазоустойчивостью и гибридизационными свойствами, а также в гетеродуплексе с миРНК являются субстратом РНКазы Н. Продemonстрировано, что за счёт специфического снижения уровня миРНК-21  $\mu$ -олигонуклеотиды индуцируют апоптоз опухолевых клеток, обеспечивают значительное снижение их пролиферации и миграции, при перитуморальном введении не оказывают токсического эффекта на организм животных, эффективно накапливаются в опухоли и обеспечивают многократное снижение скорости роста опухоли у мышей.

#### **Положения, выносимые на защиту**

– Для эффективного связывания шпильчных олигонуклеотид-пептидных конъюгатов (ОПК) с миРНК-21 длина участка, комплементарного миРНК, в олигонуклеотидной компоненте должна быть 14-16 нуклеотидов.

- ОПК с пептидом  $[(\text{LeuArg})_2\text{Gly}]_2$ , присоединенным к 5'-концу адресующего олигонуклеотида, осуществляют эффективное расщепление миРНК-21 преимущественно по связям после остатков гуанина. Скорость расщепления миРНК-21 5'-ОПК возрастает в присутствии РНКазы Н. Разработанные 5'-ОПК и РНКазы Н действуют синергически.
- 5'-ОПК проявляют высокий антипролиферативный, про-апоптотический и противоинвазивный эффект на клетках лимфосаркомы RLS<sub>40</sub> и меланомы B16 *in vitro* и обеспечивают многократное снижение скорости роста лимфосаркомы RLS<sub>40</sub> *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 KB-8-5.
- N-(метансульфонил)фосфорамидные ( $\mu$ -) олигонуклеотиды эффективно связываются с миРНК-21, обладают высокой нуклеазоустойчивостью и в гетеродуплексе с миРНК активируют РНКазу Н.
- миРНК-21-направленные  $\mu$ -олигонуклеотиды обладают высоким антипролиферативным, про-апоптотическим и анти-миграционным потенциалом на клетках меланомы B16. При перитюморальном введении  $\mu$ -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.

**Публикации и апробация работы.** По материалам работы опубликовано 6 печатных работ в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и SCOPUS. Результаты работы представлены на 10 российских и международных конференциях.

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

**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

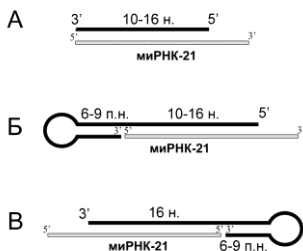
химии, ИХБФМ СО РАН). Разработка протокола синтеза и синтез олигонуклеотид-пептидных конъюгатов проведены Др. А. Вильямсом и проф. Е.В. Биченковой в Университете Манчестера в Великобритании (the University of Manchester, School of Health Sciences, Division of Pharmacy & Optometry). Синтез химически модифицированных олигонуклеотидов был проведён к.х.н. Е.А. Бураковой (Лаборатория химии нуклеиновых кислот, 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).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Разработка миРНК-направленных олигонуклеотид-пептидных конъюгатов, содержащих в качестве адресующей компоненты немодифицированные олигодезоксирибонуклеотиды, и исследование их биологических свойств

#### 1.1 Дизайн и исследование гибридизационных свойств олигонуклеотидов, выступающих в качестве адресующей компоненты миРНК-направленных иРНКаз

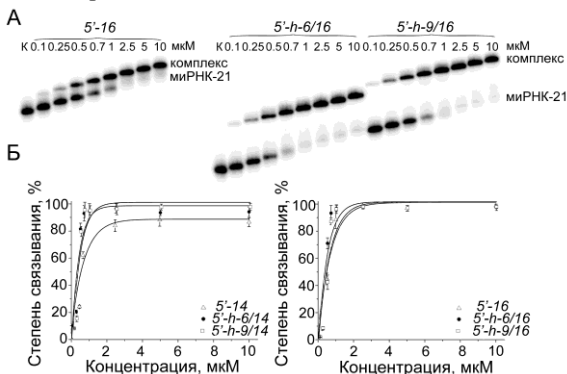
В целях выбора оптимальной структуры олигонуклеотидной компоненты иРНКаз, направленных к высокоонкогенной миРНК-21, был проведён скрининг по эффективности связывания с мишенью двух типов олигодезоксирибонуклеотидов: линейных с длиной участка, комплементарного миРНК-21, от 10 до 16 н. (Рис. 1 А), и шпилечных, которые содержали в своей структуре: (1) последовательность, комплементарную 5'-или 3'-области миРНК-21 длиной 10, 12, 14 или 16 н. и (2) шпильку, введенную в структуру адресующего олигонуклеотида с целью увеличения стабилизации комплекса с миРНК-21 за счет стэкинг-взаимодействий, со стеблем длиной 6 или 9 п.н. (Рис. 1 Б и В).



**Рис. 1.** Схематичное представление комплексов миРНК-21 с олигонуклеотидами различной структуры. Комплексы миРНК-21 с линейными олигонуклеотидами (А) и шпилечными 5'- (Б) и 3'-олигонуклеотидами (В).

Методом задержки в геле показано, что для олигонуклеотидов с длиной антисмыслового фрагмента не менее 14-16 н. наблюдается эффективное связывание с миРНК-21 (Рис. 2). Линейные олигонуклеотиды 5'-14 и 5'-16 при эквимольной концентрации гибридизуются с миРНК-21 с эффективностью 60 и 88%, соответственно (Рис. 2 А и Б). Шпилечные олигонуклеотиды 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 обладают наибольшей

эффективностью связывания с миРНК-21, которая составляет 97-100% при эквимоллярных концентрациях олигонуклеотидов и РНК (Рис. 2 А и Б). Основываясь на полученных данных, 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 создания миРНК-направленных иРНКаз.



**Рис. 2.** Гибридизация миРНК-21 с 5'-адресующими олигонуклеотидами. (А) Радиоавтографы 15%-ных нативных ПААГ, 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'-[<sup>32</sup>P]-миРНК-21 (1 мкМ) при 37 °С, в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl (рН 7.0), 200 мМ КСl, 1 мМ EDTA. К – миРНК-21 инкубировали в отсутствие олигонуклеотидов. (Б) Концентрационные зависимости гибридизации олигонуклеотидов с миРНК-21.

## 1.2 Дизайн миРНК-направленных иРНКаз

МиРНК-направленные олигонуклеотид-пептидные конъюгаты состояли из выбранных миРНК-21-адресованных олигонуклеотидов и каталитического пептида [(LeuArg)<sub>2</sub>Gly]<sub>2</sub> (Рис. 3). При синтезе конъюгатов присоединение каталитического пептида проводили путём формирования связи между С-концевой карбоксильной группой пептида и аминогруппой аминоксильного линкера, расположенного на 5'- или 3'-конце адресующего олигонуклеотида для 5'- и 3'-конъюгатов, соответственно (Рис. 3). В тексте конъюгаты отмечены полужирным шрифтом.

## 1.3 Исследование гибридизационных свойств иРНКаз

Анализ эффективности комплексообразования конъюгатов с миРНК-21 методом задержки в геле показал, что присоединение пептида к адресующему олигонуклеотиду не препятствует связыванию конъюгата с миРНК-21. При 5-кратном избытке все исследуемые конъюгаты связываются с мишенью с эффективностью 100%.

## 1.4. Исследование рибонуклеазной активности иРНКаз в условиях однооборотной и многооборотной реакций

### 1.4.1 Исследование рибонуклеазной активности иРНКаз в условиях однооборотной реакции





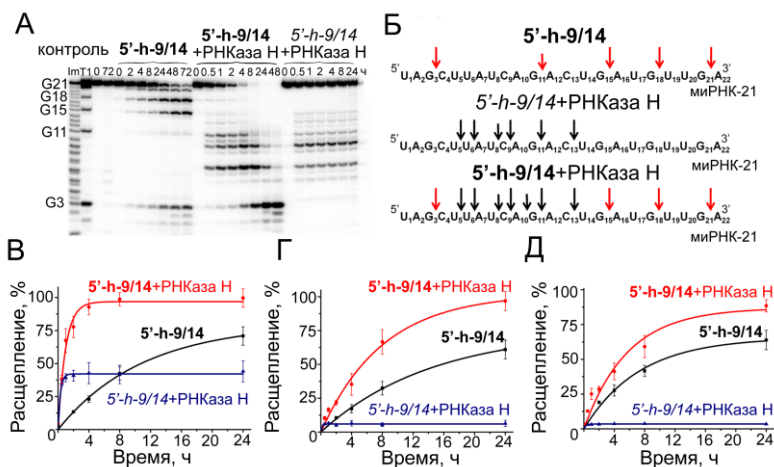
В зависимости от длины олигонуклеотидной компоненты выявлено два или три основных сайта расщепления миРНК-21 исключительно по G-X связям, где X = C, U или A. Связи, расположенные в непосредственной близости от места присоединения пептида, расщепляются конъюгатами более эффективно (Рис. 4 Б).

#### 1.4.2 Исследование рибонуклеазной активности иРНКаз в условиях многооборотной реакции

Исследование эффективности расщепления миРНК-21 в условиях многооборотной реакции проводили для конъюгата **5'-h-9/14** при концентрации 5 мкМ и миРНК-21 при концентрациях 10 мкМ, 25 мкМ и 50 мкМ. Выявлено, что эффективность расщепления миРНК-21 конъюгатом **5'-h-9/14** в условиях различного избытка РНК составляла 83-87% по истечении 72 ч, что свидетельствует о работе конъюгата в каталитическом режиме.

#### 1.5 Исследование каталитической активности иРНКаз в присутствии РНКазы Н

Исследование эффективности расщепления миРНК конъюгатом **5'-h-9/14** в присутствии РНКазы Н проводили в условиях 2-, 5- и 10-кратного избытка миРНК-21 относительно конъюгата или олигонуклеотида (Рис. 5).



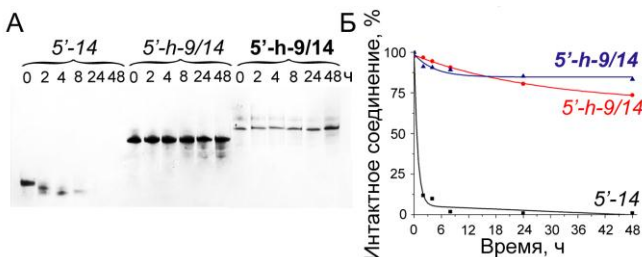
**Рис. 5.** Расщепление  $5'-[^{32}P]$ -миРНК-21 под действием конъюгата **5'-h-9/14** и/или РНКазы Н. (А). Радиоавтограф 18%-ного денатурирующего ПААГ, демонстрирующего расщепление миРНК-21 в условиях 2-кратного избытка миРНК-21 по отношению к конъюгату или олигонуклеотиду. Дорожки Im и T1 – частичное расщепление  $5'-[^{32}P]$ -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 – 100 ед. акт./мл. (Б) Сights расщепления миРНК-21 конъюгатом (красные стрелки), РНКазой Н (черные стрелки). Кинетика расщепления миРНК-21 конъюгатом, РНКазой Н, комбинацией конъюгата и РНКазы Н в условиях (В) 2-, (Г) 5- и (Д) 10-кратного избытка миРНК, соответственно.

Показано, что РНКазы Н расщепляет миРНК-21 в комплексе с олигонуклеотидом 5'-h-9/14 по связям U<sub>6</sub>A<sub>7</sub>, C<sub>9</sub>A<sub>10</sub>, и G<sub>11</sub>A<sub>12</sub> (Рис. 5 А и Б). В комплексе миРНК-21 с конъюгатом, расщепление происходит как по G-X связям, характерным для конъюгата 5'-h-9/14 (G<sub>3</sub>C<sub>4</sub>, G<sub>15</sub>A<sub>16</sub>, G<sub>18</sub>U<sub>19</sub>, и G<sub>21</sub>A<sub>22</sub>), так и по связям, чувствительным для РНКазы Н (U<sub>6</sub>A<sub>7</sub>, C<sub>9</sub>A<sub>10</sub>, и G<sub>11</sub>A<sub>12</sub>) (Рис. 5 А и Б).

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, соответственно, по сравнению с действием только конъюгата (Рис. 5 В, Г, Д), а количество оборотов реакции возрастало в 15.6, 7.0 и 4.6 раз, соответственно. Полученные данные вне сомнения свидетельствуют о синергическом действии разработанного конъюгата и РНКазы Н.

## 1.6 Исследование нуклеазоустойчивости миРНК-направленных иРНКаз в ростовой среде в присутствии сыворотки

Исследование нуклеазоустойчивости конъюгатов по сравнению с олигонуклеотидами в среде, содержащей 10%-ную бычью эмбриональную сыворотку (FBS), показало, что наличие шпильки на 3'-конце и пептида на 5'-конце олигонуклеотида обеспечивает высокий уровень стабильности к действию сывороточных нуклеаз: через 48 ч конъюгат 5'-h-9/14 сохраняется в интактном состоянии на 95% (Рис. 6).



**Рис. 6.** Стабильность адресующих олигонуклеотидов 5'-14, 5'-h-9/14 и конъюгата 5'-h-9/14 в среде, содержащей 10%-ную FBS. (А) Разделение продуктов деградации олигонуклеотидов и конъюгата в 15%-ном денатурирующем ПААГ. Окраска Stains-AlI. (Б) График, отражающий степень деградации соединений в зависимости от времени инкубации.

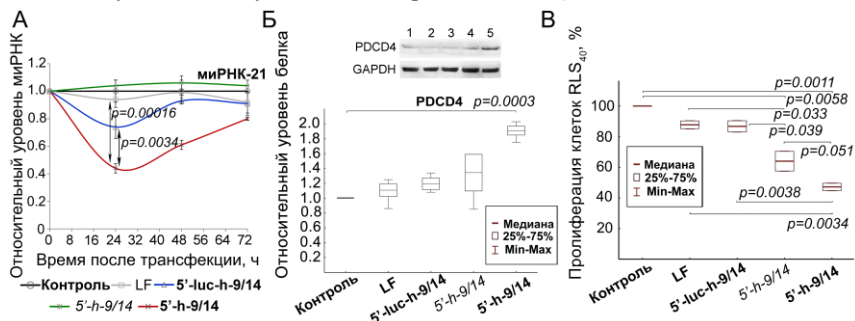
## 1.7 Исследование биологической активности миРНК-направленных иРНКаз на культурах опухолевых клеток

### 1.7.1. Влияние миРНК-направленных иРНКаз на уровень миРНК и её белков мишеней в клетках лимфосаркомы RLS<sub>40</sub>, а также пролиферацию клеток RLS<sub>40</sub>

Методом stem-loop ПЦР выявлено, что конъюгат 5'-h-9/14 через 24 ч после трансфекции снижает уровень миРНК-21 в клетках RLS<sub>40</sub> более чем в 2 раза по сравнению с контрольными интактными клетками и клетками, обработанными Lipofectamine2000<sup>TM</sup> (Рис. 7 А). Посредством Вестерн Блот анализа выявлено, что под действием конъюгата 5'-h-9/14 наблюдалось

достоверное увеличение уровня белка PDCD4 – прямой мишени миРНК-21, в 1.9 раз по сравнению с интактными клетками (Рис. 7 Б).

Методом МТТ теста, показано, что конъюгат **5'-h-9/14** вызывает 50%-ное ингибирование пролиферации клеток лимфосаркомы, что в 1.4 раза превосходит эффект антисмыслового олигонуклеотида **5'-h-9/14**, который способствует 30%-ному подавлению роста клеток (Рис. 7 В).



**Рис. 7.** Биологическая активность конъюгата **5'-h-9/14** в клетках лимфосаркомы RLS<sub>40</sub>. (А) Уровень миРНК-21 в клетках RLS<sub>40</sub>, определённый методом stem-loop ПЦР в режиме реального времени. Уровень миРНК-21 нормировали на уровни миРНК U6 и миРНК гена Rpl30. (Б) Уровень белка PDCD4, определённый методом Вестерн блот гибридизации через 48 ч после трансфекции клеток RLS<sub>40</sub> соединениями. Уровень белка PDCD4 нормировали на уровень белка GAPDH. (1) – Контроль, интактные клетки RLS<sub>40</sub>, (2) – LF, клетки RLS<sub>40</sub>, инкубированные с Lipofectamine 2000<sup>TM</sup>, (3, 4, 5) – **5'-luc-h-9/14**, **5'-h-9/14**, **5'-h-9/14**, клетки RLS<sub>40</sub> трансфицированные 1 мкМ контрольным конъюгатом, адресующим олигонуклеотидом и анти-миРНК-21 конъюгатом, соответственно. (В) Пролиферативный потенциал клеток RLS<sub>40</sub> через 72 ч после трансфекции.

## 1.7.2. Влияние миРНК-направленных иРНКаз на инвазию и апоптоз клеток меланомы В16

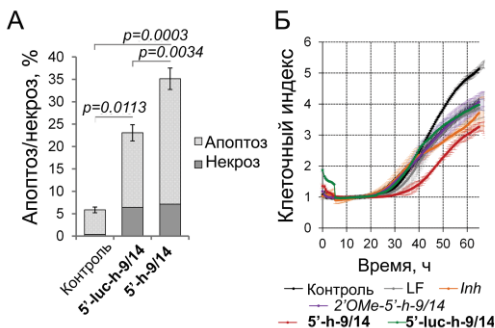
Методом Annexin V-FITC/PI с последующей проточной цитофлуориметрией выявлено, что специфический конъюгат **5'-h-9/14**, способствует индукции апоптоза 28% популяции клеток В16 через 48 ч, что приблизительно в 6 раз выше по сравнению с контролем и в 1.6 раз выше по сравнению с контрольным конъюгатом (Рис. 8 А).

Исследование противoinвазивного потенциала с помощью системы регистрации в режиме реального времени xCelligence выявило, что конъюгат **5'-h-9/14** вызывает подавление инвазии опухолевых клеток на 50% по сравнению с контролем и контрольным конъюгатом, действуя более эффективно, чем коммерческий ингибитор миРНК-21 ("Ambion", США) (Рис. 8 Б).

## 1.8 Влияние миРНК-направленных иРНКаз на рост лимфосаркомы RLS<sub>40</sub> у мышей

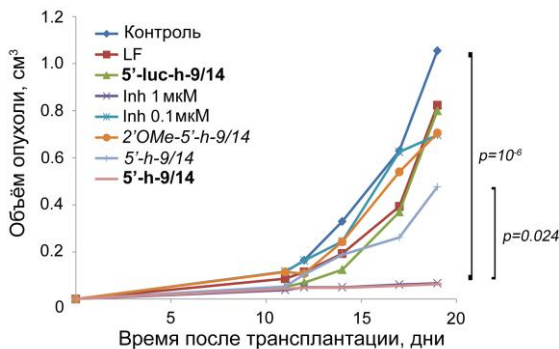
Подавление роста опухоли под действием конъюгата **5'-h-9/14** проводили на мышах с использованием модели солидной опухоли RLS<sub>40</sub> *ex vivo*. *In vitro*

трансфекция полученной из асцита первичной культуры клеток RLS<sub>40</sub> с помощью Lipofectamine2000<sup>TM</sup> показала, что олигонуклеотид 5'-h-9/14 снижает скорость опухолевого роста приблизительно на 50% (Рис. 9). Трансфекция опухолевых клеток анти-миРНК-21 конъюгатом 5'-h-9/14 приводит к снижению скорости роста опухоли на 94% по сравнению с контролем (Рис. 9).



**Рис. 8.** Про-апоптотическое и противоинвазивное действие конъюгата 5'-h-9/14 на клетках меланомы B16 мыши. (А) Процент апоптотических (в состоянии раннего и позднего апоптоза) и некротических клеток B16. (Б) Инвазивная активность клеток B16 после инкубирования с Lipofectamine2000<sup>TM</sup> (LF), олигодезоксирибонуклеотидом 5'-h-9/14, 2'-ОМе-олигонуклеотидом 2'OMe-5'-h-9/14, коммерческим ингибитором миРНК-21 (Inh), конъюгатом 5'-h-9/14 и контрольным конъюгатом 5'-luc-h-9/14 в концентрации 1 мкМ. Контроль – интактные клетки B16.

Высокая эффективность действия разработанных иРНКаз позволила ввести для их обозначения специальный термин – «миРНКаза» (от «рибонуклеаза, расщепляющая миРНК»).



**Рис. 9.** Противоопухолевое действие конъюгата 5'-h-9/14. Динамика роста опухоли RLS<sub>40</sub> после имплантации мышам линии CBA интактных клеток RLS<sub>40</sub> (Контроль), клеток, обработанных Lipofectamine2000<sup>TM</sup> (LF), клеток, обработанных Lipofectamine2000<sup>TM</sup> (LF), коммерческим ингибитором миРНК-21 («Ambion», США) в концентрациях 0.1 мкМ (Inh 0.1, концентрация, рекомендованная производителем) и 1 мкМ (Inh 1), 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.

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

В целях исследования влияния химических модификаций олигонуклеотидной компоненты конъюгатов на их биологические свойства, на основе конъюгата **5'-h-6/14** было создано два типа 2'-ОМе-рибонуклеаз: **2'-ОМе-миРНКаз** (1), в которой область олигонуклеотида, комплементарная миРНК-21, была полностью модифицирована; и **2'-ОМе-миРНКаз** (2), которая имела такую же структуру, как **2'-ОМе-миРНКаз** (1) за исключением того, что три нуклеотида с 5'-конца, расположенные в непосредственной близости к точке присоединения каталитического пептида, были оставлены без модификации (Рис. 10).

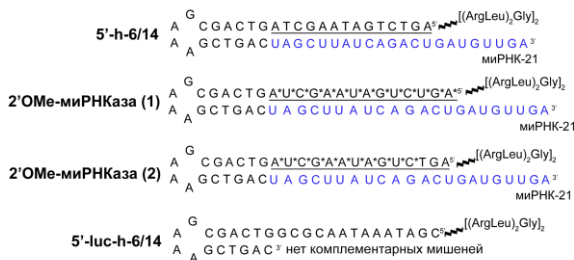


Рис. 10. Структура комплексов миРНК-21 со специфическими конъюгатами **5'-h-6/14**, **2'-ОМе-миРНКаз** (1) и (2) и контрольным конъюгатом **5'-luc-h-6/14**. Синим цветом отмечена последовательность миРНК-21.

### 1.9.1 Исследование гибридизационных свойств миРНК-направленных 2'-ОМе-иРНКаз

Методом задержки в геле показало, что введение 2'-ОМе-модификаций улучшает гибридизационные свойства конъюгатов по сравнению с их ДНК-аналогом (Рис. 11). Количественное связывание для **2'-ОМе-миРНКаз** (1) и (2) наблюдалось уже при концентрации 2.5 мкМ, тогда как для конъюгата **5'-h-6/14** 96%-ное связывание с РНК-мишенью наблюдается при концентрациях 5 мкМ и выше (Рис. 11 А и Б).

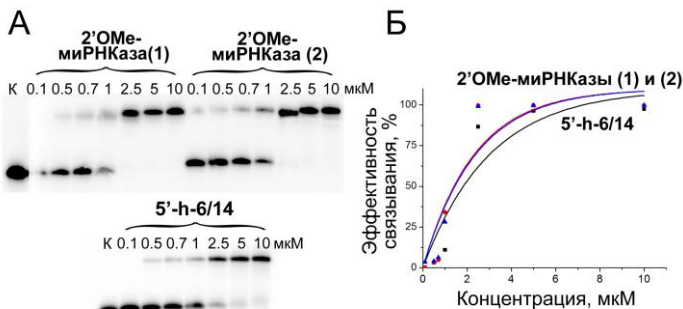
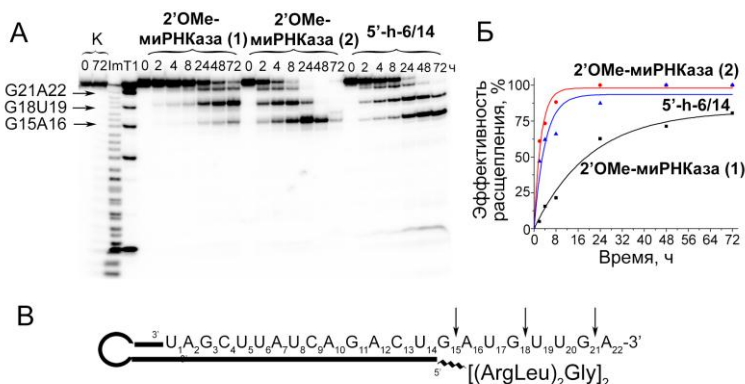


Рис. 11. Гибридизационные свойства модифицированных конъюгатов. (А) Радиоавтограф 15%-ного нативного ПААГ, демонстрирующий связывание миРНКаз с миРНК-21. 5'-[<sup>32</sup>P]-миРНК-21 (1 мкМ) инкубировали с конъюгатами (0.1 – 10 мкМ) при 37 °С в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl (рН 7.0), 200 мМ КCl, 1 мМ EDTA, в течение 1 ч. К – миРНК-21 инкубировали в отсутствие конъюгатов. (Б) Концентрационная зависимость связывания конъюгатов с миРНК-21.

### 1.9.2 Исследование рибонуклеазной активности миРНК-направленных 2'ОМе-иРНКаз в условиях однооборотной и многооборотной реакций

Анализ рибонуклеазной активности модифицированных конъюгатов выявил, что как в условиях однооборотной, так и в условиях многооборотной реакции полная замена дезоксирибонуклеотидного остова в адресующей области олигонуклеотида на 2'ОМе-модифицированный фрагмент вызывает значительное снижение рибонуклеазной активности конъюгата. В условиях однооборотной реакции полностью модифицированный конъюгат **2'ОМе-5'-h-6/14 (1)** расщепляет миРНК-21 на 22% через 8 ч, а немодифицированный конъюгат **5'-h-6/14** – на 66% за то же время (Рис. 12 А и Б). Отсутствие модификаций олигонуклеотида в области присоединения пептида в структуре конъюгата **2'ОМе-миРНКазы (2)**, наоборот, способствует увеличению эффективности расщепления миРНК мишени до 89% через 8 ч (Рис. 12 А и Б). Так же как и конъюгат **5'-h-6/14**, 2'ОМе-модифицированные иРНКазы расщепляют миРНК-21 преимущественно по G-X связям (где X = A, U, C) (Рис. 12 В).

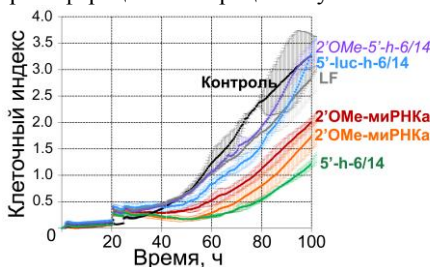


**Рис. 12.** Кинетика расщепления 5'-[<sup>32</sup>P]-миРНК-21 конъюгатом **5'-h-6/14** и **2'ОМе-миРНКазы**. (А) Радиоавтограф 18%-ного денатурирующего ПААГ. Дорожки T1 и Im – частичное расщепление 5'-[<sup>32</sup>P]-миРНК-21 РНКазой T1 и в 2 М имидазоле, соответственно (Б) Кинетическая зависимость расщепления миРНК-21 в условиях однооборотной реакции. 5'-[<sup>32</sup>P]-миРНК-21 (1 мкМ) инкубировали с конъюгатами (20 мкМ) при 37 °С в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl (рН 7.0), 200 мМ КCl, 1 мМ EDTA, в течение 72 ч. (В) Схематичное изображение комплексов миРНК-21/2'ОМе-конъюгат. Стрелки указывают на сайты расщепления миРНК-21 2'ОМе-конъюгатами.

### 1.9.3 Исследование биологической активности миРНК-направленных 2'ОМе-иРНКаз на культуре клеток эпидермоидной карциномы человека KB-8-5

Оценка антипролиферативного потенциала конъюгатов с помощью системы xCELLigence показала, что через 72 ч после трансфекции клеток **2'ОМе-миРНКазой (1)**, **2'ОМе-миРНКазой (2)** и конъюгатом **5'-h-6/14** происходит значительное снижение скорости пролиферации клеток: на 58%,

48% и 75%, соответственно, по сравнению с контрольными клетками (Рис. 13). Исследование миграционной активности клеток KB-8-5 методом зарастания царапины (scratch assay) выявило, что **2'ОМе-миРНКаза (2)** и конъюгат **5'-h-6/14** снижают миграцию опухолевых клеток на 55% и 38%, соответственно. Таким образом, введение 2'ОМе-модификаций не влияет на способность конъюгатов осуществлять миРНК-опосредованную регуляцию пролиферации и миграции опухолевых клеток.

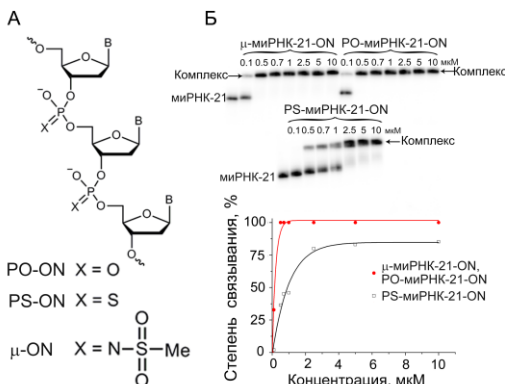


**Рис. 13.** Пролiferация клеток KB-8-5 после трансфекции ДНК и 2'ОМе-олигонуклеотид-пептидными конъюгатами. Скорость роста клеток KB-8-5 после трансфекции 5'-luc-h-6/14, 5'-h-6/14, 2'ОМе-миРНКазой (1), 2'ОМе-миРНКазой (2) и олигонуклеотидом 2'ОМе-5'-h-6/14 в концентрации 0.5 мкМ в комплексе с Lipofectamine2000™

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

### 2.1 Дизайн миРНК-направленных μ-олигонуклеотидов

Недавно в ИХБФМ СО РАН к.х.н. Д.А. Стеценко была разработана N-(метансульфонил)фосфорамидная (μ-) модификация межнуклеотидных связей, в которой немолекулярный атом кислорода фосфодиэфирной связи был заменен на азот с присоединённой к нему метансульфонильной группой (Рис. 14 А). В работе были исследованы биологические свойства полностью модифицированных μ-олигонуклеотидов, адресованных к миРНК-21, миРНК-17 и миРНК-155.



**Рис. 14.** Структура модификаций и гибридационные свойства олигонуклеотидов. (А) Структура PO-, PS-, и μ-межнуклеотидных связей. (Б) Гибридация олигонуклеотидов с 5'-[<sup>32</sup>P]-миРНК-21. Радиоавотграфы 15%-ных нативных ПААГ и концентрационная зависимость связывания μ-миРНК-21-ON, PS-миРНК-21-ON и PO-миРНК-21-ON с миРНК-21. 5'-[<sup>32</sup>P]-миРНК-21 (1 мкМ) инкубировали с олигонуклеотидами (0.1 – 10 мкМ) при 37 °С в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl (pH 7.0), 200 мМ KCl, 1 мМ EDTA, в течение 1 ч. К – миРНК-21 инкубировали в отсутствие олигонуклеотидов.



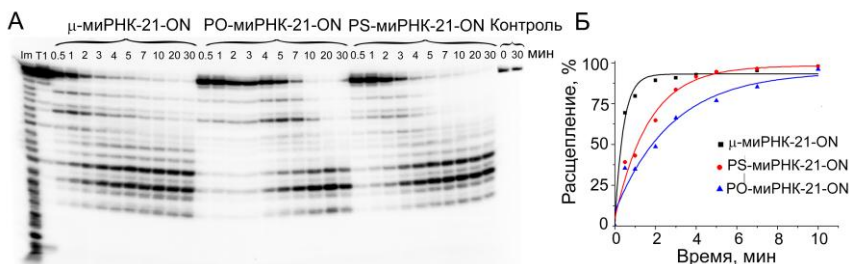
## 2.2 Исследование гибридизационных свойств $\mu$ -олигонуклеотидов

Методом задержки в геле было показано, что гибридизационные свойства  $\mu$ -олигонуклеотидов сопоставимы с гибридизационными свойствами немодифицированного олигонуклеотида РО-миРНК-21-ОН: количественное связывание с миРНК-21 наблюдается при эквимоллярных концентрациях (1 мкМ) (Рис. 14 Б). Фосфотиоатный олигонуклеотид связывается с миРНК-21 с эффективностью не более 85% при концентрации 10 мкМ (Рис. 14 Б).

## 2.3 Исследование РНКазы Н-активирующей способности $\mu$ -олигонуклеотидов

Инкубирование дуплексов 5'-[ $^{32}$ P]-миРНК-21 и олигонуклеотидов в присутствии РНКазы Н выявило, что гетеродуплексы  $\mu$ -олигонуклеотидов и миРНК-21 являются субстратами РНКазы Н (Рис. 15 А и Б).

Скорость расщепления миРНК-21 РНКазой Н в гетеродуплексе с  $\mu$ -олигонуклеотидом более, чем в 3 раза превосходит скорость расщепления в комплексах с РО- и PS- олигонуклеотидами, о чём свидетельствуют значения эффективных констант скорости расщепления:  $k_{eff} = 28.3 \pm 2.2$ ,  $8.7 \pm 0.6$  и  $6.4 \pm 0.6 \times 10^{-6} \text{ с}^{-1}$  для  $\mu$ -миРНК-21-ОН, PS-миРНК-21-ОН и РО-миРНК-21-ОН, соответственно.



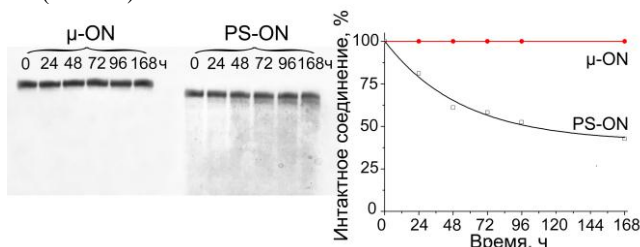
**Рис. 15.** Расщепление миРНК-21 в гетеродуплексе с олигонуклеотидами под действием РНКазы Н. (А) Радиоавтограф 18%-ного денатурирующего ПААГ, демонстрирующий разделение продуктов расщепления миРНК-21 под действием РНКазы Н в гетеродуплексах с  $\mu$ -, PS- и РО-миРНК-21-ОН. Дуплексы миРНК-21 (1 мкМ) инкубировали с олигонуклеотидами (1 мкМ) при 37 °С в буфере, содержащем 20 мМ Трис-НСl (рН 7.8), 40 мМ КСl, 8 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ DTT, в течение 30 мин в присутствии РНКазы Н в концентрации 85 ед.акт./мл. Дорожки 1m и T1 – частичное расщепление 5'-[ $^{32}$ P]-миРНК-21 РНКазой T1 и в 2 М имидазоле, соответственно. Контроль – РНК инкубировали в отсутствие олигонуклеотидов и в присутствии РНКазы Н. (Б) Кинетика расщепления миРНК-21 под действием РНКазы Н в гетеродуплексах с  $\mu$ -миРНК-21-ОН, PS-миРНК-21-ОН и РО-миРНК-21-ОН.

## 2.4 Исследование нуклеазоустойчивости $\mu$ -олигонуклеотидов в ростовой среде

Исследование стабильности олигонуклеотидов в ростовой среде, содержащей 10%-ную FBS показало, что  $\mu$ -миРНК-21-ОН проявляет крайне высокую нуклеазоустойчивость и остаётся интактным в течение 168 ч (Рис.



16). В таких условиях лишь 42% фосфотиоатного олигонуклеотида остаются интактными (Рис. 16).

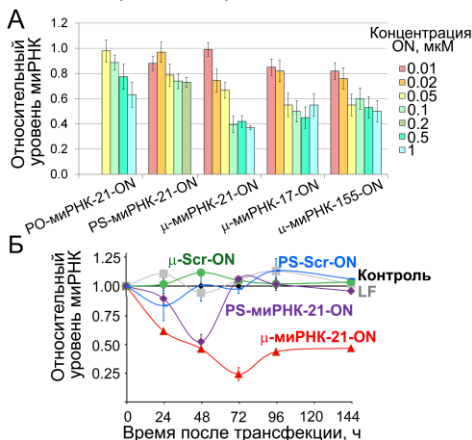


**Рис. 16.** Стабильность  $\mu$ - и PS-олигонуклеотидов в среде с 10%-ной сывороткой. Фотография 12%-ного денатурирующего ПААГ и кинетическая зависимость деградации олигонуклеотидов в среде с 10%-ной FBS. Окрашивание геля Stains-All. Олигонуклеотиды инкубировали в среде с 10%-ной FBS при 37 °C в течение 168 ч.

## 2.5 Исследование биологической активности $\mu$ -олигонуклеотидов на культуре клеток меланомы B16 мыши

### 2.5.1 Влияние $\mu$ -олигонуклеотидов на уровень миРНК в опухолевых клетках: концентрационные и кинетические параметры подавления онкогенных миРНК

Методом stem-loop ПЦР было показано, что PO-миРНК-21-ON (1 мкМ) и PS-миРНК-21-ON (0.05 – 0.2 мкМ) в комплексе с Lipofectamine2000<sup>TM</sup> способствуют подавлению миРНК-21 на 25-30%, а  $\mu$ -миРНК-21-ON (0.1–1 мкМ) снижает уровень миРНК-21 на 60% через 24 ч после трансфекции клеток B16 (Рис. 17 А).



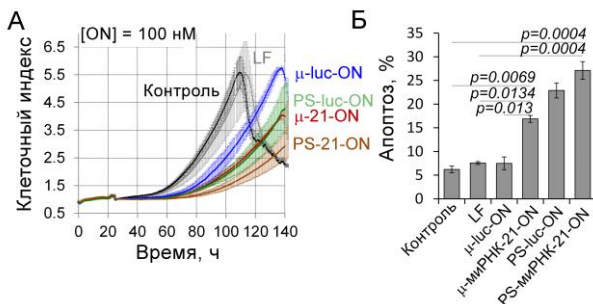
**Рис. 17.** Уровень онкогенных миРНК-21, миРНК-17 и миРНК-155 в клетках меланомы B16 после трансфекции  $\mu$ -, PO- и PS-олигонуклеотидами. (А) Степень подавления миРНК-21, миРНК-17 и миРНК-155 под действием  $\mu$ -, PO- и PS-олигонуклеотидов в зависимости от концентрации олигонуклеотидов через 24 ч после трансфекции. (Б) Кинетика подавления миРНК-21 специфическими  $\mu$ - и PS-олигонуклеотидами. Уровень миРНК-21 измеряли методом stem-loop ПЦР и нормировали на уровень малой ядерной РНК U6.

Длительность действия  $\mu$ -миРНК-21-ON составила более чем 144 ч с максимумом подавления 75% через 72 ч после трансфекции (Рис. 17 Б). Схожая эффективность и длительность снижения уровня миРНК была выявлена и для олигонуклеотидов  $\mu$ -миРНК-155-ON и  $\mu$ -миРНК-17-ON. В

свою очередь, ингибирующий эффект PS-миРНК-21-ON составил не более 50% через 48 ч и полностью нивелировался через 72 ч после трансфекции (Рис. 17 Б). Стоит отметить, что мезильные олигонуклеотиды не оказывали перекрёстного влияния на уровень других миРНК, что указывает на высокую специфичность их действия.

### 2.5.2 Влияние $\mu$ -олигонуклеотидов на пролиферативный потенциал опухолевых клеток

Оценка влияния олигонуклеотидов на пролиферацию клеток меланомы B16 с помощью системы xCELLigence показала, что через 115 ч после трансфекции  $\mu$ -миРНК-21-ON (100 нМ) наблюдается специфическое замедление роста опухолевых клеток на 58% по сравнению с интактными клетками и 32% по сравнению с контрольным олигонуклеотидом  $\mu$ -luc-ON (Рис. 18 А). 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 (Рис. 18 А).



**Рис. 18.** Антипролиферативное и про-апоптотическое действие  $\mu$ - и PS-олигонуклеотидов в клетках меланомы B16. (А) Оценка влияния олигонуклеотидов в концентрации 100 нМ на пролиферативную активность клеток B16 в режиме реального времени. (Б) Процент клеток меланомы B16 в состоянии апоптоза (ранний и поздний апоптоз) через 48 ч после трансфекции олигонуклеотидов в концентрации 100 нМ. Данные представлены как среднее  $\pm$  ст. отклонение от трёх независимых экспериментов.

### 2.5.3 Исследование индукции апоптоза в опухолевых клетках под действием $\mu$ -олигонуклеотидов

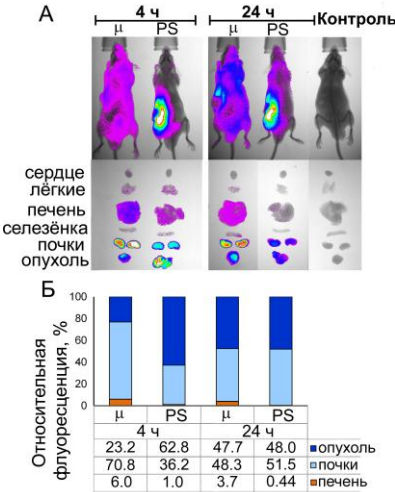
Методом окрашивания клеток Annexin V-FITC и PI с последующей цитофлуориметрией показано, что олигонуклеотид  $\mu$ -миРНК-21-ON (100 нМ) способствует индукции апоптоза 17% популяции клеток B16 через 48 ч, что в три раза выше по сравнению с контролями (Рис. 18 Б). Обработка клеток PS-luc-ON и PS-миРНК-21-ON приводит к индукции апоптоза 23 и 27% популяции клеток B16, соответственно, без статистически значимых отличий между действием контрольного и специфического PS-олигонуклеотидов (Рис. 18 Б).

### 2.5.4 Влияние $\mu$ -олигонуклеотидов на миграционные свойства опухолевых клеток

Методом «заращения царапины» (scratch-теста) выявлено, что через 72 ч инкубации с  $\mu$ -миРНК-21-ON наблюдается замедление миграции опухолевых клеток меланомы B16 в 19 раз по сравнению с контролем и в 6 раз по сравнению с контрольным олигонуклеотидом  $\mu$ -luc-ON. В свою очередь, PS-миРНК-21-ON обеспечивает 5-кратное подавление миграции по сравнению с контролем и двукратное по сравнению с контрольным PS-luc-ON.

### 2.5.5 Исследование биораспределения $\mu$ -олигонуклеотидов у мышей-опухоленосителей

Исследование биораспределения модифицированных олигонуклеотидов на мышах линии SCID с ксенографтом опухоли эпидермоидной карциномы KB-8-5 человека показало, что в результате перитюморальной инъекции  $\mu$ - или PS-олигонуклеотидов в комплексе с фолат-содержащими катионными липосомами F накопление происходит в основном в почках и опухолевой ткани (Рис. 19). Через 24 ч после инъекции относительное содержание модифицированных олигонуклеотидов в опухоли составило 48% (Рис. 19 Б).



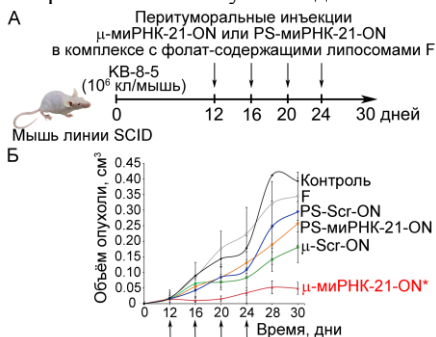
**Рис. 19.** Биораспределение Cy5.5-меченных  $\mu$ - и PS-олигонуклеотидов в мышах-опухоленосителях линии SCID. (А) Визуализация флуоресценции мышей-опухоленосителей линии SCID и их органов через 4 и 24 ч после перитюморального введения модифицированных олигонуклеотидов в дозе 40 мкг/мышь в комплексе с фолат-содержащими катионными липосомами F. Контроль – мышь без инъекции. (Б) Биораспределение модифицированных олигонуклеотидов во внутренних органах и опухоли в процентах через 4 и 24 ч после перитюморального введения.

### 2.6 Исследование биологической активности $\mu$ -олигонуклеотидов *in vivo* на модели эпидермоидной карциномы человека KB-8-5

#### 2.6.1 Влияние $\mu$ -олигонуклеотидов на скорость роста опухоли KB-8-5 у мышей

Исследование противоопухолевого потенциала модифицированных олигонуклеотидов показало, что на 30-ый день после трансплантации опухоли KB-8-5 мышам линии SCID перитюморальные инъекции  $\mu$ -миРНК-21-ON в комплексе с катионными липосомами F способствовали снижению объема опухоли в 8 раз по сравнению с контролем и приблизительно в 5 раз по сравнению с фосфотиоатным аналогом и контрольным олигонуклеотидом  $\mu$ -Scr-ON (Рис. 20). Введение PS-миРНК-21-ON вызывало 2-кратное

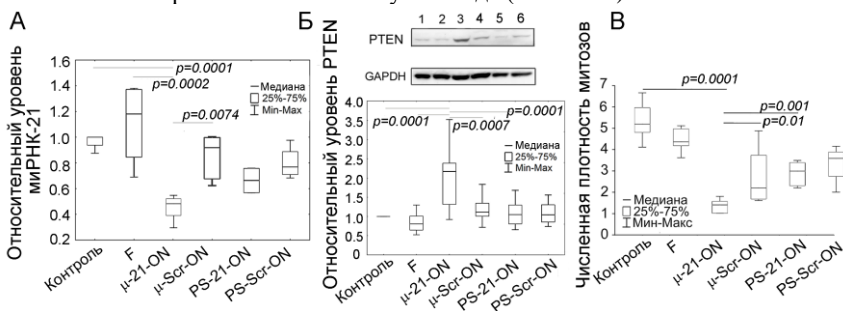
торможение роста опухоли, что достоверно не отличалось от действия контрольного олигонуклеотида PS-Scr-ON (Рис. 20 Б).



**Рис. 20.** Противоопухолевый эффект  $\mu$ - и PS-олигонуклеотидов. (А) Схема *in vivo* эксперимента, включающая подкожную трансплантацию клеток эпидермоидной карциномы KB-8-5 человека мышам линии SCID и перитуморальные инъекции  $\mu$ -миРНК-21-ОН, PS-миРНК-21-ОН или контрольных  $\mu$ -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 KB-8-5 после введения  $\mu$ - и PS-олигонуклеотидов. Дни инъекций помечены стрелками.

## 2.6.2 Определение уровня миРНК-21, её белков-мишеней и численной плотности митозов в опухолевой ткани после терапии $\mu$ -олигонуклеотидами

Методом stem-loop ПЦР показано, что даже через 7 дней после последней инъекции  $\mu$ -миРНК-21-ОН уровень миРНК-21 в опухолевой ткани был снижен на 50% по сравнению с контролем (Рис. 21 А). При этом не наблюдалось статистически значимого снижения в опухолевой ткани уровня миРНК-155 и миРНК-17, что подтверждает специфичность действия  $\mu$ -миРНК-21-ОН. В группе мышей, получавших PS-миРНК-21-ОН, уровень целевой миРНК был снижен лишь на 25% без статистически значимого отличия от контрольного PS-олигонуклеотида (Рис. 21 А).



**Рис. 21.** Уровень миРНК, белка PTEN и численная плотность митозов в опухолевой ткани эпидермоидной карциномы KB-8-5 человека, а также после введения  $\mu$ - и PS-олигонуклеотидов. (А) Уровень миРНК-21 в опухолевой ткани после терапии, измеренный методом stem-loop ПЦР и нормированный на уровень малой ядерной РНК U6. (Б) Уровень белка супрессоров опухоли PTEN, в опухолевой ткани после терапии, определённый методом Вестерн Блот гибридизации. Уровни белков нормировали на уровень белка домашнего хозяйства GAPDH. 1 – контроль; 2 – фолат-содержащие катионные липосомы F; 3 –  $\mu$ -миРНК-21-ОН; 4 –  $\mu$ -Scr-ОН; 5 – PS-миРНК-21-ОН; 6 – PS-Scr-ОН. Анализ данных был проведён с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и апостериорного критерия Тьюки; Значение p-value отражает статистически значимые отличия.

Методом Вестерн Блот гибридизации показано, что уровень прямых белков-мишеней миРНК-21 PTEN и PDCD4 в опухоли после терапии  $\mu$ -миРНК-21-ON повышался в 1.5 раза для PDCD4 и в 3.5 раза для PTEN по сравнению с контролем.  $\mu$ -Scr-ON, PS-миРНК-21-ON и PS-Scr-ON не оказывали статистически значимого влияния на уровни этих белков в опухолевой ткани (Рис. 21 Б).

Гистологический анализ показал, что терапия  $\mu$ -миРНК-21-ON способствовала снижению митотической активности клеток в 4 по сравнению с контролем и в 2 раза по сравнению с  $\mu$ -Scr-ON, PS-миРНК-21-ON и PS-Scr-ON (Рис. 23 В). Между группами, получавшими инъекции PS-миРНК-21-ON и PS-Scr-ON достоверных отличий выявлено не было (Рис. 21 В).

### **2.7 Оценка токсичности $\mu$ -олигонуклеотидов**

Исследование токсичности модифицированных олигонуклеотидов показало, что введение  $\mu$ - и PS-олигонуклеотидов способствовало снижению процента деструктивных изменений паренхимы печени, что свидетельствует о терапевтическом эффекте препаратов.

Биохимический анализ крови показал, что у всех исследуемых групп, включая здоровых мышей, не выявлено статистически значимых изменений уровня АЛТ, щелочной фосфатазы, общего белка, креатинина и азота мочевины в крови после терапии  $\mu$ - и PS-олигонуклеотидами.

**3 Заключение.** Разработаны два типа препаратов на основе олигонуклеотидов, обеспечивающих эффективную необратимую деградацию миРНК-21 в опухолевых клетках. Сформулированные в работе принципы дизайна олигонуклеотид-пептидных конъюгатов и N-(метансульфонил)фосфорамидных олигонуклеотидов позволяют разрабатывать подобные конструкции для направленного подавления как миРНК-мишеней, так и других РНК, связанных с развитием патологий, в частности, мРНК, длинных некодирующих РНК, а также коротких *piwi*-ассоциированных РНК, открывая новые перспективы в терапии РНК-ассоциированных заболеваний.

**4 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 ( $\mu$ -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)<sub>2</sub>Gly]<sub>2</sub> не препятствует эффективному связыванию олигонуклеотид-пептидных конъюгатов (ОПК) с миРНК-21.

2. ОПК с пептидом [(LeuArg)<sub>2</sub>Gly]<sub>2</sub>, 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 RLS<sub>40</sub> и меланомы В16 мыши *in vitro* и подавление роста опухоли RLS<sub>40</sub> *in vivo*.

4. Введение 2'ОМе-модификаций в состав 5'-ОПК шпильчатой 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 KB-8-5.

5. Гибридационные свойства N-(метансульфонил)фосфорамидных ( $\mu$ -) олигонуклеотидов совпадают с гибридационными свойствами немодифицированных ДНК аналогов и значительно превосходят эффективность связывания фосфотиоатных (PS) олигонуклеотидов. Гетеродуплексы миРНК-21 и  $\mu$ -олигонуклеотида являются субстратом для РНКазы Н, при этом расщепление миРНК РНКазой Н происходит со скоростью в три раза выше, чем в гетеродуплексах с PS-олигонуклеотидами.  $\mu$ -олигонуклеотиды обладают высокой нуклеазоустойчивостью и остаются интактными в среде с 10%-ной FBS в течение не менее 168 ч.

6. миРНК-21-направленные  $\mu$ -олигонуклеотиды эффективно снижают скорость пролиферации, уменьшают миграционный потенциал и способствуют индукции апоптоза клеток меланомы В16 за счёт эффективного и специфического подавления миРНК-21.  $\mu$ -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 перитуморальном введении  $\mu$ -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  $\mu$ -олигонуклеотидов.

### Результаты диссертации опубликованы в работах:

1. О.А. Патутина, С.К. Мирошнichenko, А.А. Ломзов, Н.Л. Миронова, М.А. Зенкова. Выбор олигонуклеотидов, селективно связывающих онкогенную miR-21 // Биоорганическая химия. – 2017. – Т. 43. – С. 1–10.
2. О.А. Patutina, E.V. Bichenkova, S.K. Miroshnichenko, N.L. Mironova, L.T. Trivoluzzi, K.K. Burusco, R.A. Bryce, V.V. Vlassov, M.A. Zenkova. miRNases: Novel peptide-oligonucleotide bioconjugates that silence miR-21 in lymphosarcoma cells // Biomaterials. – 2017. – V. 122. – P. 163–178.
3. S. K. Miroshnichenko, O. A. Patutina, E. A. Burakova, B. P. Chelobanov, A. A. Fokina, V. V. Vlassov, S. Altman, M. A. Zenkova and D. A. Stetsenko. Mesyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates with improved biochemical and biological properties // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2019. – V. 116. – P. 1229-1234.
4. S. K. Miroshnichenko, B. Amirloo, E. V. Bichenkova, V. V. Vlassov, M. A. Zenkova, and O. A. Patutina. 2'OMe Modification of Anti-miRNA-21 Oligonucleotide–Peptide Conjugate Improves Its Hybridization Properties and Catalytic Activity // Rus. J. Bioorg. Chemistry. – 2019. – V. 45. – P. 803–812.
5. S. Miroshnichenko, O. Patutina. Enhanced Inhibition of Tumorigenesis Using Combinations of miRNA-Targeted Therapeutics // Front. Pharmacol. – 2019. – V. 10. – P. e488.
6. О.А. Патутина, S.K. Miroshnichenko, N.L. Mironova, A.V. Sen'kova, E.V. Bichenkova, D.J. Clarke, V.V. Vlassov, M.A. Zenkova. Catalytic Knockdown of miR-21 by Artificial Ribonuclease: Biological Performance in Tumor Model // Front. Pharmacol. – 2019. – V. 10. – P. e879.

*Работа выполнена при поддержке грантами РФФ №14-44-00068, №19-14-00250 и №19-74-30011.*