

**Аннотация проекта (ПНИЭР), выполняемого в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы»**

**Номер Соглашения о предоставлении субсидии/государственного контракта:** 14.604.21.0111

**Название проекта:** Получение нуклеиновых кислот с помощью трифосфатов дезоксинуклеозидов, содержащих низкомолекулярные функциональные группы на пиримидиновых основаниях.

**Основное приоритетное направление:** Науки о жизни

**Исполнитель:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

**Руководитель проекта:** Чудинов Александр Васильевич

**Должность:** снс

**E-mail:** chud@eimb.ru

**Ключевые слова:** нуклеозиды, нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, модифицированные нуклеозидтрифосфаты, аптамеры, органический синтез

### **Цель проекта**

1. Разработать методы получения ПЦР-амплифицируемых фрагментов ДНК, содержащих на гетероциклических основаниях низкомолекулярные функциональные группы, включая фрагменты аминокислот, входящих в антигенсвязывающие центры иммуноглобулинов, для создания технологических основ направленного синтеза ДНК-аптамеров, способных специфично взаимодействовать с биологическими мишенями различной природы, включая молекулы белков и нуклеиновых кислот. Увеличение разнообразия нуклеотидов для расширения областей применения модифицированных ДНК в биотехнологических исследованиях и приложениях.
2. Разработать методы получения нуклеозидтрифосфатов с функциональными группами на гетероциклических основаниях пригодных для получения аптамеров по методу SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment, или Систематическая эволюция лигандов экспоненциальным обогащением), а именно, быть совместимыми с ДНК-полимеразами и после включения в ДНК обладать сродством к белковой молекуле-мишени. Синтетический поиск структур производных дезоксиурidinтрифосфата, несущих по С5-положению фрагменты аминокислот, испытание на совместимых с ДНК полимеразам и пригодность для метода SELEX.

### **Основные планируемые результаты проекта**

1. С начала выполнения проекта синтезировано восемь образцов трифосфатов дезоксиуридина связанные по С5-положению с фенилуксусной, фенилпропионовой, индолуксусной, индолпропионовой, индолмасляной, изомасляной, изовалериановой и 4-метилвалериановой кислотой транс-алкеновым (этиленовым) линкером. Для синтеза этих соединений использовалась схема, которая включает многостадийное получение 5`-трифосфата 5-аминоаллил-2`-дезоксиуридина и его ацилирование по аминогруппе гидроксисукцинимидными эфирами соответствующих кислот. Разработаны две лабораторные методики получения модифицированных

трифосфатов дезоксиуридина с функциональной группой на гетероциклическом основании, с фенилуксусной и индолуксусной кислотой. Эффективность синтезированных трифосфатов для встраивания модифицированных нуклеотидов в ДНК методом достраивания праймера (primer extension) проверяли на двух моделях. На первой модели, эффективность проверяли на плазмидной ДНК-матрице с радиоактивно-меченым праймером, Taq и DeepVent ДНК-полимеразами. Разделение продуктов реакции проводили на денатурирующем полиакриламидном геле высокого разрешения с радиографическим контролем. Установлена высокая эффективность встраивания всех модифицированных нуклеотидов в синтезируемую цепь ДНК DeepVent ДНК-полимеразой с образованием полноразмерного продукта. В синтезируемой ДНК имелись встраивания модифицированных нуклеотидов единожды и дважды в различных нуклеотидных окружениях.

На второй модели, использовали синтетическую ДНК-матрицу предусматривающую введение модифицированного нуклеотида подряд дважды, трижды и четырежды, Taq, KOD XL, DeepVent и Vent (exo-) ДНК-полимеразы. Контроль вели методом электрофореза в денатурирующих условиях с окрашиванием продуктов красителем SYBR Green и регистрацией в ультрафиолетовом свете. Найдено, что все полимеразы способны включать модифицированные нуклеотиды, в том числе с тройным и четверным повтором, с образованием полноразмерного продукта. Выход полноразмерных продуктов различается, как для различных модифицированных нуклеотидов, так и для различных ДНК-полимераз. При этом по выходу полноразмерных продуктов KOD XL превосходит другие ДНК-полимеразы. С использованием KOD XL ДНК-полимеразы были получены одонитевые ДНК, содержащие модифицированные нуклеотиды, а затем с нее вновь получены не модифицированные одонитевые ДНК.

Эффективность синтезированных трифосфатов для встраивания модифицированных нуклеотидов в ДНК методом ПЦР проверяли на синтетической ДНК-матрице с Taq, KOD XL и DeepVent ДНК-полимеразами. Результаты контролировали методом электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле. Найдено, что при полной замене природного dTTP на модифицированные нуклеозидтрифосфаты, в условиях проведения ПЦР, полноразмерные продукты ПЦР не образуются. Полноразмерные продукты ПЦР со встраиванием модифицированных нуклеотидов синтезируются только при частичной замене природного dTTP на модифицированные нуклеозидтрифосфаты и только с Taq ДНК-полимеразой. По эффективности встраивания все модифицированных нуклеозидтрифосфата различаются очень незначительно.

2. Планируется продолжить синтез трифосфатов дезоксиуридина несущих по С5-положению функциональные группы аминокислот тирозина и гистидина для увеличения разнообразия аффинных свойств нуклеотидов способных специфично взаимодействовать с биологическими мишенями различной природы, включая молекулы белков и функционально значимых низкомолекулярных соединений.

Эффективность встраивания в ДНК модифицированных нуклеотидов будет

проверена методом достраивания праймера (primer extension) с Taq, DeepVent, KOD XL, а также Vent (exo-) ДНК-полимеразами. На коротких фрагментах контроль будет проводиться методом электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле с окрашиванием продуктов красителем SYBR Green и регистрацией в ультрафиолетовом свете. Для длинных фрагментов, которые больше подходят для амплификации методом ПЦР, контроль в денатурирующем полиакриламидном геле высокого разрешения с радиографическим контролем. Будет синтезирована библиотека олигонуклеотидов, изготовлена матрица иммобилизованных олигонуклеотидных зондов, на которой будет проводиться контроль результатов снятия с модифицированной ДНК копии нативной ДНК и продуктов ее амплификации.

### **Краткая характеристика создаваемой/созданной научной (научно-технической, инновационной) продукции**

1. Трифосфаты дезоксиуридина связанные по С5-положению с фенилуксусной, фенилпропионовой, индолуксусной, индолпропионовой, индолмасляной, изомасляной, изовалериановой и 4-метилвалериановой кислотой с транс-алкеновым (этиленовым) линкером синтезированы в количестве достаточном для проведения испытаний методом достраивания праймера (primer extension), методом ПЦР, а также для получения аптамеров по методу SELEX.
2. Одним из главных условий проведения SELEX является совместимость модифицированных трифосфатов дезоксирибонуклеозидов с ДНК-полимеразами, возможность получения модифицированной однонитевой ДНК при копировании немодифицированной ДНК и получения немодифицированной однонитевой ДНК при копировании модифицированной ДНК без нарушения нуклеотидной последовательности. Полученные в ходе выполнения проекта соединения в полной мере позволяют выполнять обе процедуры. Элементом новизны данного проекта являются синтезированные молекулярные конструкции на основе трифосфата дезоксиуридина, связанные по С5-положению с функциональными группами транс-алкеновым (этиленовым) линкером, которые оказались совместимы с KOD XL ДНК-полимеразой. В качестве функциональных групп, использованы группы характерные для аминокислот входящих в антигенсвязывающие центры иммуноглобулинов.
3. Конструирование и разработка методов синтеза модифицированных нуклеозидтрифосфатов, содержащих специальные низкомолекулярные функциональные группы для взаимодействия с белковыми молекулами-мишенями представляется крайне важной и непростой задачей мирового уровня в области молекулярно-генетических исследований, требующей значительных знаний в различных областях химии и молекулярной биологии. Решение этой задачи открывает новое направление исследований с большими перспективами дальнейшего развития, как в области научных исследований, так и био-медицинских приложений.
4. Методология проведения работ основывается на синтезе серии производных трифосфатов дезоксиуридина с системным изменением структуры, несущей функциональные группы аминокислот фенилаланина,

триптофана, валина, тирозина, гистидина, наиболее часто входящих в антигенсвязывающие центры иммуноглобулинов. Меняется химическое строение линкера соединяющего нуклеиновое основание с функциональной группой. Для энзиматического получения ДНК с модифицированными нуклеотидами исследуются несколько наиболее перспективных ДНК-полимераз. Ферменты чрезвычайно чувствительны к структурным особенностям субстратов. Заранее предсказать наиболее эффективный способ присоединения аминокислотного фрагмента к нуклеотиду сложно. В ряду производных с неизменной функциональной группой и изменяющимся линкером можно будет найти соединения совместимые с ДНК-полимеразами. Затем среди производных с различными функциональными группами с подходящей ДНК-полимеразой методом SELEX можно будет найти те соединения, которые наиболее подходят для заданной белковой мишени. Для другой белковой мишени могут потребоваться модифицированные нуклеотиды с другими функциональными группами. Контроль эффективности и правильности получения копий модифицированной ДНК с не модифицированной и, обратного получения не модифицированных копий с модифицированной ДНК, проводится на разных моделях несколькими независимыми методами. Данный подход позволяет надеяться на эффективный выбор структур производных трифосфатов дезоксиуридина для использования в процедуре SELEX и на успешное выполнение проекта в целом.

### **Назначение и область применения, эффекты от внедрения результатов проекта**

1. Дезоксинуклеозидтрифосфаты с низкомолекулярными функционально-значимыми группами на пиримидиновых основаниях, будут использоваться, прежде всего, в организациях, ведущих исследования, по созданию модифицированных ДНК-аптамеров (сомамеров) с целью создания высокотехнологичного производства препаратов, способных специфично взаимодействовать с биологическими мишенями различной природы, включая молекулы белков и функционально значимых низкомолекулярных соединений. Одной из таких организаций является Государственное бюджетное учреждение Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН, в котором ведутся исследования принципов конструирования и селекции аптамеров. В качестве мишени выбран белок Аполипротеин Е, играющий важную роль в патогенезе болезни Альцгеймера. В случае получения эффективного аптамера к одному из значимых белков, появятся реальные перспективы для получения панелей аптамеров к другим значимым белкам, расширения протеомных исследований практической медицинской направленности, коммерциализации разработок, связанных с аптамерами.
2. Положительные результаты ПНИ в части применения новых трифосфатов дезоксинуклеозидов, содержащих низкомолекулярные функциональные группы на пиримидиновых основаниях, потребуют в дальнейшем разработки

технологии их масштабного получения, аттестации и сертификации в соответствии с законодательством РФ. Эта работа будет выполняться индустриальным партнером ООО БИОЧИП-ИМБ, подписавшим соответствующее соглашение и заинтересованным в будущем производстве и распространении трифосфатов дезоксинуклеозидов, содержащих низкомолекулярные функциональные группы на пиримидиновых основаниях. Эти соединения будут производиться в России впервые, и в их использовании будут заинтересованы организации, занимающиеся разработкой модифицированных ДНК-аптамеров (сомамеров) с целью создания высокотехнологичного производства препаратов, способных специфично взаимодействовать с биологическими мишенями различной природы, включая молекулы белков и нуклеиновых кислот.

3. Использование результатов проекта в работах связанных с получением модифицированных ДНК-аптамеров, заменяющих по некоторым свойствам антитела, позволит получить панели аптамеров к ряду значимых белков, расширит протеомные исследования практической медицинской направленности, и в конечном итоге приведет к снижению риска смертности и повышению качества жизни. Результаты проблемно-ориентированных научных исследований по разработке методов получения фрагментов модифицированных ДНК, повысят конкурентные позиции отечественных производителей продукции медицинского назначения. В конечном итоге будут снижены импортные закупки высокотехнологичных диагностических тест-систем и комплектующих материалов.

4. Положительные результаты ПНИ в части применения новых модифицированных трифосфатов дезоксинуклеозидов для создания модифицированных ДНК-аптамеров (сомамеров) могут заинтересовать исследователей западных стран в части научной информации и популяризации результатов. Исследования по разработке методов получения сомамеров ведутся там давно и интерес к получению ДНК-аналогов моноклональных антител для исследований и терапии, ДНК-аналогов энзимов, судя по объему публикаций, очень значительный. А вот со странами СНГ возможно научное сотрудничество не только в части научной информации, но и практического использования модифицированных трифосфатов дезоксинуклеозидов для совместного создания сомамеров к различным функционально-значимым белкам, для решения насущных задач биомедицинской направленности.

### **Текущие результаты проекта**

1 Осуществлен экспериментальный подбор условий для проведения ПЦР с трифосфатами дезоксинуклеозидов с функциональными группами на гетероциклических основаниях для получения модифицированных ДНК

2 Выполнена экспериментальная проверка аффинных (специфичных) свойств полученных в ходе ПЦР фрагментов ДНК с функциональными группами на гетероциклических основаниях в отношении молекулярных мишеней, на основе ДНК.

3. Осуществлен синтез 3 (трех) экспериментальных образцов трифосфатов дезоксинуклеозидов с функциональными группами на гетероциклических

основаниях различающихся химическим строением функциональных групп и химическим строением линкера, связывающего функциональную группу с гетероциклическим основанием.

4. Выполнена хроматографическая очистка и масс-спектрометрический контроль 3 (трех) промежуточных полупродуктов и образцов трифосфатов дезоксинуклеозидов с функциональными группами на гетероциклических основаниях, полученных на 3 этапе.

5. Проведены лабораторных испытаний 3 (трех) экспериментальных образцов трифосфатов дезоксинуклеозидов с низкомолекулярными функциональными группами на гетероциклических основаниях в качестве реагентов ПЦР.

6. Выполнена химическая очистка растворителей и исходных реагентов, используемых на 3 этапе для синтеза 3 (трех) трифосфатов дезоксинуклеозидов с функциональными группами на гетероциклических основаниях.

7. Разработана лабораторная методика получения модифицированных нуклеиновых кислот с функциональными группами на гетероциклических основаниях.