

Чернов Пётр Владимирович

ОПТИМИЗАЦИЯ ПОДХОДОВ К ДИЗАЙНУ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ  
РНК ДЛЯ ИММУНОРЕГУЛЯЦИИ ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ НА  
МОДЕЛИ *IN VITRO*

3.2.7. Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Государственном научном центре Российской Федерации – федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр аллергологии и иммунологии» Федерального медико-биологического агентства

**Научный руководитель:**

член-корреспондент РАН, доктор биологических наук **Кофиади Илья Андреевич**

**Официальные оппоненты:**

**Боженко Владимир Константинович** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий научно-исследовательским отделом молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

**Фатхудинов Тимур Хайсамудинович** – доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2026 г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 68.1.002.01 в ГНЦ ФГБУ «НМИЦ аллергологии и иммунологии» ФМБА России по адресу: 115522, Москва, Каширское шоссе, д.24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНЦ ФГБУ «НМИЦ аллергологии и иммунологии» ФМБА России и на официальном сайте <https://nrcii.ru/dissertatsionnyy-sovet/zashchity-dissertatsiy/>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2026 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук

Шиловский Игорь Петрович

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Онкологические заболевания остаются одной из ведущих причин смертности в мире, несмотря на значительный прогресс в области диагностики и лечения. Существенную роль в прогрессии опухолевого процесса играют иммуноопосредованные механизмы, обеспечивающие уклонение опухолевых клеток от иммунного надзора и формирование иммуносупрессивного микроокружения. Поиск и разработка новых подходов к таргетной регуляции экспрессии генов, вовлеченных в данные процессы, является актуальной задачей современной молекулярной иммунологии и медицины.

Одним из перспективных механизмов направленного воздействия на экспрессию генов является РНК-интерференция. Применение малых интерферирующих РНК позволяет селективно подавлять экспрессию целевых генов на посттранскрипционном уровне и рассматривается как основа для создания новых терапевтических стратегий в иммунологии и онкологии. Особый интерес представляет применение интерферирующих РНК для регуляции экспрессии генов, ассоциированных с уклонением опухолей от иммунной системы: гена *CD47*, реализующего сигнал «don't eat me» через взаимодействие с рецептором SIRP $\alpha$  макрофагов, и гена *ITGB1*, кодирующего  $\beta 1$ -субъединицу интегринов, вовлеченных в формирование иммуносупрессивного микроокружения опухоли.

В контексте моделирования подавления иммунологически значимых мишеней *CD47* и *ITGB1* выбор системы НЕК293Т с плазмидным люциферазным репортером является обоснованным для первичной оценки интерферирующей активности миРНК. Такая репортерная модель позволяет количественно оценить подавление целевых последовательностей без влияния вариабельности эндогенной экспрессии и дополнительных регуляторных механизмов опухолевых клеток. Высокая эффективность трансфекции НЕК293Т и чувствительность люциферазного анализа обеспечивают воспроизводимые условия для сравнения немодифицированных и химически модифицированных миРНК. В связи с этим такая модель является рациональным выбором для высокопроизводительного

скрининга в рамках валидации используемых алгоритмов дизайна и ранжирования миРНК применительно к выбранным иммунологически значимым мишеням *CD47* и *ITGB1*.

Несмотря на наличие разработанных алгоритмов дизайна интерферирующих РНК, их практическое применение сопряжено с рядом ограничений: существующие подходы формируют большие библиотеки потенциально активных молекул, требующих трудоемкой валидации. Рациональные подходы к химической модификации миРНК с учетом влияния на термодинамические характеристики дуплексов и функциональную активность остаются недостаточно разработанными. Таким образом, разработка комплексных подходов, объединяющих дизайн *in silico*, термодинамическую оценку и рациональную химическую модификацию миРНК, является актуальной задачей молекулярной иммунологии.

#### **Соответствие темы диссертации паспорту научной специальности**

Тема диссертации полностью соответствует паспорту научной специальности «3.2.7. Иммунология» (№ 3, №5, №7).

#### **Степень разработанности темы исследования**

Механизмы действия малых интерферирующих РНК охарактеризованы в многочисленных экспериментальных и обзорных исследованиях. Созданы программные средства, позволяющие автоматизировать процесс проектирования миРНК и формировать большие библиотеки кандидатных последовательностей. Вместе с тем применение существующих алгоритмов приводит к генерации значительных массивов молекул, требующих последующей ресурсоемкой валидации. Остается недостаточно изученной взаимосвязь между локальными энергетическими характеристиками дуплексов, распределением термодинамической асимметрии между цепями и эффективностью подавления экспрессии целевых генов. Отсутствуют унифицированные подходы к рациональной химической модификации, обеспечивающие прецизионное управление степенью нокдауна. Разработка методов *in silico*-оценки и химической модификации миРНК с управляемой биологической активностью представляет собой актуальную и недостаточно разработанную научную задачу.

## Цель исследования

Разработка функционально активных молекул для прецизионной регуляции экспрессии генов-мишеней, обеспечивающих уклонение опухолевых клеток от иммунного надзора – *CD47* и *ITGB1* – на модели *in vitro* посредством рационального дизайна *in silico*, термодинамической оценки и направленной химической модификации малых интерферирующих РНК.

## Задачи исследования

Для достижения поставленной цели в работе были сформулированы и последовательно решены следующие задачи:

1. Разработать комплексный алгоритм *in silico*-дизайна и отбора миРНК на основе метода энергетической сигнатуры дуплексов миРНК, обеспечивающего учет индивидуального вклада характеристик нуклеотидной последовательности, термодинамических и структурных свойств целевых участков при прогнозировании функциональной активности. Сформировать с его применением библиотеку миРНК против мРНК генов *CD47* и *ITGB1*, участвующих в уклонении злокачественных опухолей от иммунного надзора.
2. Осуществить отбор и валидацию *in vitro* кандидатных миРНК против мРНК генов *CD47* и *ITGB1* человека с использованием разработанных подходов *in silico*, включая оценку цитотоксического эффекта синтезированных молекул на клеточной модели.
3. Разработать подходы к химической модификации последовательностей наиболее эффективных миРНК с использованием 2'-F- и 2'-O-метильных производных рибозы, обеспечивающие прецизионное управление энергетическим профилем дуплекса и регуляцию степени подавления экспрессии иммунорегуляторных генов-мишеней, выполнить их химический синтез, очистку и физико-химическую идентификацию.
4. Исследовать интерферирующую активность модифицированных миРНК в клеточной модели и проанализировать влияние различных схем химической модификации на функциональную активность, обосновав возможность

прецизионного управления степенью подавления экспрессии генов *CD47* и *ITGB1*.

### **Научная новизна работы**

Научная новизна исследования состоит в разработке и экспериментальном обосновании оригинального подхода к предсказуемому дизайну миРНК, основанного на учете не только последовательностных и структурных характеристик дуплекса, но и локального распределения термодинамической асимметрии между его цепями. Предложенный метод энергетической сигнатуры позволяет рассматривать энергетический профиль дуплекса как самостоятельный параметр, влияющий на выбор направляющей цепи миРНК, ее загрузку в RISC-комплекс и последующую интерферирующую активность молекулы.

В работе продемонстрировано, что позиционно-специфическая химическая модификация миРНК может использоваться не только как способ повышения устойчивости к нуклеазам, но и как инструмент направленного изменения функциональной активности молекулы. Установлено, что рациональное размещение 2'-F- и 2'-O-метильных модификаций позволяет изменять локальный энергетический профиль дуплекса и тем самым регулировать степень подавления экспрессии иммунорегуляторных генов-мишеней без изменения нуклеотидной последовательности.

На примере иммунологически значимых генов-мишеней *CD47* и *ITGB1* обоснована возможность перехода от эмпирического подбора миРНК к проектированию молекул с прогнозируемой и дозируемой биологической активностью. Полученные результаты уточняют представления о роли химико-модификационных параметров дуплекса в регуляции РНК-интерференции и расширяют методологическую основу разработки олигонуклеотидных соединений для изучения механизмов противоопухолевого иммунного ответа.

### **Теоретическая значимость работы**

Предложенный метод энергетической сигнатуры дуплексов миРНК углубляет фундаментальные представления о молекулярных детерминантах эффективности РНК-интерференции, раскрывая роль локального распределения

термодинамической асимметрии в механизмах загрузки направляющей цепи в RISC-комплекс. Применительно к иммунологически значимым мишеням – генам *CD47* и *ITGB1* – данный подход демонстрирует принципиальную возможность предсказания функциональной активности молекул на этапе вычислительного анализа. Разработанные подходы к химической модификации расширяют теоретические представления о взаимосвязи между локальными энергетическими характеристиками дуплекса и биологической активностью молекулы. Экспериментально обоснованная возможность прецизионного управления степенью нокдауна формирует новую концептуальную основу для создания миРНК с заданным иммунологическим эффектом – не бинарным нокдауном, а дозированной модуляцией активности молекул, обеспечивающих уклонение опухоли от иммунитета.

### **Практическая значимость работы**

Полученные функционально активные химически модифицированные миРНК против мРНК генов *CD47* и *ITGB1* представляют собой кандидатные молекулы, готовые к изучению в исследованиях механизмов уклонения опухолевых клеток от иммунного надзора. С учетом способности данных миРНК подавлять экспрессию иммунорегуляторных генов при отсутствии выраженного цитотоксического эффекта они могут рассматриваться как перспективные объекты для последующих доклинических исследований в области противоопухолевой иммунотерапии. Разработанный комплексный алгоритм дизайна и ранжирования миРНК *in silico*, включающий метод энергетической сигнатуры, может быть применен при проектировании миРНК к различным генам-мишеням, включая гены, вовлеченные в иммунорегуляцию и механизмы уклонения опухолевых клеток от иммунного надзора. Разработанные схемы химической модификации имеют самостоятельную практическую ценность как инструмент дозированного подавления экспрессии иммунорегуляторных генов, открывая перспективу тонкой настройки иммунного ответа без полного выключения физиологических функций мишени. Разработанный программный сценарий для подбора, оценки и модификации миРНК представляет собой готовый к использованию программный

модуль для научно-исследовательских лабораторий, а также применим в образовательном процессе при подготовке специалистов в области молекулярной иммунологии.

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Результаты исследования внедрены в научно-исследовательскую работу отдела генетики и регуляции иммунного ответа ГНЦ ФГБУ «НМИЦ аллергологии и иммунологии» ФМБА России (ранее ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России), где используются при разработке и оптимизации интерферирующих РНК и оценке их биологической активности (акт внедрения от 01.02.2026, приложение А). В результате применения разработанных алгоритмов при выполнении работ по теме «Подавление экспрессии генов, ассоциированных с накоплением липопротеинов низкой плотности при помощи механизма интерференции РНК», шифр «Липопротеин-24» получены результаты интеллектуальной деятельности, используемые в режиме секрета производства (ноу-хау) (приложение А). Материалы диссертации используются в учебном процессе при подготовке специалистов в области молекулярной биологии и биомедицины (акт внедрения от 17.03.2026, приложение А).

### **Методология и методы исследования**

Методологической основой диссертационного исследования послужили современные представления о молекулярных механизмах РНК-интерференции как инструмента регуляции иммуноопосредованных процессов, концепции иммунного уклонения опухолевых клеток через молекулы CD47 и ITGB1, а также принципы рационального дизайна олигонуклеотидов с заданными функциональными свойствами. Работа выполнена в рамках междисциплинарного подхода, объединяющего методологию молекулярной иммунологии, биоинформатики, химии олигонуклеотидов и клеточной биологии, и направлена на получение терапевтических молекул-кандидатов для прецизионного воздействия на механизмы иммунного уклонения гепатоцеллюлярной карциномы.

На этапе *in silico* использованы методы биоинформатического проектирования и ранжирования миРНК против мРНК генов, опосредующих

уклонение от иммунитета *CD47* и *ITGB1*, основанные на анализе нуклеотидной последовательности, термодинамических характеристик дуплексов, оценке вторичных структур целевых участков мРНК и прогнозировании нецелевых эффектов. В качестве оригинального критерия отбора применен разработанный метод энергетической сигнатуры, позволяющий использовать локальное распределение термодинамической асимметрии дуплекса как предиктор функциональной активности молекул, направленных на иммунорегуляторные мишени.

Химический этап исследования включал твердофазный фосфорамидитный синтез немодифицированных и химически модифицированных миРНК с использованием 2'-F- и 2'-O-метильных производных рибозы по трем оригинальным схемам модификации, направленным на прецизионное управление энергетическим профилем дуплекса. Структурная идентичность и чистота синтезированных молекул подтверждены методами хроматографии и масс-спектрометрии MALDI-ToF.

Иммунологическая значимость полученных молекул обоснована через оценку их биологической активности в отношении генов *CD47* и *ITGB1*, являющимися существенными участниками прогрессии гепатоцеллюлярной карциномы. Функциональная активность миРНК оценивалась с помощью репортерной экспрессионной плазмиды. Отсутствие цитотоксического эффекта синтезированных молекул, подтвержденное МТТ-тестом в широком диапазоне концентраций, обосновывает их применимость в последующих иммунологических экспериментах с участием иммунных клеток. Статистическая обработка данных проводилась с применением параметрических и непараметрических критериев, адекватных характеру распределения данных.

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

1. Разработан комплексный алгоритм *in silico*-дизайна и отбора миРНК, основанный на методе энергетической сигнатуры дуплексов, обеспечивающий двукратное повышение эффективности отбора миРНК, которые обеспечивают подавление экспрессию генов-мишеней более чем на 99%.

2. Позиционно-специфическая химическая модификация с использованием 2'-F- и 2'-O-метильных производных рибозы позволяет обеспечить устойчивость миРНК к действию нуклеаз и прецизионно изменять эффективность РНК-интерференции без нарушения комплементарности к целевому участку мРНК, в том числе для иммунологически значимых мишеней *CD47* и *ITGB1*.
3. Функционально активные химически модифицированные миРНК эффективно подавляют экспрессию иммунорегуляторных генов *CD47* и *ITGB1* при отсутствии выраженного цитотоксического эффекта, что обосновывает дальнейшее исследование их вклада в восстановление противоопухолевого иммунного ответа, а также проведение доклинических испытаний данных миРНК в качестве кандидатных средств для терапии онкологических заболеваний.

### **Степень достоверности результатов**

Достоверность представленных результатов определяется четко сформулированными целью и задачами, планом исследования, достаточным для статистического анализа количеством наблюдений, использованием статистических методов исследования, адекватных поставленным задачам. Приведенные в диссертации данные получены с использованием современного оборудования, прошедшего своевременную поверку. Все эксперименты выполнялись в биологических и технических повторах; статистическая обработка проводилась с применением параметрических и непараметрических критериев, адекватных характеру распределения данных. Установлено, что результаты диссертационной работы являются достоверными.

### **Апробация результатов**

Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на профильных научных конференциях: The 19th IUIS International Congress of Immunology (IUIS 2025) (Вена, Австрия, 17–22 августа 2025 г.); международном конгрессе по молекулярной иммунологии и аллергологии (IMAC 25) (Москва, Россия, 4–5 декабря 2025 г.); школе по аллергологии и иммунологии им. Академика Р.М. Хаитова (Москва, Россия, 5–6 марта 2026 г.). Апробация диссертации

состоялась на заседании секции № 1 ученого совета ГНЦ ФГБУ «НМИЦ аллергологии и иммунологии» ФМБА России (ранее ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России) 14 мая 2026 г.

### **Личный вклад автора**

Личный вклад соискателя состоит в самостоятельной постановке задач и планировании исследования; разработке алгоритмов дизайна и ранжирования миРНК *in silico*, включая метод энергетической сигнатуры; разработке и реализации программных сценариев для биоинформатического анализа; проектировании схем химической модификации миРНК; разработке дизайна и планировании экспериментов *in vitro* по оценке интерферирующей активности и цитотоксичности; проведении статистического анализа данных и интерпретации полученных результатов; подготовке основных публикаций по теме исследования.

### **Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах**

По теме диссертации опубликовано 4 научных статьи в рецензируемых изданиях, включая статьи в журналах, входящих в перечень рецензируемых периодических научных изданий, рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и доктора наук.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 151 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, основной части (материалы и методы, результаты, обсуждение), заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, словаря терминов, списка литературы и приложений. Библиографический список включает 122 источника, из которых 9 отечественных и 113 зарубежных. Работа иллюстрирована 23 рисунками и 15 таблицами. Работа содержит 5 приложений.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Поиск релевантных иммуноопосредованных молекулярных мишеней проведён с использованием ресурсов Google Scholar, PubMed/MEDLINE, GeneCards, UniProt, STRING, TCGA и GEO; по итогам анализа для дальнейшей работы отобраны гены *CD47* и *ITGB1*.

*In silico*-дизайн миРНК выполнен с использованием веб-приложения siDirect и оригинального программного сценария (Excel/GoogleScript), оценивающего последовательности по набору позиционных и нуклеотидных критериев. Нецелевые эффекты кандидатных миРНК оценивали с помощью NCBI-nBLAST (megablast), вторичные структуры целевых участков мРНК – соответствующими алгоритмами предсказания. Ключевым авторским инструментом отбора стал метод энергетической сигнатуры дуплексов миРНК, основанный на анализе локального распределения свободных энергий водородных связей и градиентов между соседними нуклеотидами цепи; метод применён для дополнительного ранжирования и сужения библиотек кандидатных дуплексов.

Химический синтез немодифицированных и модифицированных (2'-F-, 2'-O-метильных) миРНК проведён твердофазным фосфорамидитным методом, включая оригинальный протокол кэппирования с пропионовым, а не уксусным ангидридом. Очистку осуществляли методом ОФ-ВЭЖХ, подтверждение структуры и чистоты – MALDI-ToF масс-спектрометрией.

Для оценки интерферирующей активности использована репортерная модель на основе плазмиды pVax-Kozak-Luc, несущей ген люциферазы светляка в сцеплении с целевым геном (*CD47* или *ITGB1*) под единым CMV-промотором. Клетки HEK293T ко-трансфицировали плазмидой и миРНК с использованием Lipofectamine3000; активность люциферазы определяли набором Bright-Glo™ (Promega). Контролями служили миРНК siGFP (отрицательный) и siLuc (положительный). Цитотоксичность оценивали МТТ-тестом на клетках HEK293T в диапазоне концентраций 2–200 мкг/мл. Статистическую обработку выполняли в GraphPad Prism (two-way ANOVA, критерий Краскела–Уоллиса).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Выбор и обоснование иммунорегуляторных мишеней.** По результатам систематического обзора среди генов-кандидатов (*PD-L1*, *YAP1*, *GPX4*, *CD47*, *ITGB1* и др.) для дальнейшей работы выбраны *CD47* и *ITGB1* как функционально взаимодействующие мишени, связанные с уклонением опухолевых клеток от

иммунного надзора и поддержанием их устойчивости при гепатоцеллюлярной карциноме.

При отборе учитывали участие генов в иммуноопосредованной прогрессии опухоли и наличие экспериментальных или клинических данных об эффективности их блокады. Повышенная экспрессия *CD47* ассоциирована с неблагоприятной общей выживаемостью ( $p = 0,039$ ) и подавлением фагоцитоза по оси *CD47*–*SIRP $\alpha$* . *ITGB1* поддерживает адгезию, выживание и устойчивость опухолевых клеток к воздействию микроокружения.

Подавление *ITGB1* может нарушать интегрин-опосредованное взаимодействие с внеклеточным матриксом и способствовать аноикису, тогда как нокдаун *CD47* снимает ингибирующий сигнал для макрофагов. Таким образом, комбинированное воздействие потенциально сочетает снижение адгезионной устойчивости опухолевых клеток с восстановлением фагоцитарного надзора. Возможность частичного нокдауна особенно важна с учетом физиологической экспрессии обеих мишеней в нормальных тканях.

***In silico*-дизайн миРНК, метод энергетической сигнатуры и поэтапный отбор кандидатов.** Исходные библиотеки включали 742 дуплекса против *ITGB1* и 1061 против *CD47*. Применение позиционных, нуклеотидных, структурных критериев и оценки нецелевого связывания сократило их до 31 и 30 кандидатов соответственно. На заключительном этапе разработанный метод энергетической сигнатуры позволил выделить по шесть наиболее перспективных дуплексов на каждую мишень (серии I–X и CX).

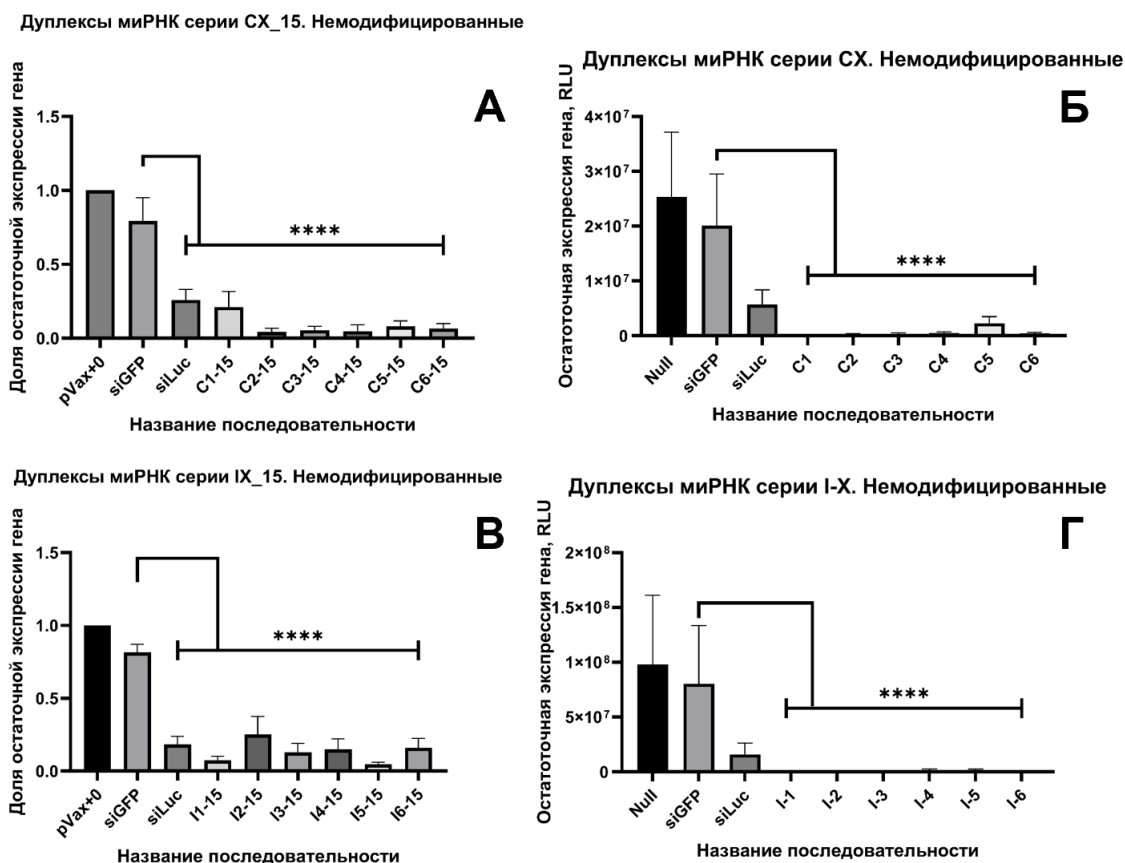
Выбор шести молекул на ген был обусловлен экспериментальной пропускной способностью и необходимостью охватить разные участки целевой последовательности. Такой формат позволял провести исследование с пятью биологическими повторами и необходимыми контролями в стандартном 96-луночном планшете. Энергетическая сигнатура применялась как дополнительный термодинамический фильтр после стандартных алгоритмов и учитывала распределение локальных энергетических градиентов, включая область

между 10-м и 11-м нуклеотидами, протяженность плато и соотношение положительных и отрицательных градиентов.

Такой подход переносит значительную часть отбора на вычислительный этап, сокращая объем синтеза, число трансфекций и расход реагентов. Реализация алгоритма в электронных таблицах и GoogleScript также снижает требования к специализированной вычислительной инфраструктуре и упрощает его воспроизведение при первичном скрининге миРНК.

**Химический синтез.** Все олигонуклеотиды получены твердофазным методом с подтверждённой структурной идентичностью (MALDI-ToF) и чистотой (ВЭЖХ); апробирован протокол кэппирования пропионовым ангидридом, соответствующий нормативным требованиям РФ. Синтез модифицированных 2'-F/2'-ОМе-вариантов не потребовал изменения стандартного цикла синтеза.

**Интерферирующая активность немодифицированных миРНК и сравнительная валидация стратегий дизайна.** В люциферазной репортерной модели НЕК293Т все 12 дуплексов, отобранных методом энергетической сигнатуры, статистически значимо подавляли экспрессию целевых генов: для серии I-X против *ITGB1* уровень подавления составил 98,2–99,6% (Рисунок 1 Г), для серии CX против *CD47* – 90,3–99,0% (Рисунок 1 Б). Наиболее активными были I-1 (99,6%) и C1 (99,0%). Для дуплексов серии IX\_15 против *ITGB1*, отобранных без применения метода энергетической сигнатуры, уровень подавления варьировал от 74,8 до 95,3% (Рисунок 1 В), а для серии CX\_15 против *CD47* – от 78,8 до 95,6% (Рисунок 1 А). Более низкий и вариабельный эффект этих дуплексов подтвердил предсказательную ценность разработанного метода. Все дуплексы серий I-X и CX, выбранные с применением энергетической сигнатуры, обеспечивали статистически значимое подавление соответствующей мишени (критерий Краскела–Уоллиса,  $N = 5$ ,  $p < 0,0001$ ). Для *ITGB1* остаточная экспрессия находилась в диапазоне  $0,004 \pm 0,001$ – $0,018 \pm 0,007$ , а для *CD47* –  $0,0097 \pm 0,009$  –  $0,097 \pm 0,05$ . У серий IX\_15 и CX\_15, сформированных без дополнительного термодинамического фильтра, остаточная экспрессия была выше и варьировала соответственно от  $0,047 \pm 0,015$  до  $0,252 \pm 0,13$  и от  $0,044 \pm 0,02$  до  $0,212 \pm 0,07$ .



А – доля остаточной экспрессии гена *CD47* после обработки немодифицированными миРНК серии CX\_15, отобранными без применения метода энергетической сигнатуры; Б – остаточная люциферазная активность после обработки миРНК серии CX против *CD47*, отобранными с применением метода энергетической сигнатуры; В – доля остаточной экспрессии гена *ITGB1* после обработки немодифицированными миРНК серии IX\_15, отобранными без применения метода энергетической сигнатуры; Г – остаточная люциферазная активность после обработки миРНК серии I-X против *ITGB1*, отобранными с применением метода энергетической сигнатуры; данные представлены как  $M \pm SD$ ,  $N = 5$ . Null и pVax+0 – контроль без миРНК; siGFP – отрицательный контроль; siLuc – положительный контроль; RLU – относительные световые единицы; \*\*\*\* –  $p < 0,0001$ ; ns – различия статистически незначимы, критерий Краскела–Уоллиса.

Рисунок 1 – Интерферирующая активность немодифицированных миРНК в люциферазной репортерной системе HEK293T

Таким образом, различие состояло не только в максимальном эффекте, но и в большей однородности активности финальной выборки. Это указывает, что параметры энергетической асимметрии содержат предсказательную информацию, дополняющую традиционную оценку последовательности и терминальной стабильности. Для последующей модификации закономерно выбраны I-1 и C1,

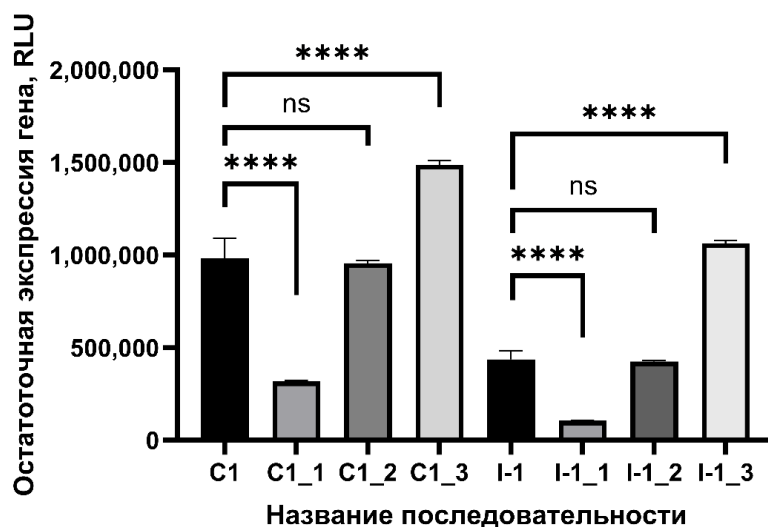
имевшие минимальную остаточную экспрессию в соответствующих сериях. Сходная направленность эффекта для двух мРНК разной длины и структуры снижает вероятность того, что результат обусловлен особенностями только одной мишени.

Плазмиды, содержащие люциферазу в сцеплении с фрагментами мРНК *ITGB1* или *CD47* под единым промотором, обеспечили количественное сравнение дуплексов в стандартизированных условиях. siGFP контролировал неспецифическое влияние трансфекции и гетерологичной миРНК, а siLuc подтверждал работоспособность системы РНК-интерференции. Нормализация относительно нулевого контроля, одинаковые условия ко-трансфекции, пять биологических повторов и единая статистическая схема позволили сопоставить выраженность и воспроизводимость нокдауна.

Устойчивое превосходство серий I-X и CX над сериями без энергетического фильтра служит главным аргументом в пользу метода, поскольку единичный высокоактивный дуплекс мог быть случайной находкой. Репортерная система, однако, не воспроизводит полностью регуляцию эндогенных транскриптов и клеточное микроокружение гепатоцеллюлярной карциномы; поэтому результаты характеризуют сравнительную интерферирующую активность дуплексов на этапе первичного скрининга.

**Химическая модификация и прецизионное управление интерферирующей активностью.** Для кандидатных дуплексов I-1 и C1 разработаны три схемы позиционно-специфической модификации 2'-F- и 2'-O-метильными производными рибозы (Рисунок 2). Метод 1 (усиление энергетических градиентов антисмысловой цепи) повысил подавление экспрессии до 99,9% (*ITGB1*) и 99,7% (*CD47*). Метод 2 (сохранение амплитуды градиентов) не изменил активность значимо. Метод 3 (снижение амплитуды градиентов) обеспечил частичный, но специфичный нокдаун, что принципиально важно для мишеней с физиологической экспрессией в норме (в частности, *CD47* на клетках крови).

### Дуплексы миРНК серий C1\_X и I-1\_X. Модифицированные



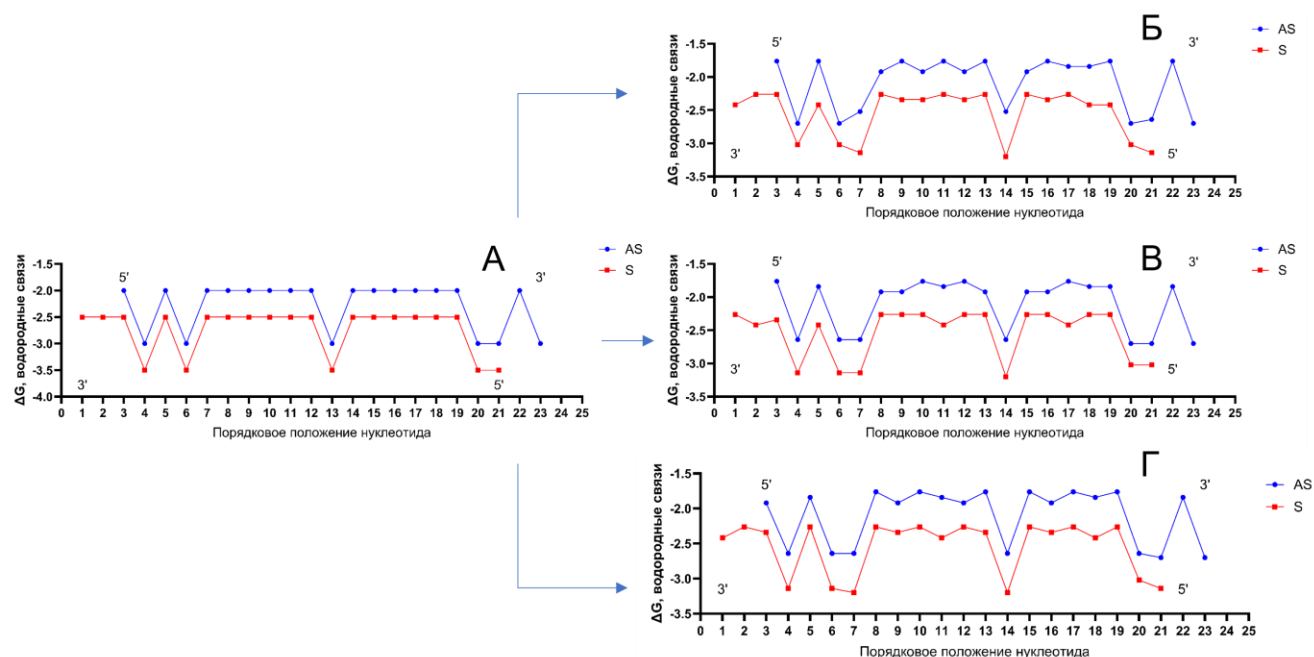
RLU – относительная световая единица, ns – различия статистически незначимы, \*\*\*\* – различия статистически значимы (критерий Краскела–Уоллиса,  $N = 5$ ,  $p < 0,0001$ ).

Рисунок 2 – Остаточная экспрессия генов *CD47* и *ITGB1* после обработки клеток модифицированными миРНК C1 и I-1, соответственно, и C1\_X и I-1\_X, соответственно,  $M \pm SD$

Сопоставление I-1 и C1 с вариантами, содержащими 2'-F- и 2'-O-метильные мономеры, подтвердило зависимость функционального результата от направления изменения энергетического профиля. При Методе 1 (Рисунок 3 Б) усиление градиентов в антисмысловой цепи и их ослабление в смысловой сопровождалось снижением остаточной экспрессии до  $0,00098 \pm 0,0001$  для *ITGB1* и  $0,003 \pm 0,0003$  для *CD47*. Это согласуется с моделью термодинамической асимметрии, согласно которой различие стабильности концов и локальных участков дуплекса способствует преимущественной загрузке направляющей цепи в RISC-комплекс. При Методе 2 (Рисунок 3 В) сохранение амплитуды ключевых градиентов дало значения, практически совпадающие с немодифицированными формами:  $0,0039 \pm 0,005$  и  $0,0098 \pm 0,001$  соответственно. При Методе 3 (Рисунок 3 Г) снижение амплитуды градиентов увеличило остаточную экспрессию до  $0,0098 \pm 0,001$  и  $0,015 \pm 0,002$ , однако специфическая интерференция сохранялась.

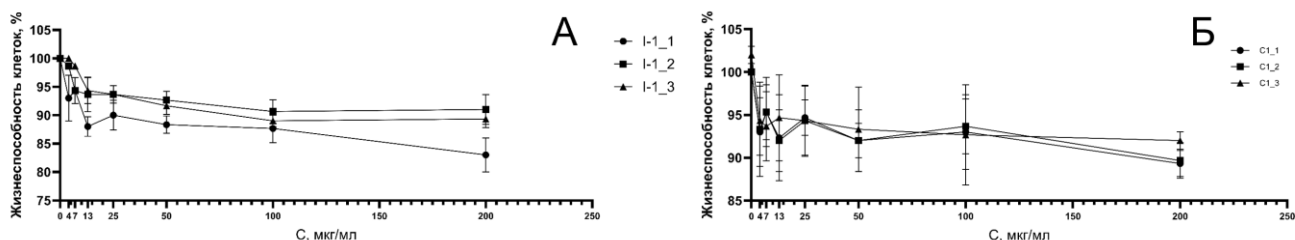
Следовательно, изменение расположения модифицированных мономеров без замены нуклеотидной последовательности позволяет направленно усилить,

сохранить или ослабить нокдаун и тем самым реализовать принцип функциональной «тонкой настройки» миРНК.



А – исходная последовательность; Б – вариант, сформированный Методом 1; В – вариант, сформированный Методом 2; Г – вариант, сформированный Методом 3. Рисунок 3 – Изменение энергии водородных связей вдоль последовательностей смысловой (S) и антисмысловой (AS) цепей исходной миРНК и её вариантов, полученных путём модификации отдельных нуклеотидов

**Цитотоксичность, иммунологическое и прикладное значение результатов.**  $CC_{50}$  для вариантов I-1\_X (Рисунок 4 А) и C1\_X (Рисунок 4 Б) в диапазоне 2–200 мкг/мл не достигнута, что исключает выраженную неспецифическую цитотоксичность как причину снижения репортерного сигнала.



А – варианты I-1\_1, I-1\_2 и I-1\_3, против *ITGB1*; Б – варианты C1\_1, C1\_2 и C1\_3, против *CD47*. Данные представлены как  $M \pm SD$ .

Рисунок 4 – Влияние химически модифицированных миРНК на жизнеспособность клеток HEK293T в диапазоне концентраций 0–200 мкг/мл

Для миРНК против *CD47* это согласуется с отсутствием макрофагов в модели НЕК293Т, а для *ITGB1* требует дальнейшего разграничения общей токсичности и аноиксис-зависимого эффекта.

Позиционно-специфическая модификация позволяет регулировать степень нокдауна и потенциально снижать распознавание двуцепочечной РНК врожденной иммунной системой.

**Ограничениями работы остаются** репортерный характер модели, использование одной клеточной линии и отсутствие оценки адресной доставки. Дальнейшая валидация должна включать подтверждение нокдауна эндогенных *CD47* и *ITGB1* методами количественной ПЦР и иммунного анализа, оценку фагоцитоза, адгезии и аноиксиса, а также сравнение одиночного и комбинированного воздействия на обе мишени. Анализ продукции интерферонов и провоспалительных цитокинов позволит исключить неспецифическую активацию сенсоров нуклеиновых кислот. Использование клеток гепатоцеллюлярной карциномы и систем совместного культивирования с иммунными клетками позволит перейти к оценке противоопухолевого эффекта.

Таким образом, сочетание метода энергетической сигнатуры для *in silico*-отбора и направленной химической модификации позволяет получать функционально активные, специфичные и нетоксичные миРНК против *CD47* и *ITGB1* с контролируемой степенью подавления экспрессии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Итоги

В ходе исследования достигнута поставленная цель и решены сформулированные задачи. Разработан воспроизводимый комплекс подходов для создания функционально активных миРНК с управляемой биологической активностью, направленных на подавление иммунорегуляторных генов *CD47* и *ITGB1*.

В области *in silico*-дизайна разработан алгоритм ранжирования миРНК, объединяющий последовательностные, термодинамические и структурные критерии. Исходные библиотеки из 742 и 1061 дуплекса для *CD47* и *ITGB1* были

сокращены до 31 и 30 кандидатов, а применение метода энергетической сигнатуры позволило отобрать по 6 наиболее перспективных молекул для каждого гена. Метод повышает эффективность отбора и может быть реализован с использованием доступного программного обеспечения.

Олигонуклеотиды получены твердофазным фосфорамидитным методом с подтверждением структуры методом MALDI-ToF. Разработан протокол кэппирования с пропионовым ангидридом, соответствующий нормативным требованиям. Синтез 2'-F- и 2'-ОМе-модифицированных вариантов не потребовал существенного изменения стандартного синтетического цикла.

Все 12 отобранных немодифицированных дуплексов продемонстрировали высокую интерферирующую активность в люциферазной репортерной системе. Применение метода энергетической сигнатуры обеспечило более эффективное подавление экспрессии *CD47* и *ITGB1* по сравнению с контрольным отбором. Значимого цитотоксического эффекта при рабочих концентрациях не выявлено.

Разработаны три подхода к позиционно-специфической модификации миРНК с использованием 2'-F- и 2'-ОМе-производных рибозы. Метод 1 усиливал нокдаун *CD47* и *ITGB1*, Метод 2 сохранял исходный уровень активности, а Метод 3 обеспечивал частичное специфическое подавление. Полученные результаты подтверждают возможность управлять степенью экспрессии иммунорегуляторных генов посредством выбора схемы химической модификации без изменения нуклеотидной последовательности миРНК.

### Рекомендации

При *in silico*-дизайне миРНК рекомендуется использовать метод энергетической сигнатуры как дополнительный критерий финального отбора кандидатных молекул, позволяющий сократить объем экспериментальной валидации и повысить эффективность отбора активных дуплексов.

Для управления степенью подавления экспрессии целевого гена целесообразно применять позиционно-специфическую химическую модификацию: Метод 1 – для усиления нокдауна, Метод 2 – для сохранения

исходной активности, Метод 3 – для частичного подавления экспрессии, в том числе при работе с физиологически значимыми мишенями, такими как *CD47*.

При первичной экспериментальной оценке кандидатных миРНК рекомендуется использовать люциферазную репортерную систему в сочетании с соответствующими контрольными дуплексами и параллельной оценкой цитотоксичности.

Разработанные подходы целесообразно применять последовательно: *in silico*-дизайн и ранжирование, отбор по энергетической сигнатуре, экспериментальная валидация и последующая химическая модификация наиболее активных миРНК.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы**

Проведенное исследование формирует прочную методологическую основу для нескольких взаимосвязанных направлений дальнейшей работы.

Доклиническая валидация *in vivo*. Наиболее приоритетным направлением является проверка биологической активности отобранных кандидатных молекул – дуплексов I-1 (против *ITGB1*) и C1 (против *CD47*) – на доклинических моделях гепатоцеллюлярной карциномы. Такие исследования позволят оценить фармакодинамику и фармакокинетику разработанных миРНК в условиях целостного организма, изучить их влияние на взаимодействие опухолевых клеток с компонентами противоопухолевого иммунного ответа, а также определить терапевтическое окно и возможные токсические эффекты при системном введении.

Расширение области применения метода энергетической сигнатуры. Разработанный метод был апробирован на миРНК, однако его принципы применимы и к другим классам терапевтических олигонуклеотидов – антисмысловым олигонуклеотидам (АСО), малым активирующим РНК (saRNA), а также к молекулам, используемым в системах редактирования генома на основе CRISPR. Валидация метода на этих платформах позволит существенно расширить область его практического применения и создать унифицированный инструментарий рационального дизайна олигонуклеотидных агентов.

Изучение дополнительных типов химических модификаций. В рамках разработанной концепции управления энергетическим профилем дуплекса перспективно исследование модификаций, не рассмотренных в настоящей работе: фосфоротиоатного остова (PS), усиливающего устойчивость к нуклеазам; закрытых нуклеиновых кислот (LNA), существенно повышающих термодинамическую стабильность дуплекса; а также комбинированных схем модификации, сочетающих несколько типов замещений в одной молекуле. Систематическое изучение этих подходов в контексте метода энергетической сигнатуры позволит расширить инструментарий тонкой настройки биологической активности и сформировать более полную структурно-функциональную карту пространства модифицированных миРНК.

Оценка нецелевых эффектов. Для продвижения кандидатных молекул к стадии доклинических исследований необходимо проведение транскриптомного анализа (RNA-seq) с целью всестороннего изучения нецелевых эффектов отобранных миРНК на глобальном уровне экспрессии генов. Это позволит выявить потенциальные мишени нецелевого сайленсинга, обусловленные частичной комплементарностью, оценить активацию интерферонового ответа и других иммуностимуляторных механизмов, а также подтвердить безопасность молекул перед переходом к исследованиям *in vivo*.

Адресная доставка и конъюгация. Применение GalNAc-конъюгатов, открывает перспективу направленной доставки разработанных миРНК в гепатоциты через асиалогликопротеиновые рецепторы, что особенно актуально с учетом гепатоцеллюлярного происхождения целевых опухолей. Дальнейшие исследования в данном направлении должны включать сравнительную оценку эффективности различных конъюгатов и систем доставки – липидных наночастиц, полимерных носителей, антительных конъюгатов – применительно к разработанным терапевтическим агентам.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан оригинальный метод энергетической сигнатуры дуплексов миРНК, обоснована его научная значимость как существенного критерия

прогнозирования функциональной активности, основанного на анализе локального распределения термодинамической асимметрии вдоль дуплекса. Данный подход уточняет представления о роли энергетического профиля миРНК в выборе направляющей цепи, загрузке в RISC-комплекс и последующей интерферирующей активности молекулы.

2. Разработан комплексный алгоритм *in silico*-дизайна и отбора миРНК, включающий оригинальный метод энергетической сигнатуры дуплексов миРНК и анализ характеристик нуклеотидной последовательности, термодинамических параметров и структурных особенностей целевых участков мРНК, что позволило сформировать библиотеки кандидатных миРНК против мРНК генов *CD47* и *ITGB1*, участвующих в механизмах уклонения опухолевых клеток от иммунного надзора.
3. Показано, что с применением метода энергетической сигнатуры удалось повысить эффективность прогнозирования функционально активных миРНК. При использовании классического алгоритма для мишеней *CD47* и *ITGB1* было отобрано по 6 миРНК, из которых по 4 молекулы снижали экспрессию соответствующего гена более чем на 75%. Отбор с учетом энергетической сигнатуры позволил для каждой мишени получить по 6 миРНК, каждая из которых подавляла экспрессию соответствующей мРНК более чем на 99,3%.
4. Разработаны три метода позиционно-специфической химической модификации миРНК с использованием 2'-F- и 2'-O-метильных производных рибозы, направленные на изменение локального энергетического профиля дуплекса без нарушения комплементарности к целевому участку мРНК. Показано, что усиление энергетических градиентов в антисмысловой цепи повышает эффективность нокдауна, сохранение амплитуды градиентов стабилизирует интерферирующую активность, а снижение амплитуды градиентов обеспечивает частичное подавление экспрессии при сохранении специфичности.
5. Получены химически модифицированные варианты отобранных миРНК против мРНК генов *CD47* и *ITGB1*, обладающие высокой ингибирующей активностью

и устойчивостью к действию нуклеаз при отсутствии цитотоксического эффекта, что обосновывает их изучение в моделях восстановления противоопухолевого иммунного ответа и доклиническую оценку их потенциала в качестве кандидатных средств противоопухолевой терапии.

6. Разработанная методологическая платформа, объединяющая *in silico*-дизайн, метод энергетической сигнатуры, направленную химическую модификацию, синтез и функциональную валидацию миРНК, представляет собой эффективный инструментарий для создания молекул с прогнозируемой и управляемой биологической активностью.

### **Список работ, опубликованных автором по теме диссертации**

1. Разработка и валидация алгоритмов поиска, оценки и модификации миРНК, применимых для терапии патологий иммунной системы, на примере гена АРОВ / П. В. Чернов, Н. А. Дмитриев, А. Е. Гусев [и др.]. – Текст: электронный // Иммунология. – 2025. – Т. 46. – № 4. – С. 483-497. – URL: <https://www.immunologiya-journal.ru/ru/jarticlesimmunology/04.html?SSr=07E909041FE3B> (дата обращения: 25.05.2026). Q4
2. Approach to Design of Potent RNA Interference-Based Preparations Against Hepatocellular Carcinoma-Related Genes / P. V. Chernov, V. N. Ivanov, N. A. Dmitriev [et al.]. – Text : electronic // International Journal of Molecular Sciences. – 2026. – Vol. 27. – № 2. – P. 603. – URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/27/2/603> (date accessed: 25.05.2026). Q1
3. Refined Design and Liquid-Phase Assembly of GalNAc-siRNA Conjugates: Comparative Efficiency Validation in PCSK9 Targeting / N.A. Dmitriev, P.V Chernov, I.S. Gongadze [et al.]. – Text : electronic // Molecules. – 2026. – Vol. 31. – № 3. – P. 476. – URL: <https://www.mdpi.com/1420-3049/31/3/476> (date accessed: 25.05.2026). Q1
4. Gusev A.E., Chernov P.V., Dmitriev N.A., Kofiadi I.A. Single cell RNA sequencing: modern approaches and achievements – Text : electronic // RUDN Journal of Medicine. - 2025. - Vol. 29. - N. 4. - P. 421-435. – URL: <https://journals.rcsi.science/2313-0245/article/view/359600>. Q4