

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ
МЕДИЦИНЫ СО РАН



ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
«СИНТЕТИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ И БИОФАРМАЦЕВТИКА»

Новосибирск, 24–28 июля 2022 г.

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ

НОВОСИБИРСК
2022

УДК 577.1
ББК 28.072

Синтетическая биология и биофармацевтика. Материалы всероссийской конференции. Новосибирск, 24–28 июля 2022 г.– Новосибирск. ООО «Офсет-ТМ». 2022. — 280 стр.

Сборник содержит материалы научной конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика».

Сборник предназначен для широкого круга биохимиков, биофизиков, специалистов в биоорганической химии, молекулярной и клеточной биологии, биотехнологии.

Программный комитет:

Председатель академик РАН Власов В.В.	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
академик РАН Габиров А.Г.	Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва
академик РАН Лаврик О.И.	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
академик РАН Нетесов С.В.	Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск
чл.-корр. РАН Пышный Д.В.	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
чл.-корр. РАН Зенкова М.А.	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
чл.-корр. РАН Жарков Д.О.	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Рихтер В.А.	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Коваль О.А.	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Тикуннова Н.В.	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Воробьева М.А.	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Дымова М.А.	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Организационный комитет:

к.б.н. Рихтер В.А., к.х.н. Пестряков П.Е.,
к.х.н. Лебедева Н.А.,
Зуева А.И., Васильева А.М.,
Жиловская И.Н.

ДОРОГИЕ ДРУЗЬЯ, КОЛЛЕГИ!

Развитие химических и генетических технологий в последние годы открыло принципиально новые перспективы для создания биологических молекул и структур, которые могут служить терапевтическими препаратами. Стала реальностью возможность теоретического предсказания оптимального строения молекул, избирательно связывающихся с определенными белками, разработаны различные варианты комбинаторных подходов, позволяющих отбирать из библиотек соединений специфические лиганды.

Появился новый пограничный раздел наук – синтетическая биология, одной из главных задач которой является создание биоподобных структур терапевтического назначения.

Стали реальностью рациональный синтез ген-направленных препаратов на основе нуклеиновых кислот, получение генетически модифицированных терапевтических вирусов и клеток. События в этой области развиваются все более стремительно, открывая новые возможности для создания новых технологий, которые все в большей степени формируют облик медицины нового поколения.

Междисциплинарные научные исследования позволяют существенно приблизить решение одной из приоритетных задач, озвученных в Стратегии научно-технологического развития РФ – “переход к персонализированной медицине, высоко-технологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных)”.

С целью рассмотрения актуальных вопросов, связанных с разработкой методами синтетической биологии терапевтических препаратов и вакцин на основе синтетических олигонуклеотидов и полинуклеотидов, белков, модифицированных, вирусов, бактерий, а также биоподобных структур и интеллектуальных материалов для медицины Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН проводит в 2022 году конференцию **«Синтетическая биология и биофармацевтика»**.

Основные направления работы конференции:

- интеллектуальные терапевтические препараты на основе белков и нуклеиновых кислот;
- создание диагностических систем, технологий и средств терапии;
- технологии управления геномом.

Выбор дат проведения конференции не случаен: 28 июля – день рождения академика Дмитрия Георгиевича Кнорре, выдающегося ученого, благодаря которому в Сибири была создана школа молекулярных биологов, организатора Института химической биологии и фундаментальной медицины, в котором впервые в мире были начаты работы по созданию ген-направленных биологически активных веществ.

Председатель программного оргкомитета
академик РАН В.В. Власов

СПОНСОРЫ КОНФЕРЕНЦИИ

ГЕНЕРАЛЬНЫЕ СПОНСОРЫ



ООО «БИОСАН»
630090, г. Новосибирск,
ул. Инженерная, 28
+7 (383) 363-22-40
svt@biolabmix.ru
biosan-nsk.ru



ООО «Диаэм»
129346, г. Москва, а/я 100
+7(495) 745-05-08
sales@dia-m.ru
www.dia-m.ru



Акционерное общество «Р-Фарм»
Адрес юридический: 123154, Москва,
ул. Берзарина, д. 19, корп. 1
Адрес почтовый: 119421, г. Москва,
Ленинский пр-т, д. 111 к.1
8-495-956-79-37
info@rpharm.ru
rpharm.ru



ООО «НООГЕН»
630090, Новосибирская область, г.
Новосибирск, Инженерная ул., д. 28
+79139266757
Ceo@noogen-oligos.ru

СПОНСОРЫ



ООО «М-Спектр»

125167, г. Москва,
ул. Авиаконструктора Микояна, 12,
БЦ «Линкор», корпус А, подъезд 11 Т.
+7 (495) 765-43-11

info@m-spectr.ru

<https://m-spectr.ru/>



АО «ГенТерра»/GenTerra JSC

129085, г. Москва, ул. Годовикова, д. 9,
стр. 1, помещение 1.12, Россия
+7 (495) 721-29-70, +7 (929) 692-58-64

info@genterra.ru

<http://www.genterra.ru>



ООО «БИОГЕН-АНАЛИТИКА»

127422, Москва, ул. Тимирязевская,
д. 1, стр. 2
+7 499 704 62 44
84997046244@bga.su

www.bga.su



ООО «МИЛЛАБ Система»
630090, г. Новосибирск, ул.
Инженерная, д. 4 А, оф. 625
630090

sibir@millab.ru
<https://millab.ru/>



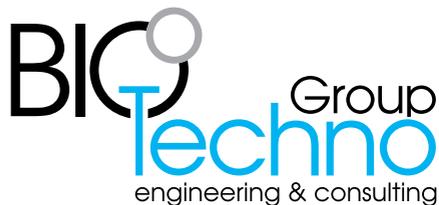
ООО «Аламед»
РФ, 125167, г. Москва, ул.
Красноармейская, д. 2, стр. 4, офис 204
+7 (495) 614-45-97

info@alamed.ru
alamed.ru



ООО «ВнешБиоТорг»
105120, г. Москва, Костомаровский
переулок, дом 3, стр.4 этаж 2,
помещение I, комната 19
+7 (495) 760-05-07

order@vneshbiotorg.ru
www.vneshbiotorg.ru



ООО «БИОТЕХНО»
117587, г. Москва,
ул. Днепропетровская, д. 2
8-800-222-88-10
+7 (495) 925-3453
+7 (495) 995-0565

moscow@biotechno.ru
<https://biotechno.ru>



ООО «Биолабмикс»
630090, г. Новосибирск,
ул. Инженерная, 28
+7 (383) 363-22-40

sales@biolabmix.ru
biolabmix.ru



ООО «Биолайн»
197022, Россия, г. Санкт-Петербург,
ул. Проф. Попова, д.23, лит. Е
+7 (812) 320-49-49

main@bioline.ru
www.bioline.ru



ООО «Компания Хеликон»
121374, Москва, Кутузовский
проспект, д. 88
8 800 770 71 21 (звонки с любых
телефонов РФ бесплатны)
+7 499 705 50 50 (в Москве)

mail@helicon.ru
www.helicon.ru



ООО «Реолгрейд сервис»
630559, Новосибирская область,
р.п. Кольцово,
ул. Технопарковая, д. 5, оф. 11
+7 (383) 347-44-54
+7 (383) 347-44-54

reolgrade@reolgrade.ru
<http://reolgrade.ru/>



ООО «Химмед Сибирь»

630090, г.Новосибирск,
пр. Ак. Лаврентьева, д. 6/1, ком. 100
+7 (383) 335-61-02, +7-923-227-99-74

sibir@chimmed.ru

www.chimmed.ru



ООО «БЕЛБИОЛАБ»

Реагенты для молекулярной биологии
Москва, ул. Годовикова 9
+7 495 956 2320

order@belbiolab.ru

belbiolab.ru



ЗАО «Евроген»

117997, Россия, г. Москва,
ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15
+7(495)784-70-84

order@evrogen.ru

<https://evrogen.ru/>



BIOSAN

Реагенты для ПЦР и
молекулярной биологии

30 ЛЕТ

**стабильно высокого
качества**

www.biosan-nsk.ru

Since 1992

Разработка, производство и реализация высококачественных компонентов для ПЦР-диагностики и молекулярно-биологических исследований.

- Стандартные нуклеозидтрифосфаты dATP, dCTP, dGTP, dTTP и dUTP
- Модифицированные нуклеозидтрифосфаты (22 типа)
- Ферменты Taq ДНК-полимераза, Hot-Start Taq ДНК-полимераза, ревертаза MoMLV, Bst ДНК-полимераза
- **Иммунохимические реактивы**
моноклональные антитела, аффинноочищенные антитела, конъюгаты с пероксидазой хрена и биотином
- **Олигонуклеотидный синтез**
праймеры и зонды для ПЦР, модифицированные олигонуклеотиды
- **Реактивы для мРНК**
m1ΨTP, ΨTP, m6ATP, m5CTP, ARCA

Отдел продаж в Новосибирске:
+7 (383) 363-22-40
svt@biolabmix.ru
www.biosan-nsk.ru





Р-ФАРМ

Инновационные
технологии
здоровья

6500+
сотрудников

2001
год основания

70+
филиалов

Исследования
и разработки

Производство

Маркетинг

Дистрибуция



на правах рекламы

Группа компаний «Р-Фарм» предлагает комплексные решения для системы здравоохранения, специализируясь на исследованиях и разработке, производстве и дистрибуции лекарственных средств, лабораторного оборудования и медицинской техники. Миссия «Р-Фарм» – сделать инновационные методы защиты здоровья более доступными.

Выше 6500 сотрудников группы прикладывают максимальные усилия для того, чтобы обеспечить как можно больше людей необходимыми средствами для улучшения качества и повышения продолжительности жизни.

В структуру «Р-Фарм» входят 9 высокотехнологичных производственных площадок, каждая из которых отвечает международным стандартам качества. Группой компаний заключены соглашения о стратегическом партнерстве, локализации производства, трансфере технологий с ведущими мировыми производителями фармацевтической продукции и медицинской техники.

Одним из важнейших направлений деятельности ГК «Р-Фарм» является исследование и разработка лекарственных средств. Работы R&D ведутся как собственными структурными подразделениями, так и с привлечением сторонних лабораторий и организаций. Сегодня в портфель группы входит более 20 наукоёмких продуктов, многие из которых способны в будущем внести серьёзный вклад в усиление борьбы против ряда социально значимых заболеваний.

«Р-Фарм» занимается организацией социально значимых проектов, направленных на повышение осведомленности об опасных заболеваниях, профилактику здорового образа жизни, совершенствование системы образования и воспитание нового поколения лидеров фармацевтической отрасли.



Efficient tools for a complete RNA-Seq pipeline

RNA Extraction Kit



Poly(A) RNA
Selection Kit



Whole Transcriptome
Library Prep Kit



Metabolic RNA-Seq Kit



Targeted RNA-Seq
Library Prep Kit



RNA-Seq Data
Analysis Software



Spike-In RNA Controls



rRNA Depletion Kit



Small RNA-Seq
Library Prep Kit



Expression Profiling
Library Prep Kit
Full Service Available



Full-Length cDNA
Amplification Kit

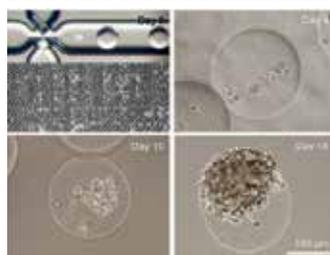
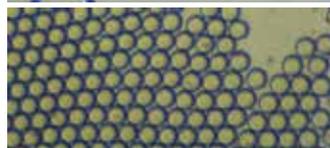
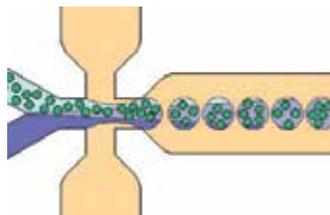




Высокопроизводительная инкапсуляция клеток μEncapsulator



Система **μEncapsulator, Dolomite Bio** – полноценная система для высокопроизводительной инкапсуляции отдельных клеток в капли объемом несколько пиколитров. Система позволяет генерировать до 300 000 капель за 15 минут с сохранением жизнеспособности клеток, обеспечивает широкий спектр применений в приложениях, где требуется деликатная инкапсуляция живых клеток в гидрогель.



- Высокая производительность инкапсуляции - до 300 000 капсул за 15 мин
- Высокая монодисперсность капель эмульсии - CV менее 5%
- Редактирование и корректировка параметров инкапсуляции в режиме реального времени
- Гибкая открытая система с возможностью контроля давления и скорости потока
- Многоцветные микрофлюидные чипы

000 «Диаэм»

Москва
ул. Магаданская, д. 7, к. 3 ■ тел./факс: (495) 745-0508 ■ sales@dia-m.ru

www.dia-m.ru

Новосибирск
пр. Академика
Лаврентьева, д. 6/1
тел.
(383) 328-0048
nsk@dia-m.ru

Казань
ул. Парижской
Коммуны, д. 6
тел.
(843) 210-2080
kazan@dia-m.ru

С.-Петербург
ул. Профессора
Попова, д. 23
тел.
(812) 372-6040
spb@dia-m.ru

**Ростов-
на-Дону**
пер. Семашко, д. 114
тел.
(863) 303-5500
rnd@dia-m.ru

Пермь
Представитель
тел.
(342) 202-2239
perm@dia-m.ru

Воронеж
Представитель
тел.
(473) 232-4412
voronezh@dia-m.ru

Армения
Представитель
тел.
(094) 01-0173
armenia@dia-m.ru

Узбекистан
Представитель
тел.
(90) 354-8569
uz@dia-m.ru

Современное биотехнологическое производство достигло высокого уровня развития в Восточных Странах: Китае, Корее, Японии.

Задача нашей компании - обеспечение Российским научным учреждениям и предприятиям, занятым в области биотехнологии, доступа к продукции этих стран.

В условиях нарастающего мирового кризиса мы помогаем Российским потребителям избежать односторонней зависимости от Западных производителей.

Мы поставляем российским научным учреждениям и предприятиям, занятым в области биотехнологии:

GALAK
PURSUE EXCELLENCE

Хроматографические сорбенты для всех видов и режимов жидкостной хроматографии включая: «обращенную» и «нормальную» фазу, эксклюзионную, аффинную, ионообменную, гидрофобную и перфузионную хроматографии.

SUNTRINE®
鑫联诚润

Культуральный пластик для молекулярной, клеточной биологии, клинических испытаний, отбора проб ДНК, вирусов, скрининге лекарственных средств, генетическом тестировании

H&E
慧德易科技

Хроматографические колонки и системы препаративной хроматографии низкого, среднего и высокого давления, блоки подготовки буфера и фильтрации

JSBio

Питательные среды, добавки, реактивы для культивирования клеток

YEASEN

Ферменты, добавки и реактивы



Sepax Technologies
Better Surface Chemistry for Better Separation

Сорбенты для ВЭЖХ, промышленная очистка и разделение

DIIONING
多宁生物

Одноразовые мешки, трубки, хранение, смешивание, отбор проб

ANSTAR

Биотехнологическое оборудование

BLUE-RAY
BIOTECH

Аналитическое оборудование.
Пипеточные дозаторы, спектрофотометры, амплификаторы, системы визуализации живых клеток, микроцентрифуги, системы ПЦР в режиме реального времени



127422, Москва, ул.
Тимирязевская, д. 1, стр. 2

Тел./факс: +7 499 704 62 44
e-mail: 84997046244@bga.su
www.bga.su

ООО «БИОГЕН-АНАЛИТИКА»

Российская компания БИОГЕН-АНАЛИТИКА основана в 2004 году. Мы эффективно используем накопленные профессиональные знания и умения для обеспечения наших заказчиков продукцией и услугами в сферах образования, науки и медицины, а также в других областях, непосредственно связанных со здоровьем и благополучием нашей страны.



Наши сферы деятельности

- Генетика
- Исследования клеток
- Протемика
- Доклинические исследования



The logo for GEN TERRA, featuring the word "GEN" in a bold, teal, sans-serif font above the word "TERRA" in a similar font, both contained within a bright yellow circle.

ГенТерра

отечественный производитель
синтетических олигонуклеотидов,
магнитных сорбентов и реагентов
для ПЦР и олигосинтеза

Синтез Олигонуклеотидов

- Огромный Выбор Модификаций
- Широкий Спектр Услуг
- Очистка
- Аликвотирование
- Xtra Quality Control
- IVD-уровень Очистки
- Life Science Услуги
- ISO13485 и ISO9001
- Высокие Стандарты Качества
- Масштабируемое Производство
- Гибкость в Обслуживании Клиентов

Магнитные Сорбенты

- Выделение Нуклеиновых Кислот
(например: для приготовления ДНК Библиотек)
- Функциональное Покрытие NH₂ - или COOH-группами
- Подходят для Ручного и Автоматизированного Раскапывания



Реагенты для ПЦР и Олигосинтеза

- Ферменты
- Мастер Миксы
- Наборы
- Буферы
- Реагенты для Олигосинтеза
- Флуоресцентные Метки
- Гасители



Мы для Вас - стратегически важный партнер в разработке диагностических ПЦР систем и в исследованиях экспрессии генов, генотипирования и функциональной геномики (ASO, siRNA, miRNA).

АО "ГенТерра"
Адрес: 129085, г. Москва, ул. Годовикова, дом 9, строение 1,
этаж 1, подъезд 1, помещение 1.12, комната 1.12.1
Телефон: +7 495 721 29 70, +7 929 692 58 64
Email: info@genterra.ru Web: www.genterra.ru





ООО «МИЛЛАБ Система»

О нас

ООО «МИЛЛАБ Система» - Новосибирский филиал Группы компаний «МИЛЛАБ». На протяжении более 25 лет мы специализируемся на поставках лабораторного и высокотехнологичного оборудования для биологических и химических лабораторий научно-исследовательского направления, а также производств.

Наши контакты

Телефон: 8 383 363 09 00

Эл. почта: sibir@millab.ru

Сайт: millab.ru



В 2022 году Новосибирский филиал ООО «МИЛЛАБ Система» отмечает свои 15 лет успешного выстраивания партнёрских отношений с нашими клиентами по всему СФО и ДВФО.

В этом году мы рады Вам представить наших новых партнёров:

DLAB Scientific - ротационные испарители, центрифуги, магнитные мешалки, верхнеприводные мешалки, шейкеры и вортексы, ПЦР-амплификаторы, дозаторы жидкости, спектрофотометры, твердотельные термостаты, гель-документирующие системы;

BIOBASE - центрифуги, водяные бани, оборудование для выделения нуклеиновых кислот, гомогенизаторы, мельницы, инкубаторы и сушильные шкафы, микроскопы, плотномеры, рефрактометры, холодильники, ультразвуковые ванны;

Vikumer - лабораторные лиофильные сушилки;

LNEYA - циркуляционные охладители для лаборатории и пилотных установок;

Расходные материалы **Membrane Solutions** и **Jiangsu Huida Medical Instruments**;

Различные решения по оборудованию для ЭЖХ, ВЭЖХ-МС, ГХ, ГХ-МС, ААС, ИСП-МС, ИСП-ОЭС, Искровая ОЭС, РФА, УФ

И многие другие партнёры по направлению оборудования для биологических и химических лабораторий, а также производств.

Группа компаний «МИЛЛАБ» стремится обеспечить клиентов высококачественным оборудованием с максимальным уровнем сервисной поддержки для эффективного решения технологических и аналитических задач. Наш опыт и наша надёжность подтверждаются сотрудничеством с лидерами рынка фармацевтического, пищевого, сельскохозяйственного направлений, а также научного сектора.

Более 10000 лабораторий и предприятий стали клиентами Группы компаний «МИЛЛАБ», и с большинством из них мы сотрудничаем на постоянной основе.

Будем рады развивать и поддерживать сотрудничество с Вами!

Группа
компаний
«МИЛЛАБ»

Рядом с вами с 1996 года



Life Science & Clinical Diagnostics



Геномика

qPCR, выделение НК, таргетное обогащение, капиллярное секвенирование, нуклеазы, протеазы и другие ферменты



Протеомика

FPLC-хроматография, электрофорез, системы анализа аффинности, гель-документирование, блоттинг, буферы для электрофореза



Клеточные технологии

Цитометрия, имиджинг, ELISPOT, системы культивирования, микропланшетные технологии, среды и добавки для культивирования, сыворотки



Прикладная биотехнология

Up&Down-stream, фильтрация, центрифугирование, системы очистки воды, хроматографические колонки и сорбенты



Онкология

Иммуногистохимия Ventana, ПЦР-тесты, KRAS, BRAF, EGFR, PIK3CA, молекулярная диагностика ВПЧ, капиллярное секвенирование, наборы для секвенирования по Сэнгеру



+7 (495) 614 45 97
alamed.ru

Группа компаний «БИОТЕХНО»



ИНЖИНИРИНГ И КОМПЛЕКСНЫЕ ПОСТАВКИ
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ОБОРУДОВАНИЯ



ООО «БИОТЕХНО»
117587, г. Москва, ул.
Днепропетровская, д. 2
8-800-222-88-10
+7 (495) 925-3453
+7 (495) 995-0565
moscow@biotechno.ru





Biolabmix®

**ГОТОВЫЕ РЕШЕНИЯ
ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ
БИОЛОГИИ**

- Наборы для выделения ДНК и РНК**
- Мастермиксы для проведения ПЦР:**
 - классическая ПЦР
 - ПЦР в режиме реального времени
 - ПЦР длинных фрагментов
 - ОТ-ПЦР одношаговым методом
- Наборы для проведения обратной транскрипции**
- Олигонуклеотиды**
- Маркеры молекулярных весов для ДНК**
Ready-to-use, диапазон длин от 100 до 10 000 п.н.
- Система детекции РНК вируса SARS-CoV-2**

Отдел продаж в Новосибирске:

sales@biolabmix.ru | +7 (383) 363-22-40

Электронный заказ на сайте: www.biolabmix.ru

BIO LINE LIFESCIENCE

Инновационные технологии, оборудование, реагенты и расходные материалы для медико-биологических исследований любого уровня в направлениях молекулярной и клеточной биологии, гистологии, исследований на лабораторных животных.



BD

Leica



LCI



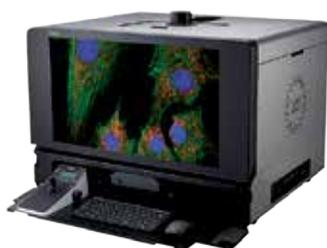
Vazyme



GenScript
Make Research Easy

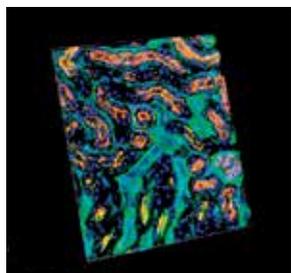
Имиджер

Image ExFluorer

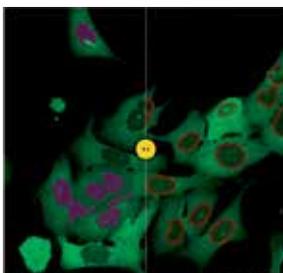


Полностью автоматизированная система для визуализации и анализа живых клеток и фиксированных препаратов.

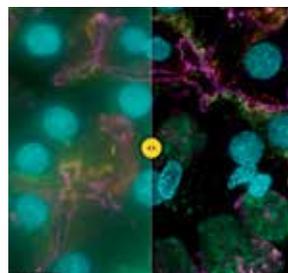
- Система «все в одном»
- Широкий выбор флуоресцентных фильтров и объективов
- Оптические компоненты от Nikon
- 2D и 3D визуализация
- Методы светлого поля, фазового контраста и флуоресценции
- Контроль температуры, влажности, CO₂, O₂
- Автоматизированная съемка многолуночных планшетов и HCS
- Обработка и анализ изображений с использованием ИИ



Интуитивно понятный интерфейс для быстрой настройки параметров эксперимента и получения высококачественных результатов.



Автоматическое удаление размытия с флуоресцентных изображений предварительно обученными алгоритмами машинного обучения



Анализ изображений и сегментация объектов за счет использования технологий искусственного интеллекта



группа компаний

ООО «БиоЛайн»

197022, Россия, Санкт-Петербург
ул. Проф. Попова, д. 23, лит. Е
тел.: +7 (812) 320 49 49
факс: +7 (812) 320 49 40
e-mail: main@bioline.ru
www.bioline.ru

Москва, тел.: +7 (800) 555 49 40
Новосибирск, тел.: +7 (383) 227 09 63
Н. Новгород, тел.: +7 (831) 278 61 47
Екатеринбург, тел.: +7 (922) 034 22 11
Ростов-на-Дону, тел.: +7 (928) 192 90 40
Самара, тел.: +7 (927) 688 28 49
Уфа, тел.: +7 (937) 855 78 52
Казань, тел.: +7 (937) 006 64 48
Хабаровск, тел.: +7 (924) 203-10-58



евроген

Российская биотехнологическая компания,
основанная в 2000 г.

Основные направления деятельности: выполнение сервисных работ и производство наборов и реактивов, широко используемых для рутинных задач в научных лабораториях, биотехнологических и фармацевтических компаниях.

Наборы и реактивы предназначены для:

- выделения и очистки ДНК и РНК;
- постановки ПЦР и ПЦР-РВ (включая полимеразы и готовые смеси);
- работы с кДНК (включая ревертазы и наборы для синтеза кДНК);
- выявления контаминации микоплазмой в культурах клеток;
- клонирования ДНК и др.

Сервисные работы выполняются по направлениям:

- синтез олигонуклеотидов;
- секвенирование по Сэнгеру и NGS;
- геновая инженерия (синтез генов, мутагенез, клонирование);
- синтез органических соединений и разработка полупромышленных технологий синтеза.



НОМОТЕК

Компания НОМОТЕК (Новые Молекулярные Технологии)
была основана в 2012 году на базе группы компаний Евроген.

Наборы для диагностики *in vitro* (IVD):

- «ЭкстрактДНК FFPE» для выделения ДНК из FFPE-блоков;
- «Инсайдер» для качественного определения мутаций в генах человека: *EGFR*, *KRAS*, *NRAS* и *BRAF*;
- «ГенТест-М *BRCA1*, *BRCA2*» для выделения ДНК и выявления наследственных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*.

Наборы для научно-исследовательского применения (RUO):

Для выявления аллельных вариантов генов: *VKORC1*, *CYP2C9*, *CYP4F2*; *CYP2C19*; *SLC01B1*; *F2*, *F5*; *CES1*; *NAT2*.

Оформить заказ или получить подробную информацию по наборам Евроген и НОМОТЕК:
www.evrogen.ru | order@evrogen.ru | +7 (495) 784-70-84

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

АНТИТЕЛА ДЛЯ МЕДИЦИНЫ

Получение панели ультра-потентных антител человека, нейтрализующих SARS-CoV-2

Гусельников С.В.¹, Горчаков А.А.¹, Кулемзин С.В.¹, Баранов К.О.¹, Беловежец Т.Н.¹, Мечетина Л.В.^{1,2}, Волкова О.Ю.¹, Наякшин А.М.¹, Чикаев Н.А.¹, Чикаев А.Н.¹, Солодков П.П.¹, Ларичев В.Ф.³, Гуляева М.А.^{2,4}, Мархаев А.Г.⁴, Кононова Ю.В.⁴, Алексеев А.Ю.⁴, Шестопапов А.М.⁴, Юсубалиева Г.М.⁵, Клыпа Т.В.⁵, Иванов А.В.⁶, Валуев-Эллистон В.Т.⁶, Баклашев В.П.⁵, Таранин А.В.¹

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, Москва, Россия

⁴ ФИЦ Фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия

⁵ Федеральный научно-клинический центр ФМБА России, Москва, Россия

⁶ Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгарта РАН, Москва, Россия

В отсутствие нацеленных на вирус низкомолекулярных препаратов, одобренных для лечения и профилактики COVID-19, расширение репертуара высоко-потентных антител, нейтрализующих SARS-CoV-2, представляет собой важную область исследований в ответ на продолжающуюся пандемию. Систематический анализ таких антител и их комбинаций может быть особенно полезен для выявления кандидатов, которые могут оказаться устойчивыми к вновь появляющимся вариантам вируса. В этой работе мы получили панель из 23 RBD-специфических моноклональных антител человека из В-клеток выздоравливающих пациентов. Большая часть этих антител проявила сильную нейтрализующую вирус активность как *in vitro*, так и *in vivo*. Четыре из выделенных нейтрализующих антител могут быть отнесены к категории ультра-потентных с IC₅₀ ниже 16 нг/мл. Мы показали, что отдельные нейтрализующие антитела, а также их двойные комбинации сохраняют активность против различных вариантов SARS-CoV-2 (в том числе В.1, В.1.1.7, В.1.351, В.1.617, С.37 и ВА.1). При использовании в качестве профилактического или терапевтического средства эти антитела подавляют репликацию вируса и предотвращают патологию легких у хомяков, инфицированных SARS-CoV-2. Наши данные способствуют рациональной разработке олигоклональных терапевтических коктейлей нейтрализующих антител, снижающих риск ускользания SARS-CoV-2.

Исследование было поддержано грантами РФФИ № 20-04-60527 и 18-29-08051.

**Изучение презентации потенциальных аутоантигенов
на молекулах Главного Комплекса Гистосовместимости II класса
как ключ к пониманию механизма развития патологического иммунно-
го ответа при ряде аутоиммунных патологий**

Ишина И.А.*¹, Захарова М.Ю.*¹, Нерсиян С.А.^{1,2,3}, Жиянов А.П.¹, Курбацкая И.Н.¹,
Мамедов Азад Энверович¹, Тоневецкий А.Г.^{1,2}, Габиев А.Г.¹

¹ *Институт Биоорганической Химии им М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова,
Москва, Россия*

² *Факультет Биологии и Биотехнологии, Высшая Школа Экономики,
Москва, Россия*

³ *Армянский Биоинформатический Институт, Ереван, Армения.*

**Авторы в равной степени участвовали в работе*

На сегодняшний день множество исследований сфокусированы на роли молекул главного комплекса гистосовместимости II класса (ГКГ II) в развитии аутоиммунных реакций, так как в патологических условиях они могут презентировать не только экзогенные, но и эндогенные пептиды для CD4+ Т-клеток. Описано множество примеров ассоциации носительства определенных аллелей ГКГ II с риском возникновения аутоиммунных заболеваний (АЗ). На сегодняшний день охарактеризованы варианты ГКГ II, носительство которых у конкретного индивида может с высокой вероятностью привести к развитию определенного аутоиммунного заболевания, а также выявлены некоторые “протективные” аллели ГКГ II, реже встречающиеся у аутоиммунных больных, чем у здоровых людей.

В настоящем исследовании был выбран ряд аллелей ГКГ II, описанных как положительно и отрицательно ассоциированных для ряда АЗ, данные белки были получены в рекомбинантной форме в клетках насекомых. Из созданной ранее фаговой библиотеки аутоантигенных фрагментов, состоящей из перекрывающихся 40-членных пептидов, принадлежащих более чем 300 аутоантигенам, описанным в литературе, были отобраны пептиды, презентуемые на 4 аллелях ГКГ II: DRB1*0101, *0401, *0801, *1501. Эффективность презентации данных эпитопов на указанных аллелях ГКГ II была подтверждена с помощью аналогично проведенного биоинформатического отбора аутоантигенов (NetMHCIIpan), а также с помощью анализа связывания рекомбинантных вариантов ГКГ II и отобранных аутоантигенных фрагментов методом ИФА. В результате такого комплексного подхода были выявлены новые аутоантигены – потенциальные триггеры ряда аутоиммунных заболеваний, включая системную красную волчанку, ревматоидный артрит и рассеянный склероз. Описанный комплексный подход с всесторонним исследованием механизмов презентации аутоантигенов на молекулах ГКГ II может быть применим в дальнейшем исследовании возникновения последующего патологического аутоиммунного ответа для полного понимания механизмов индукции АЗ и разработок новейших терапевтических методов. В частности, одним из возможных вариантов персонализированной терапии могут являться терапевтические антитела, блокирующие аутореактивные Т-клеточные клоны, которые могут быть найдены при помощи комплексов аутоантигенный пептид-ГКГ II, взаимодействующих с Т-клеточными рецепторами таких клонов.

Выявление ВКЭ биолюминесцентным гетеро- и гомофазным иммуноанализом

Кудрявцев А.Н.¹, Башмакова Е.Е.¹, Франк Л.А.¹

¹ Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук, обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) является возбудителем одной из самых тяжелых человеческих нейрозаболеваний. Этот вирус передается иксодиевыми клещами и широко распространен на евразийском континенте. ВКЭ передается из слюны инфицированных клещей в течение нескольких минут после укуса клеща, но в среднем только 5-10% клещей являются передающими ВКЭ-агентами.

Ранее нами была разработана и испытана тест-система для выявления ВКЭ в клещах твердофазным биолюминесцентным иммуноанализом в высокопроизводительном микропланшетном варианте. В качестве сенсора использовали гибридный белок 14D5a-Rm7, состоящий из одноцепочечного мини-антитела к капсидному белку E ВКЭ и модифицированной люциферазы *Renilla muelleri*. Испытания предложенной аналитической системы проводили в течение нескольких сезонов, были проанализированы более чем 1300 природных клещей (из них только 26 были заражены ВКЭ) из разных районов Сибири. В качестве контроля образцы исследовали сертифицированными методами на основе ОТ-ПЦР либо колориметрического иммуноанализа (Вектор-Бест, Россия). В качестве контролей К- и К⁺ использовали образцы из набора Vector-Best D1154. Наличие вируса определяли по значению дискриминационного фактора Д, равного отношению биолюминесцентного сигнала от образца к сигналу контрольного негативного образца (К-). При значении $D \geq 2$ образец считали положительным по ВКЭ (ПС). Чувствительность и специфичность анализа составили 92.3% и 98.9% (считая за 100% показатели колориметрического анализа). Биолюминесцентный твердофазный иммуноанализ анализ не уступает по чувствительности колориметрическому, а также на основе ОТ-ПЦР, при этом быстрее первого, поскольку биолюминесцентный сигнал измеряют сразу после добавления субстрата, и существенно проще второго, поскольку не требует высокой квалификации персонала, ферментов и соблюдения особых условий проведения анализа.

Предложен дизайн тест-системы для выявления ВКЭ в растворе на основе эффекта комплементации фрагментов искусственной целентеразин-зависимой люциферазы NanoLuc. Получен комплект гибридных белков, включающих миниантитело к ВКЭ и фрагменты люциферазы, и выявлена пара, способная восстанавливать биолюминесцентную активность при сборке на молекуле-мишени. Проведен ряд модельных экспериментов, где в качестве антигена использовали домен D3 белка E ВКЭ, иммобилизованный на поверхности планшета (твердофазный вариант иммуноанализа), либо комплекс биотинилированных производных D3 со стрептавидином, а также наночастицы, активированные белком E (однофазный иммуноанализ). Эффект комплементации фрагментов люциферазы обнаружен только в твердофазном иммуноанализе.

Аутоиммунная нейродегенерация вызывает задержку в созревании транзитных В-клеток

Домакин Я.А.¹, Кабилов М.Р.², Овчинникова Л.А.¹, Захарова М.Н.³, Симанив Т.³,
Звягин И.¹, Тупикин А.Е.², Белогуров А.А.¹, Габиров А.Г.¹

¹ *Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

² *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8*

³ *Научный центр неврологии, отделение нейрореабилитации,
125367, Москва, Волоколамское шоссе, 80*

Регуляторные функции В-лимфоцитов играют важную роль в развитии и подавлении иммунного ответа. Нарушение их противовоспалительной активности может привести к ряду иммунологических патологий, в частности к аутоиммунным заболеваниям. К сожалению, на сегодняшний день точный механизм функционирования и развития регуляторных В-клеток (Breg) неизвестен. Почти ничего не известно о их специфичности и структуре их В-клеточного рецептора. В данной работе с использованием широко-масштабного секвенирования мы проанализировали репертуар В-клеточных рецепторов субпопуляции транзитных Breg CD19(+)/CD24(high)/CD38(high) у пациентов с рассеянным склерозом (РС). Мы впервые показали, что при развитии РС тяжелая цепь иммуноглобулинов транзитных Breg пациентов с высокоактивным РС (ВАРС) содержит меньшее количество гипермутаций по сравнению со здоровыми донорами. Содержание транзитных Breg в периферической крови повышено, тогда как частота дифференцированных CD27+ клеток среди них снижена у пациентов с РС по сравнению со здоровыми донорами. Причем у пациентов с ВАРС эта разница сильнее, чем у пациентов с доброкачественным течением РС (ДРС). Таким образом, возможно предположить, что изменение репертуара Breg происходит уже на раннем этапе созревания В-клеток при развитии РС.

Исследования были проведены в рамках проекта РНФ 22-14-00219 «Разработка и создание системы направленной доставки белковых препаратов для терапии аутоиммунных и онкологических заболеваний на основе внеклеточных везикул».

*e-mail: yasha.l@bk.ru

Все ли антитела полезны при COVID-19?

Матвеев А.Д.¹, Пьянков О.В.², Емельянова Л.А.¹, Тимофеева А.М.¹,
Шаповалов А.В.², Чечушков А.В.¹, Голота О.В.¹, Хлусевич Я.А.¹, Кудров Г.А.²,
Седых С.Е.¹, Тикунова Н.В.¹

¹ Институт Химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

² ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Россия

Одним из основных препятствий при создании безопасных вакцин и терапевтических антител против вирусных патогенов является антитело-зависимое усиление инфекции (antibody-dependent enhancement, ADE). Впервые ADE-эффект был обнаружен в экспериментах *in vitro*, затем усиление инфекции зарегистрировали у пациентов с лихорадкой денге. Наличие ADE-эффекта продемонстрировано в системе вирус-клетка для ханта-, коксаки-, рео-, полиома-, герпес-, ретро-, флавивирусов и др. ADE в системе *in vitro* выявлен для коронавирусов SARS-CoV-1 и MERS. Полагают, что в организме антитело-опосредованное усиление инфекции ассоциировано с наличием слабо нейтрализующих антител, непротективных антител к определенным эпитопам вируса или суб-нейтрализующей концентрацией протективных антител. Существует несколько путей, посредством которых вирус-специфические антитела могут усилить инфекцию: Fc-рецептор- и комплемент-ассоциированные пути, супрессия комплекса транскрипционных факторов и пр. Несмотря на то, что для вируса SARS-CoV-2 ADE-эффект зарегистрирован не был, возможность его возникновения нельзя исключать при разработке препаратов терапевтических антител.

Создана и охарактеризована панель из 16 высокоаффинных моноклональных антител мыши против S-белка SARS-CoV-2. Равновесные константы диссоциации (K_D) полученных мкАТ варьировали от 0,08 до 10 нМ. Выявлено субнанолярное антитело RS2, способное нейтрализовать инфекционность вируса SARS-CoV-2 *in vitro* с IC50 400 мкг/мл. Показано, что RS2 выявляет S1-домен SARS-CoV-2, но не взаимодействует с RBD S-белка, в отличие от большинства вируснейтрализующих антител против этого вируса. При введении антитела RS2 за сутки до заражения модельных животных вирусом SARS-CoV-2 показано достоверное уменьшение вирусной нагрузки через 48, 72 и 96 часов после заражения. Однако, при терапевтическом применении этого антитела вирусная нагрузка достоверно увеличивалась через 72 и 96 часов после заражения вирусом. Это свидетельствует о том, что слабо нейтрализующее антитело RS2 способно вызвать антитело-опосредованное усиление инфекции *in vivo*. Скрининг сывороток, полученных от добровольцев, перенесших COVID-19 и/или вакцинированных против COVID-19, показал, что в ряде сывороток присутствуют антитела, конкурирующие с мкАТ RS2, причем значительно чаще такие антитела встречались в сыворотках добровольцев, перенесших COVID-19 неоднократно и/или в тяжелой форме.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 21-74-00141.

Анти-идиотипические наноантитела активируют *in vivo* В-клетки, экспрессирующие зародышевые предшественники ВИЧ-специфичного широко-нейтрализующего антитела VRC01

Таранин А.В.¹, Волкова О.Ю.¹, Наякшин А.М.¹, Горчаков А.А.¹, Гусельников С.В.¹, Кулемзин С.В.¹, Баранов К.О.¹, Чикаев Н.А.¹, Мечетина Л.В.¹, Тиллиб С.В.², Черникова Д.С.¹, Беловежец Т.Н.¹, Чикаев А.Н.¹, Солодков П.П.¹

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

² Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

Антитела, нейтрализующие широкий спектр генетических вариантов (bnAb) вируса иммунодефицита человека, встречаются у элитных контроллеров ВИЧ-инфекции, однако не нарабатываются при вакцинации вирусными белками. Проблема заключается в том, что bnAb представляют собой продукт длительного накопления множественных соматических мутаций. Зародышевые немутированные (уса) предшественники bnAb не распознают немодифицированные ВИЧ-белки, а соответствующие наивные В-клетки такими белками не активируются. Дизайн иммуногенов, способных стимулировать уса-bnAb-В-лимфоциты, является ключевым элементом программ, направленных на создание вакцин нового поколения для профилактики ВИЧ-инфекции. В настоящей работе мы впервые исследовали свойства анти-идиотипических наноантител (наноАИА) в качестве потенциальных активаторов В-клеток, экспрессирующих немутированные предшественники CD4s-специфичного bnAb VRC01. Антитела VRC01-класса представлены комбинацией VH1-2 и VK3-11/3-20 доменов, отличающихся в зрелой и уса-формах заменами более 40% остатков. Мы получили панель из 6 наноАИА верблюда и ламы, специфично распознающих идиотопы уса-VRC01, но не реагирующих со зрелой формой антитела. Все наноАИА были способны стимулировать сенсорные уса-VRC01 В-клетки, созданные на основе В-клеток линии DG-75 и VJAB. Цитометрический анализ взаимодействия наноАИА с В-клетками периферической крови человека с последующей сортировкой таких клеток и высокопроизводительным секвенированием экспрессируемых ими репертуаров генов иммуноглобулинов показали, что наноАИА V8L преимущественно выявляют В-клетки, экспрессирующие характерные для bnAb VRC01 гены VH1-2 и VK3-11/3-20. Специфичность V8L была подтверждена сортировкой индивидуальных V8L-связывающих В-клеток и оценкой свойств продуцируемых ими антител. Эксперименты *in vivo* с использованием линии мышей, гуманизированных по гену уса-VRC01, показали, что в мультимеризованной форме V8L эффективно стимулируют пролиферацию уса-VRC01 экспрессирующих В-клеток в контексте поликлонального иммунного ответа. Таким образом, наноАИА V8L могут быть использованы в качестве праймирующего компонента вакцины, индуцирующей bnAb VRC01-класса. Наши данные показывают также перспективность использования формата наноАИА для индукции bnAb против всего спектра областей уязвимости ВИЧ.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-04-60527

Функциональное профилирование клонов В-лимфоцитов человека

Астахова Е.А.^{1,2}, Бязрова М.Г.^{1,2}, Филатов А.В.^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234, Москва, Российская Федерация

Для определения В-клеток памяти в последнее время стала использоваться методика их окрашивания с помощью флуоресцентно-меченного антигена. Однако определяемые таким образом клетки являются молчащими и можно только предполагать, что все они будут активно секретировать антитела при встрече с антигеном.

Более функциональным тестом является подсчет антиген-специфических В-клеток памяти с помощью ELISpot. Для определения SARS-CoV-2-специфических В-клеток памяти впервые в мире этот метод был разработан и применен в нашей лаборатории. ELISpot позволяет подсчитать клетки, которые не просто пассивно несут на своей поверхности антиген-специфические В-клеточные рецепторы, но которые секретируют антиген-специфические антитела при их активации. К сожалению, метод ELISpot не позволяет определять активность антител в тестах вирус-нейтрализации. Кроме того, он не дает информации о репертуаре антител. Эта задача решается путем секвенирования вариабельных генов Ig из единичных антиген-специфических В-клеток памяти. Однако этот метод является очень трудоемким, и информация о функциональной активности антител получается только после проведения многоступенчатого исследования и наработки антител клетками-продуцентами.

Более привлекательным является подход, основанный на функциональной оценке сформированного В-клеточного репертуара, который определяют в условиях *in vitro* стимуляции В-клеток памяти и при получении от них антител.

Из крови пациентов, переболевших COVID-19, нами были отсортированы RBD-специфические В-клетки памяти, которые *in vitro* активировали различными комбинациями стимулирующих агентов: IL-2, IL-4, IL-21 и CD40L. Через несколько дней в лунках наблюдался рост В-лимфоцитов. Супернатанты культур В-лимфоцитов тестировали на наличие RBD-специфических IgG, IgA и IgM, а также оценивали их активность в тестах вирус-нейтрализации против вирусоподобных частиц, псевдотипированных Спайк-белком коронавируса SARS-CoV-2 дикого типа, а также мутантных вариантов Дельта, Омикрон и некоторых других. Предложенный подход позволяет оценивать долговременную В-клеточную память, а также может рассматриваться как этап при получении перспективных человеческих моноклональных антител против коронавируса.

**ИНГИБИТОРЫ ФЕРМЕНТОВ
КАК ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ**

Апробация метода определения активности ферментов эксцизионной репарации оснований ДНК на примере клеточных линий рака яичников человека

Алексеева И.В.¹, Кузнецова А.А.¹, Кладова О.А.¹, Шендер В.О.², Шнайдер П.В.²,
Федорова О.С.¹, Кузнецов Н.А.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

² *Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА,
Москва, Россия*

Репарация ДНК важный этап для поддержания целостности генома и, как следствие, для генетической стабильности и жизнеспособности клеток. Эксцизионная репарация оснований (BER) – один из путей репарации, который имеет дело с часто возникающими повреждениями, такими как дезаминирование, алкилирование или окисление азотистых оснований, а также AP-сайты. На сегодняшний день известно о существовании в человеческой популяции большого количества полиморфных вариантов (SNP) ферментов репарации, которые могут влиять на эффективность всего пути BER. Литературные данные свидетельствуют о том, что наличие аминокислотных замен, связанных с SNP, может приводить не только к ухудшению функциональной активности конкретного фермента, но и быть причиной нарушения белок-белковых взаимодействий с другими участниками BER, что может вызвать развитие различных заболеваний, в том числе и онкологических. Таким образом, определение эффективности репарации ДНК у конкретного организма является важным направлением исследований для практического внедрения. В связи с этим, разработка и оптимизация новых способов определения активности ферментов репарации в клетках человека является актуальной задачей и чрезвычайно важна для определения уровня репарационного статуса людей. Кроме того, понимание эффективности репарационного процесса позволит проводить оптимальный подбор или корректировку химиотерапии онкологических заболеваний, связанную с использованием ДНК-повреждающих агентов.

В нашей работе мы использовали ДНК-зонды, представляющие собой самокомплементарные олигодезоксирибонуклеотиды, несущие FRET-пару на концах цепи, а также содержащие в своем составе повреждение, специфичное для определенного фермента или группы ферментов, принимающих участие на начальных этапах процесса BER. Расщепление ДНК-зонда, содержащего повреждение специфическое для анализируемого фермента BER, приводило к изменению спектров интенсивности флуоресценции. ДНК-зонды были использованы для построения калибровочных кривых с использованием очищенных препаратов ферментов человека, а именно ДНК-гликозилаз: SMUG1, AAG, NEIL1, OGG1 и AP-эндонуклеазы 1. В ходе работы проведен анализ активности данных ферментов в клеточных экстрактах, полученных из клеточных линий рака яичника человека (SCOV3, 79, OVCAR3, TOV21G, TOV112D, MESOV). Анализ полученных данных позволил определить наблюдаемые константы скорости расщепления ДНК-зондов, специфическими ДНК-гликозилазами и APE1, и оценить концентрацию этих ферментов в каждом клеточном экстракте.

Работа выполнена при поддержке государственного задания 121031300041-4.

Новые ингибиторы TDP1 на основе монотерпенов как перспективные компоненты комплексной противоопухолевой терапии

Волчо К.П.¹, Хоменко Т.М.¹, Суслов Е.В.¹, Ильина И.В.², Ли-Жуланов Н.С.¹,
Захаренко А.Л.², Дырхеева Н.С.², Рейниссон Й.³, Лаврик О.И.², Салахутдинов Н.Ф.¹

¹ Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН,
Новосибирск, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

³ School of Pharmacy, Keele University, United Kingdom

Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (Tdp1) является важным ферментом системы репарации ДНК, играющим, в частности, ключевую роль в удалении повреждений ДНК, возникающих в результате действия ингибиторов топоизомеразы 1 (Тор01), таких как камптотecin и его аналоги, снижая эффективность их противоопухолевого действия. Таким образом, применение противоопухолевых препаратов, особенно нацеленных на ингибирование Тор01, совместно с ингибиторами Tdp1 может значительно повысить эффективность противоопухолевой терапии.

Нами проведены систематические исследования по направленному дизайну ингибиторов Tdp1 на основе разнообразных производных монотерпеноидов. В результате, нами обнаружен целый ряд новых ингибиторов Tdp1, впервые продемонстрирована способность найденных ингибиторов Tdp1 многократно усиливать цитотоксичность ингибиторов Тор01 в отношении опухолевых линий клеток и, что особенно важно, усиливать противоопухолевое действие топотекана, клинически используемого ингибитора Тор01, в экспериментах *in vivo*. Таким образом, найдены высокоэффективные ингибиторы фермента Tdp1, перспективные для применения в комплексной терапии онкологических заболеваний.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 19-13-00040.

ВИЧ-1 и клеточные системы репарации ДНК

Готтих М.Б.

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
научно-исследовательский институт физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского, Москва, Россия*

Для обнаружения повреждений ДНК, наносящих ущерб целостности генома, и для координации процессов репарации ДНК, в эукариотической клетке существует сложная сигнальная сеть, которая в первую очередь регулируется киназами семейства P13K: ATM, ATR и DNA-PK, а также поли(АДФ-рибоза)полимеразы. Многие вирусы вызывают повреждения ДНК в клетках-хозяевах, и эти повреждения чаще всего устраняются клеточными системами репарации. Разработка подходов, позволяющих нарушить репарацию повреждений, вызываемых вирусами, но при этом не влияющих на репарацию «обычных» повреждений клеточного генома, является крайне перспективной и актуальной задачей.

Одним из важнейших этапов репликации ретровирусов, к числу которых относится ВИЧ-1, является интеграция вирусной ДНК в геном клетки, осуществляемая вирусным ферментом интегразой. Встраивание обоих концов ДНК ВИЧ-1 в комплементарные цепи клеточной ДНК на расстоянии пяти пар нуклеотидов друг от друга приводит к возникновению в геноме одноцепочечных 5-ти нуклеотидных брешей, фланкирующих интегрированную ДНК вируса, а также неспаренных динуклеотидов на 5'-концах вирусной ДНК. Эти серьезные повреждения требуют незамедлительного восстановления, поскольку клетки с такими повреждениями клеточной ДНК могут быть элиминированы путем апоптоза, и это негативно скажется на развитии вирусной инфекции.

Мы проанализировали участие ATM, ATR и DNA-PK в постинтеграционной репарации и обнаружили, что ингибирование DNA-PK и ATM, но не ATR, значительно снижает ее эффективность. Это довольно неожиданный результат, учитывая, что обе киназы являются сенсорами двухцепочечных разрывов, которые не образуются при интеграции. Установлено, что DNA-PK привлекается к сайтам интеграции благодаря связыванию своей субъединицы Ku70 с интегразой ВИЧ-1, и нарушение этого связывания нарушает репликацию вируса. Исследование структуры сайта связывания интегразы и Ku70 позволило определить аминокислотные остатки, ответственные за взаимодействие этих белков. С помощью молекулярного докинга базы из 50000 низкомолекулярных соединений в участок связывания интегразы в составе Ku70 удалось найти ингибиторы белок-белкового взаимодействия. Наиболее эффективный ингибитор способен подавлять трансдукцию клеток репликативно-некомпетентным вектором на основе ВИЧ-1 в микромолярных концентрациях, не влияя при этом на репарацию двухцепочечных разрывов в ДНК под действием DNA-PK. Несомненно, требуется дальнейшая оптимизация структуры ингибитора, но тем не менее можно говорить о создании нового подхода к подавлению ВИЧ-1 путем блокирования постинтеграционной репарации.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 22-14-00073.

Получение и биологические свойства липофильных производных нуклеозидов

Дреничев М.С.¹, Ословский В.Е.¹, Алексеев К.С.¹, Зенченко А.А.¹, Иванов Г.А.¹,
Захаренко А.Л.², Дырхеева Н.С.², Чернышова И.А.², Корниенко Т.Е.², Лаврик О.И.²

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

Создание лекарственных препаратов на основе природных соединений является традиционным и высокопродуктивным подходом. Нуклеозиды являются уникальной группой соединений, которые входят в состав ДНК, РНК и коферментов. Более 120 миорных нуклеозидов выделено из тРНК [1].

В настоящей работе с использованием химико-ферментативных методов модификации пуриновых нуклеозидов были получены новые аналоги природных соединений N⁶-бензиладенозина (BAR) и N⁶-изопентениладенозина, в ряду полученных соединений найдены эффективные ингибиторы репродукции вирусов EV71, PV, H1N1, активные в микромолярном и субмикромолярном диапазоне концентраций.

В ходе работы на основе липофильных производных дисахаридных и моносахаридных нуклеозидов был получен ряд ингибиторов ферментов системы репарации ДНК тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 (Tdp1), поли(АДФ-рибозо)полимераз 1 и 2. Ингибиторы ферментов репарации ДНК могут повысить эффективность традиционной терапии онкологических заболеваний, направленной на повреждение ДНК опухолевых клеток. Некоторые обнаруженные нами ингибиторы Tdp1 усиливают цитотоксическое действие топотекана, широко используемого в клинике противоопухолевого препарата. Также один из ингибиторов Tdp1 проявил выраженное сенсibiliзирующее действие опухоли мышей к топотекану, а также гемопротекторные свойства. Полученные соединения представляют интерес в качестве новых прототипов лекарственных средств, направленных на проведение комбинированной терапии опухолей.

1. Drenichev M., Oslovsky V., Mikhailov S. Cytokinin nucleosides-natural compounds with a unique spectrum of biological activities. // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2016. – V. 13. – P. 2562–2576.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 21-14-00346.

Эволюция ингибиторов PARP

Дырхеева Н.С.¹, Чернышова И.А.¹, Захаренко А.Л.¹, Лаврик О.И.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

Поли(АДФ-рибоза)полимеразы (PARP) – семейство белков, участвующих в таких процессах как репарация ДНК, поддержание стабильности генома и регуляция процессов запрограммированной гибели клеток. PARP1 является самым распространенным ферментом семейства PARP, на него приходится 90% NAD⁺, используемого этим семейством [1]. PARP1 – сенсор повреждений ДНК, он играет важную роль в поддержании стабильности генома и является центральным компонентом процессов репарации ДНК. PARP1 катализирует синтез поли-АДФ-рибозы (PAR-илирование) на целевых молекулах белков в непосредственной близости от повреждения, используя NAD⁺ в качестве субстрата. PAR-илирование приводит к рекрутированию необходимых ферментов репарации на место повреждения и его дальнейшему исправлению [1]. На сегодня наиболее распространенными методами лечения онкологических заболеваний являются химио- и радиотерапия, которые основаны на повреждении ДНК раковых клеток. Ингибируя репарацию ДНК, где PARP1 – активный участник, можно повысить эффективность этих методов лечения.

Начиная с разработки первого поколения ингибиторов PARP1 в начале 1970-х годов, создание новых эффективных ингибиторов PARP остается актуальной задачей медицинской химии. Никотинамид, продукт реакции PAR-илирования, и его 5-метильное производное были изучены как первые ингибиторы PARP [2]. Было найдено, что структурно подобное соединение - 3-аминобензамид также ингибирует PARP1 [3]. В 1980–2000-х годах для повышения эффективности ингибиторов PARP первого поколения были найдены еще более эффективные ингибиторы PARP1 [2]. Олапариб был первым препаратом – ингибитором PARP, одобренным в 2014 году для лечения онкологических заболеваний. К концу 2010-х годов показания к применению олапариба были существенно расширены. На сегодняшний день одобрены для применения в клинике четыре препарата – ингибитора PARP [2]. В настоящее время на сайте Clinicaltrials.gov зарегистрировано 286 клинических испытаний, посвященных терапии с помощью PARP. Нашей группой совместно с широким кругом исследователей ведется изучение низкомолекулярных соединений из различных химических классов как потенциальных ингибиторов PARP1, нами обнаружен ряд ингибиторов PARP1 среди производных природных биологически активных соединений [4-5]. Мы активно изучаем возможность применения ингибиторов PARP как сенсibilизаторов в традиционных методах лечения применяемыми в клинике терапевтическими агентами.

1. Alemasova EE, Lavrik OI. *Nucleic Acids Res.* 2019. 47, 3811.
2. Rose M. et al. *Front Cell Dev Biol.* 2020. 879.
3. Purnell MR, Whish WJD. *Biochem J.* 1980. 185, 775–777.
4. Nilov et al, *Biochemistry (Mosc).* 2018. 83, 152.
5. Sherstyuk YV et al, *Int J Mol Sci.* 2020. 21.

Исследование поддержано грантом РФФ № 21-14-00105.

Ингибиторы ДНК-гликозилаз как потенциальные терапевтические препараты

Жарков Д.О.^{1,2}

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Путь эксцизионной репарации оснований ДНК (ЭРО) представляет собой основной биохимический процесс, защищающий геномы всех живых организмов от эндогенных и экзогенных повреждений. ЭРО инициируется ДНК-гликозилазами — ферментами, которые узнают и удаляют из ДНК поврежденные основания. Эти ферменты обладают специфичностью у поврежденным основаниям, и у всех живых организмов насчитывается по несколько ДНК-гликозилаз с разной субстратной специфичностью; так, у человека их известно 11, а у *E. coli* — 9. Недавно было показано, что ингибирование ЭРО можно эффективно использовать для терапии опухолей, утративших альтернативные пути репарации, например, в случае утери продукции белков BRCA, что придает клеткам чувствительность к ингибиторам поли(АДФ-рибозо)полимераз. Однако препараты, воздействующие на ДНК-гликозилазы, все еще находятся в разработке и не завершили клинические испытания. Будут рассмотрены попытки использования ДНК-гликозилаз как мишеней для лекарств при терапии онкологических, нейродегенеративных и аутоиммунных заболеваний, бактериальных и вирусных инфекций. Помимо традиционных методов ингибирования ферментативных реакций, многообещающим подходом для подавления ЭРО является также применение низкомолекулярных соединений, которые разрушают белок-белковые взаимодействия в комплексах репарации или химически модифицируют поврежденные звенья ДНК. Наконец, будут описаны новые способы анализа продуктов реакций, катализируемых ДНК-гликозилазами, которые можно использовать при высокопроизводительном скрининге фармакологических библиотек.

Исследование поддержано грантами РФФ № 19-74-20069, РФФИ № 20-04-00554-а.

Ингибиторы тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 на основе усниновой кислоты и нуклеозидов как противоопухолевые агенты

Захаренко А.Л.¹, Дырхеева Н.С.¹, Чернышова И.А.¹, Корниенко Т.Е.¹,
Филимонов А.С.², Лузина О.А.², Ословский В.Е.³, Дреничев М.С.³,
Попова Н.А.⁴, Николин В.П.⁴, Салахутдинов Н.Ф.², Лаврик О.И.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины,
Новосибирск, Россия

² Новосибирский институт органической химии, им. Н.Н.Ворожцова,
Новосибирск, Россия

³ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Москва, Россия

⁴ Институт цитологии и генетики, Новосибирск, Россия

Исследование посвящено изучению способности низкомолекулярных соединений – ингибиторов фермента репарации ДНК тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 (Tdp1) – сенсibilизировать злокачественные опухоли к действию известных противораковых препаратов. Традиционная противораковая химиотерапия имеет целью повреждение ДНК опухолевых клеток, и эффективность лечения зависит в том числе от эффективности систем репарации ДНК. В настоящее время использование ингибиторов репарации ДНК активно изучается как перспективная вспомогательная терапия онкологических заболеваний.

Tdp1 является одной из перспективных мишеней такой терапии. Этот фермент играет ключевую роль в удалении повреждений ДНК, вызванных противораковыми лекарствами, в частности топотеканом [1], поэтому совместное использование ингибиторов Tdp1 и противораковых препаратов может значительно увеличить эффективность последних [2].

Мы обнаружили эффективные ингибиторы Tdp1 среди производных природного соединения усниновой кислоты, а также среди липофильных нуклеозидов. Многие из этих соединений не токсичны в отношении перевиваемых клеточных линий, что важно с точки зрения дополнительных побочных эффектов терапии. Некоторые из изученных производных усниновой кислоты и нуклеозидов усиливали цитотоксический эффект топотекана на различных типах перевиваемых клеток и на мышинных моделях онкологических заболеваний.

1. Comeaux E.Q., Waardenburg R.C. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I resolves both naturally and chemically induced DNA adducts and its potential as a therapeutic target // *Drug Metab. Rev.* – 2014. – V. 46. – P 494–507.
2. Zakharenko A., Dyrkheeva N., Lavrik O. Dual DNA topoisomerase 1 and tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibition for improved anticancer activity // *Med. Res. Rev.* – 2019. – V. 39. – P. 1427–1441.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 21-14-00105

Разработка флуоресцентной клеточной тест-системы для определения селективности ингибиторов гистондеацетилаз

Земская А.С.¹, Щербакова А.С.¹, Козлов М.В.¹

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Гистондеацетилазы (HDACs) – это большое семейство цинк-зависимых деацетилаз, в котором по субстратным и функциональным особенностям выделяют три важнейших класса: I, IIА и IIВ. Белки этих классов являются мишенями для терапии раковых и вирусных заболеваний, а также метаболических нарушений, таких как стеатоз и диабет. Селективность ингибиторов HDACs определяет механизмы их действия, и, следовательно, актуальной задачей является первоначальное определение селективности ингибиторов с точностью до класса. Существующие на данный момент методы либо не отражают реальный клеточный ответ на тестируемые соединения (*in vitro*, на рекомбинантных ферментах), либо являются дорогостоящими и трудоёмкими (*in cell*, вестерн-блот анализ).

В большинстве описанных методик определение селективности ингибиторов HDACs проводят в клеточных лизатах с добавлением лизин-содержащих флуоресцентных субстратов [1]. Самыми популярными субстратами являются ацетильное и трифторацетильное Вос-защищенные производные лизина, конъюгированные с флуоресцентным аминокумарином (АМС): Вос-Lys(Ас)-АМС и Вос-Lys(Тфа)-АМС – субстраты HDAC класс I/IIВ и HDAC класс IIА, соответственно. Кроме того, опубликован субстрат Вос-Lys(Сго)-АМС, ω-амид кротоновой кислоты, который проявляет повышенное сродство к HDACs класса I. Параллельное использование этих трех субстратов для анализа одного соединения позволяет определить селективность ингибиторов HDACs с точностью до класса. Мы подобрали условия проведения анализа с клетками гепатомы человека линии Huh7, таким образом, чтобы продукты деацетилирования каждого из исходных субстратов надежно детектировались в кондиционированной клеточной среде.

Таким образом, создана тест-система для первичной оценки селективности ингибиторов функционально важных HDACs с точностью до класса, которая более приближена к реальной ситуации в клетке, чем тестирование на ферментах, а также является менее затратной, чем вестерн-блот. Возможности системы были продемонстрированы на примерах известных ингибиторов HDACs – противораковых препаратах (вориностат, белинонат и др.). Кроме того, тест-система потенциально пригодна для скрининга низкомолекулярных модуляторов экспрессии HDACs по определению выхода деацетилирования субстратов, что позволяет избежать на этом этапе более трудоёмкий ПЦР анализ.

1. Potluri, V., Shandil, R.K., Gavara, R., Sambasivam, G., Campo, B., др. всего 7 человек. *Discovery of FNDR-20123, a histone deacetylase inhibitor for the treatment of Plasmodium falciparum malaria.* // *Malar J.* – 2020. – V. 19. – P. 365.

Исследование поддержано грантами РФФИ № 20-04-00504, РФФ № 20-74-10121.

Влияние ремодуляторов хроматина на функционирование PARP

Кирсанов К.И.^{1,2}, Фетисов Т.И.¹, Якубовская М.Г.¹

¹ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Белки семейства PARP играют важную роль в ряде процессов, в том числе и в регуляции репарации ДНК. Модулирование активности репарации является одним из перспективных подходов к сенсублизации опухолевых клеток к проводимой генотоксической химиотерапии. Ингибиторы PARP-1 способны подавлять рост определенных типов опухолей в монорежиме, а также усиливать эффекты генотоксических химиопрепаратов. Таким образом, поиск и изучение новых ингибиторов PARP-1 является актуальной задачей современной онкологии.

Кураксин CBL0137 является ДНК-тропным производным карбазола. Этот агент не образует ковалентных связей с макромолекулой, однако способен влиять на коровые и линкерные белки нуклеосомы, а также ряд белков метаболизма ДНК. Для Кураксина ранее была показана противоопухолевая активность моделях *in vitro* и *in vivo* и в настоящее время CBL0137 рассматривается в качестве перспективного терапевтического агента.

В ходе работы нами были изучены различные эффекты нового противоопухолевого препарата Кураксина CBL0137. На модели индуцированного диметилгидразином канцерогенеза мы продемонстрировали антиканцерогенную активность CBL0137, на моделях аденокарциномы толстой кишки, саркомы матки, лимфолейкозов – противоопухолевую активность препарата. С помощью метода кругового дихроизма жидкокристаллических дисперсий ДНК было показано, что карбазольное ядро молекулы интеркалирует в дуплекс биополимера, в то время как N-боковая цепь располагается в малой бороздке ДНК. Это было подтверждено методами компьютерного моделирования. Было установлено, что Кураксин обладает эпигенетической активностью и способен изменять уровень гистоновых модификаций в клетке. При изучении влияния Кураксина на активность PARP1 было показано, что CBL0137 способен ингибировать ДНК-зависимую активацию PARP1 в реконструированных системах, в клеточных культурах ТНР-1 и К562 CBL0137 вызывал снижение как базального уровня поли-АДФ-рибозилирования, так и индуцированного цисплатином. С помощью иммуноцитохимии было выявлено, что при последовательной обработке клеток CBL0137 и перекисью водорода (активация PARP1) полного ингибирования поли-АДФ-рибозилирования не происходит, однако это приводит к перераспределению PAR в клетке и его кластеризации. Также способность Кураксина ингибировать PARP-1 была продемонстрирована *in vivo* на *Drosophila melanogaster*.

Таким образом, Кураксин, ремодулятор хроматина с противоопухолевой активностью, способен ингибировать ДНК-зависимую активацию PARP-1 *in vitro* и *in vivo*.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-75-10163).

Влияние клеточного белка SFPQ на ранние стадии репликативного цикла ВИЧ

Кихай Т.Ф.¹, Агапкина Ю.Ю.^{1,2}, Шадрина О.А.², Приказчикова Т.А.¹, Готтих М.Б.^{1,2}

¹ Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, Москва, Россия

Вирус иммунодефицита человека остается крайне опасным неизлечимым заболеванием. Однако существующая высокоактивная антиретровирусная терапия, направленная на ингибирование вирусных белков, помогает поддерживать жизнь инфицированных на достойном уровне. Известно, что вирус активно использует клеточные белки для своей репликации. Новым и перспективным направлением создания ингибиторов является подавление взаимодействия вирусных белков с белками клетки хозяина. Поэтому изучение механизма участия клеточных белков-партнеров ВИЧ в репликации вируса является крайне актуальной задачей для последующего создания новых ингибиторов.

Одним из таких белков-партнеров является SFPQ (Splicing factor, proline- and glutamine-rich). Он участвует в альтернативном сплайсинге, в транскрипции и транспорте мРНК. Известно, что SFPQ влияет на стадию обратной транскрипции. Также SFPQ обнаружен в преинтеграционном комплексе, включающем в себя обратную транскриптазу (ОТ) и интегразу (ИН). Известно, что рекомбинантные SFPQ и ИН ВИЧ-1 могут взаимодействовать друг с другом. Однако механизм влияния на интеграцию и обратную транскрипцию ВИЧ не изучен. В связи с этим целью данной работы было установление роли SFPQ в ранних стадиях репликации ВИЧ.

Для определения стадии жизненного цикла ВИЧ, на которую влияет SFPQ, мы изучили влияние белка на репликацию с помощью VSV-G-псевдотипированного репликативно-некомпетентного вектора. Оказалось, что SFPQ является положительным фактором обратной транскрипции и интеграции.

Следующим шагом было установление сайта связывания SFPQ с вирусными белками. Для этого было изучено взаимодействие рекомбинантных белков SFPQ и ИН или ОТ. Оказалось, что SFPQ способен взаимодействовать с ИН, но не с ОТ. Кроме того, с помощью пептидного фишинга был установлен участок взаимодействия ИН с SFPQ. Со стороны ИН – это участок 170-200 а.о., а со стороны SFPQ – 212-236 а.о. С помощью сайт-направленного мутагенеза и метода со-осаждения был установлен сайт связывания в ИН с SFPQ – R187. Однако вирус с мутацией R187A репликативно некомпетентен и его дальнейшее исследование невозможно. В процессе установления сайта взаимодействия со стороны SFPQ были валидированы данные пептидного фишинга – мутант Δ1-295 SFPQ не способен связывать ИН. Также мы суперэкспрессировали данный мутант SFPQ в НЕК 293Т и проверили активность псевдовируса. Оказалось, что Δ1-295 SFPQ не влияет на репликацию, что указывает на то, что влияние осуществляется за счет взаимодействия SFPQ с ИН. Таким образом, мы установили точный сайт связывания в ИН и регион в SFPQ, которые ответственны за взаимодействие друг с другом.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 20-04-00437.

Низкомолекулярные ингибиторы репликации SARS-CoV-2

Кочетков С.Н.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Коронавирусная инфекция, вызванная вирусом SARS-CoV-2 унесла жизни более 6 млн человек по всему миру. Хотя массовая вакцинация является магистральным путем борьбы с COVID-19, не менее важным является создание специфичных и эффективных противовирусных агентов, действие которых направлено на блокирование жизненного цикла вируса. В настоящее время такие соединения все еще не созданы, и их разработка является чрезвычайно актуальной задачей.

В докладе будут рассмотрены основные подходы к созданию высокоэффективных ингибиторов репликации SARS-CoV-2, состояние дел в мире по разработкам новых и репозиционированию известных противовирусных препаратов. Особое внимание будет уделено исследованиям, проводимым в данной области в России, в частности в лаборатории автора и достигнутых результатов.

Автор выражает благодарность за поддержку РФФИ (грант № № 20-04-60414) и Минобрнауки РФ в рамках Госзадания 1 «Аналоги компонентов нуклеиновых кислот как потенциальные ингибиторы коронавирусов»

Разработка ингибиторов протеазы M^{Pro} коронавируса SARS-CoV-2

Кузнецова А.А.¹, Булыгин А.А.¹, Королева Л.С.¹, Захарова М.Ю.², Калиберда Е.Н.², Курбатская И.Н.², Смирнов И.В.², Кнорре В.Д.², Задворных Д.А.¹, Федорова О.С.¹, Сильников В.Н.¹, Габибов А.Г.², Кузнецов Н.А.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины,
Новосибирск, Россия

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

Разработка эффективных направленных препаратов для лечения COVID-19 остается сложной задачей для молекулярной биологии. Противовирусные препараты прямого действия и специфичные для SARS-CoV-2 противовирусные препараты на сегодняшний день крайне ограничены. Так, предложен ряд низкомолекулярных соединений, которые могут ингибировать репликацию SARS-CoV-2. Однако, в настоящее время одобрен только один аналог противовирусного нуклеозида прямого действия, а именно ремдесивир, который ингибирует РНК-зависимую РНК-полимеразу SARS-CoV-2. Разработка эффективных стратегий и подходов к поиску лекарств, включая скрининг низкомолекулярных противовирусных препаратов, требует глубоких знаний о молекулярных механизмах коронавирусной инфекции. Основная протеаза SARS-CoV-2 (M^{Pro}), ответственная за процессинг полипротеинов SARS-CoV-2 и производство отдельных вирусных белков, является привлекательной мишенью для блокирования вирусной инфекции. В настоящей работе предложен предстационарный кинетический анализ взаимодействия M^{Pro} с низкомолекулярными ингибиторами. Был исследован кинетический механизм связывания и расщепления пептидного субстрата ферментом M^{Pro} дикого типа и его каталитически неактивной мутантной формой, содержащей замену С145А. Показано, что M^{Pro} вызывает конформационные изменения пептида в процессе образования фермент-субстратного комплекса. Проведен анализ ингибирования M^{Pro} такими ингибиторами протеазы, как боцепревир, телапревир, GC-376, PF-00835231, тимеросал. Показано, что взаимодействие фермента дикого типа с PF-00835231, одним из наиболее эффективных ингибиторов, обнаруженным на сегодняшний день, протекает по двухстадийному механизму, включающему стадии связывания и последующего ковалентного присоединения остатка ингибитора к молекуле фермента. При этом взаимодействие мутантной формы M^{Pro} С145А с PF-00835231 примерно в 100 раз менее эффективно за счет отсутствия ковалентной стабилизации комплекса фермент-ингибитор. Полученные данные свидетельствуют о том, что даже нековалентное связывание ингибитора может быть достаточным для эффективного ингибирования фермента вследствие нарушения конформации активного центра. На следующем этапе работы на основе структуры активного центра фермента проведен молекулярный дизайн низкомолекулярных соединений – потенциальных ингибиторов M^{Pro}. Последующий химический синтез и оценка эффективности данных соединений позволили обнаружить перспективные нековалентные ингибиторы M^{Pro} SARS-CoV-2.

Работа выполнена при поддержке государственного задания #121112900214-2.

Создание нового поколения ингибиторов каспазы-8 как перспективная стратегия развития эффективных терапевтических подходов

Лаврик И.Н.¹, Иванисенко Н.В.¹, Иванисенко В.А.¹

¹ *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

Развитие онкологических заболеваний напрямую связано с дерегуляцией целого ряда ключевых сигнальных путей в клетке, отвечающих за ее нормальное функционирование. При этом, важнейшее значение имеет нарушение процесса апоптоза, которое приводит к ингибированию клеточной гибели раковых клеток, что, в свою очередь, ведет к бессмертию раковых клеток и появлению устойчивости к терапии. Известно, что внешний сигнальный путь апоптоза может быть индуцирован рецепторами смерти с участием лигандов смерти ФНО, CD95L/FasL и TRAIL. Стимуляция рецепторов смерти лигандами смерти приводит к образованию комплекса, индуцирующего смерть (DISC, Death-Inducing Signaling Complex), в котором происходит активация ферментов прокаспазы-8 и -10, что, в свою очередь, ведет к инициации активации каскада каспаз с последующим разрушением клетки. Активация каспазы-8 в комплексе DISC контролируется белками семейства с-FLIP, которые являются ключевыми ингибиторами данного фермента. В этой связи огромный потенциал для создания эффективных терапевтических подходов представляют таргетные терапии, направленные на белки каспазу-8 и с-FLIP, поскольку именно эти два белка контролируют запуск внешнего пути апоптоза в раковых клетках. В ходе данной работы были разработаны низкомолекулярные сайт-специфичные химические соединения, направленные на определенные участки белков с-FLIP и каспазы-8. Была проведена проверка их активности и эффективности воздействия на активацию каспазы-8 в ряде раковых клеточных линий. Также, было показано, что данные соединения усиливают активацию эффекторных каспаз и индукцию апоптоза. Кроме того, была построена математическая модель, которая описывает эффекты действия данных соединений в зависимости от концентрации белков с-FLIP и каспазы-8 в клетке и позволяет сделать предсказания об эффективности действия соединений. Данные работы, безусловно, представляют большую практическую ценность для разработки лекарственных препаратов нового поколения, направленных на лечение целого ряда онкологических заболеваний.

Работа была поддержана: РФФИ №19-54-45015.

Фенольные природные соединения как основа для создания ингибиторов ферментов репарации

Лузина О.А.¹, Филимонов А.С.^{1,2}, Гладкова Е.Д.¹, Салахутдинов Н.Ф.¹,
Захаренко А.Л.², Дырхеева Н.С.², Лаврик О.И.²

¹ Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН,
Новосибирск, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

Поиск ингибиторов ферментов системы репарации ДНК относится к перспективным направлениям современной фармакологии и является одним из путей увеличения эффективности терапии онкологических заболеваний, особенно для борьбы с лекарственно-устойчивыми опухолями. Использование природных соединений и их производных для разработки эффективных ингибиторов ферментов репарации ДНК представляется перспективным, поскольку природные фармакофоры имеют высокий профиль безопасности, выработанное в процессе эволюции структурное сродство ко многим биологическим рецепторам и собственный широкий спектр биологического действия.

Нами впервые были разработаны высокоэффективные ингибиторы Tdp1 путём химической модификации природных соединений ряда полифенолов растительного и лишайникового происхождения: изохинолинового алкалоида берберина и дибензофуранового соединения усниновой кислоты. В экспериментах *in vitro* показано, что производные берберина и усниновой кислоты – ингибиторы Tdp1, сенсibiliзируют опухолевые клетки к действию топотекана. Для производного усниновой кислоты впервые в мировой практике была продемонстрирована способность значительно усиливать противоопухолевый и анти-метастатический эффект топотекана *in vivo* в нетоксичных дозах. Путём направленной химической модификации усниновой кислоты получены новые соединения, эффективно подавляющие активность нескольких ферментов репарации ДНК одновременно: тирозил-ДНК-фосфодиэстераз 1 и 2 (Tdp1 и Tdp2) и поли(АДФ-рибоза) полимеразы 1 (PARP1).

Исследование было поддержано грантами РФФ № 21-14-00105

Принципы использования бактериофагов для контроля бактериозов растений

Мирошников К.А.¹, Лукьянова А.А.¹, Евсеев П.В.¹

¹ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, Россия

Фитопатогенные бактерии наносят значительный ущерб ключевым сельскохозяйственным культурам, вызывая заболевания вегетирующих растений и порчу семенного материала и урожая. Использование бактериофагов (вирусов бактерий) считается перспективным методом биологической защиты растений от бактериозов. Однако, в силу высокой специфичности действия бактериофагов, их применение требует точной диагностики целевого патогена и разработки оптимизированных методов приложения.

В представленном докладе рассмотрены успешные случаи применения фаговых препаратов для контроля поверхностных и сосудистых бактериозов картофеля и бобовых, вызванных *Pectobacterium*, *Pseudomonas* и *Curtobacterium* spp. Обсуждаются принципы поиска и характеристики бактериофагов, компоновки препаратов, а также их использование в различных биологических моделях. При наличии коллекций предварительно охарактеризованных фагов и информации о превалирующих видах и штаммовых группах патогенов представляется возможным создание фаговых препаратов для профилактической и терапевтической обработки растений, которая приводит к существенному снижению популяции бактерий и уменьшению частоты проявления и интенсивности симптомов заболеваний.

Проект был поддержан грантом РФФИ №21-16-00047

Регуляция разделения фаз жидкость-жидкость, инициируемого N-белком SARS-COV-2 и вирусной РНК

Светлова Ю.И.¹, Варижук А.М.¹, Ходорович Ю.М.², Книжник Е.К.³, Манувера В.А.¹, Северов В.В.¹, Ведехина Т.С.¹, Матюгина Е.В.⁴, Хандажинская А.Л.⁴, Банная Е.И.⁵

¹ *Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия*

² *Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

³ *Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия*

⁴ *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия*

⁵ *МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия*

Одним из важных этапов в цикле репликации SARS-CoV-2 является разделение фаз жидкость-жидкость (LLPS) в клетке с образованием небольших капель, содержащих белки и РНК вируса. LLPS помогает вирусу скрываться от иммунной системы и, вероятно, играет роль в сборе вирусной частицы. Известно, что LLPS происходит за счёт взаимодействия нуклеокапсидного N-белка со специфическими участками вирусной РНК. Однако механизм образования капель, а также способы влияния на него, пока остаются до конца не изученными. Также актуальной задачей является поиск ингибиторов LLPS SARS-CoV-2, поскольку на их основе могут быть получены эффективные противовирусные агенты.

В данной работе в бесклеточной системе с использованием флуоресцентно меченого рекомбинантного белка N и фрагментов вирусного генома были реконструированы, визуализированы методом флуоресцентной микроскопии и охарактеризованы при псевдофизиологических условиях конденсаты N-РНК. С помощью бесклеточной модели выполнен скрининг регуляторов LLPS. Ингибиторы и индукторы обнаружены в ряду нуклеозидных аналогов, в том числе класса флексимеров и 5'-норкаброциклических производных. Результаты работы расширяют представления о механизмах противовирусной активности нуклеозидных аналогов. Для нескольких соединений активность подтверждена на живом вирусе.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации № МД-5000.2022.3

Патоген-ассоциированные молекулярные паттерны: получение α -D-глицеро-D-глюко-гептозо-1-фосфатов для изучения их потенциала в преодолении антибиотикорезистентности бактерий

Сольев П.Н.¹, Потапов К.В.², Новиков Р.А.^{1,2,3}, Макаров А.А.¹, Митькевич В.А.¹

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

² Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

³ АНО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», Сириус, Россия

Патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (ПАМП) – это особый класс молекул в структуре микроорганизмов, который распознаётся иммунной системой как сигналы опасности. В их число входят бактериальные компоненты, такие как липополисахарид (ЛПС), пептидогликан и флагеллин. Понимание механизмов активации иммунной системы и роли ПАМП в метаболических путях важно при разработке терапевтических средств для борьбы с инфекционными заболеваниями и преодоления антибиотикорезистентности.

В составе мембранного ЛПС ключевую роль в антибиотикорезистентности играют гептозофосфаты, связывающие эндотоксический липид А и О-антиген. Метаболиты гептоз в качестве ПАМП – D-глицеро-D-манно-гептопиранозил-1-монофосфат и его аденозинилированные производные, могут активировать NF- κ B в клетках с участием α -протеинкиназы 1 (ALPK1) [1]. Помимо активности в составе ЛПС грамотрицательных бактерий, гептозы являются промежуточными продуктами биосинтеза 4'-амино-О-гликанов грамположительных бактерий и других антибиотиков. Возрос интерес к синтезу и использованию этих метаболитов и их аналогов, области применения которых варьируются от реверсии латентного периода для лечения ВИЧ до адъювантов с альтернативными механизмами действия [2].

Гептозы – это семиуглеродные сахара, синтезируемые исключительно бактериями, и получение их в граммовых количествах для биологических испытаний осложнено как из-за малого содержания в природе, так и из-за сложности синтеза и недоступности для коммерческого приобретения. Экстракция из бактериальной мембраны позволяет получать лишь миллиграммовые количества гептоз [3]. Большинство работ в области химического синтеза посвящено изучению манно-гептозофосфатов, как основных компонентов ЛПС большинства грамотрицательных бактерий [4].

Нами были проанализированы известные стратегии синтеза малоизученных глюкогептозофосфатов, оптимизирован недорогой способ получения и проведена наработка 1-метил- α -D-глицеро-D-глюко-гептозо-7-фосфата из доступной D-глюкозы в граммовых количествах для изучения регуляции антибиотикорезистентности бактерий. Также получен фторированный аналог этого соединения.

1. Adekoya I.A., Guo C.X., Gray-Owen S.D., Cox A.D., Sauvageau J. // *J. Immunol.* – 2018. – V. 201. – P. 2385.

2. Awate S., Babiuk L.A., Mutwiri G. // *Front. Immunol.* – 2013. – V. 4 – P. 114.

3. Milicaj J., Castro C.D., Jaunbocus N., Taylor E.A. // *Appl. sci.* – 2021. – V. 11. – P. 8314.

4. Williams D., Jamshidi M.P., Sauvageau J. // *Synthesis* – 2022. – V. 54 – P. 79.

Поддержано Минобрнауки РФ № 075-10-2021-113, RF----193021X0001.

Ингибиторы основной протеазы SARS-CoV-2 природные вещества или рациональный дизайн?

Щербakov Д.Н.^{1,2}, Бельняк С.В.¹, Яровая О.И.³, Волосникова Е.А.¹,
Шарлаева О.А.², Чиркова В.Ю.², Салахутдинов Н.Ф.³, Вацадзе С.З.⁴

¹ ФБУН ГЦН ВБ «Вектор», Кольцово, Россия

² Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

³ Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН,
Новосибирск, Россия

⁴ Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

Пандемия COVID-19 стала вызовом для мирового здравоохранения. Несмотря на колоссальные усилия, уровень заболеваемости SARS-CoV-2 продолжает оставаться на высоком уровне. SARS-CoV-2 - это оболочечный одноцепочный (+)РНК-вирус. При попадании в клетку-хозяина вирусный геном транслируется с образованием двух перекрывающихся полипротеинов-pp1a и pp1ab. Ключевая роль в процессинге вирусных полипротеинов принадлежит основной протеазе 3CL. Ингибирование активности этого фермента позволяет заблокировать репликацию вируса в целом. Несмотря на значительные усилия, описано ограниченное число эффективных и безопасных низкомолекулярных ингибиторов 3CL.

В нашей работе с использованием разработанной рекомбинантной основной протеазы SARS-CoV-2 был проведен масштабный скрининг ингибирующей активности веществ и экстрактов. Ингибирующую активность оценивали по величине IC₅₀, за которую принимали концентрацию тестируемого вещества (или экстракта), снижающую уровень флуоресценции на 50% от наблюдаемого без добавления ингибитора, при деструкции пептидного субстрата рекомбинантной протеазой как описано ранее [1]. В качестве эталонных были использованы известные ингибиторы 3CL протеазы дисульфирам, GC376 и ML188. Было исследовано 375 синтетически полученных соединения и 64 экстракта. В первой группе активность показали 15,9% соединений, во второй – 32,8%.

Согласно, полученным данным, наибольшую ингибирующую активность проявил водный экстракт *Caragana jubata* (IC₅₀ = 0,003 мг/мл). Его активность сопоставима с активностью известного ингибитора коронавирусной протеазы дисульфирамом (IC₅₀ = 0,002 мг/мл). Так же активность выявлена у липофильных экстрактов *Rhododendron adamsii* (IC₅₀ = 0,013 мг/мл). Наиболее высокая ингибирующая активность среди синтетических веществ обнаружена у производных усниновой кислоты (IC₅₀ = 0,012-0,013 мг/мл) и у несимметричного амида биспидина (IC₅₀ = 0,046 мг/мл).

1. Shcherbakov D., Baev D., Kalinin M., Dalinger A., Chirkova V., *др. всего 17 человек*.
Design and Evaluation of Bispidine-Based SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors // ACS Med. Chem. Lett. - 2022, V. 13, - P 140–147.

Исследование было поддержано грантами РФФИ № 20-54-44016, РФФИ № 20-04-60215.

Влияние растительных полифенолов на процессы репарации ДНК

Власова О.А.¹, Фетисов Т.И., Магомедова Х.М.², Штомпель П.А.¹, Чернова И.А.¹,
Борунова А.А.¹, Заботина Т.Н.¹, Белицкий Г.А.¹, Кирсанов К.И.^{1,3}, Якубовская М.Г.¹

¹ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина», Москва, Россия

² ФГБУ «ИТХТ им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Козеволюция флоры и фауны складывалась таким образом, что пищевой рацион животного мира во все исторические периоды определялся как калорийностью потребляемых растений, так и другими их свойствами, способствовавшими сохранению вида. Анализ состава растительных экстрактов выявил более 300 полифенолов, обладающих терапевтической активностью, включая противоопухолевые и антиканцерогенные эффекты. Предметом наших исследований стали эффекты ДНК-тропных растительных полифенолов, обладающих антиканцерогенной активностью, выявленной на моделях химически индуцированного канцерогенеза.

Эти соединения, взаимодействуя с ДНК, могут влиять на стабильность, жесткость/гибкость, кривизну, особенности конформации и другие характеристики дуплекса, определяя особенности функционирования генома при их воздействии. В предыдущих исследованиях была выявлена эпигенетическая активность ряда растительных полифенолов и их способность вытеснять линкерные гистоны из хроматиновой фракции. Связанная с этим дестабилизация хроматина может приводить к повышению уровня двунитевых разрывов ДНК в результате активации экспрессии ретротранспозонов. В связи с этим мы провели анализ их способности активировать экспрессию ретротранспозонов, индуцировать двунитевые разрывы и модулировать эффект генотоксических лекарственных препаратов.

Активация ретротранспозонов была выявлена с помощью ПЦР в реальном времени по экспрессии трех ампликонов Line1 и ORF1 Line1 для дельфинидина, генистеина, берберина, ресвератрола, куркумина и нарингенина, а затем для всех этих растительных полифенолов за исключением куркумина и нарингенина эффект был подтвержден методом проточной цитометрии с использованием антител к ORF1 Line1. В качестве маркера уровня генетических повреждений по типу двунитевых разрывов ДНК была использована фосфорилированная форма гистона H2AX (γ H2AX). Данные проточной цитометрии с использованием антител к γ H2AX свидетельствовали о повышении уровня двунитевых разрывов ДНК при обработке клеток дельфинидином, генистеином, берберином, ресвератролом, физетином и сангвинарином. При анализе эффектов генистеина, ресвератрола с помощью флуоресцентной микроскопии наблюдалось повышение относительного количества фокусов γ H2AX. При обработке клеток последовательно генотоксичным противоопухолевым препаратом ифосфамидом, а затем, после его удаления, генистеином количество фокусов γ H2AX статистически значимо увеличивалось по отношению к наблюдаемому в клетках, обработанных лишь генотоксическим агентом. В то же время, если после удаления генотоксического препарата проводили обработку клеток кверцетином и кемпферолом, которые не вызывали активацию ретротранспозона Line1, то наблюдали снижение количества фокусов γ H2AX по сравнению с клетками, обработанными лишь ифосфамидом.

Таким образом, ряд растительных полифенолов обладает способностью активировать экспрессию ретротранспозонов, что оказывает модулирующее воздействие на эффект генотоксических препаратов.

Работа поддержана грантом РФФ 17-15-01526

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ

Применение мезенхимальных стволовых клеток обонятельного эпителия в клеточной терапии заболеваний, ассоциированных с избыточным иммунным ответом

Гончаров А.Е.¹, Антоневиц Н.Г.¹, Рында Е.Г.¹, Чекан В.Л.^{2,3}, Шулепова Э.А.^{2,3},
Чиж К.А.^{4,5}, Рябцева Т.В.^{4,5}, Алексейчик С.Е.^{4,6}, Панкратова Ю.Ю.^{4,6}

¹ ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»,
Минск, Беларусь

² ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»,
Минск, Беларусь

³ УЗ «РНПЦ оториноларингологии», Минск, Беларусь

⁴ УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

⁵ ГУ «МНПЦ хирургии, трансплантологии и гематологии», Минск, Беларусь

⁶ УЗ «10-я городская клиническая больница», Минск, Беларусь

Обонятельный эпителий (ОЭ) носовых ходов является доступным источником мезенхимальных стволовых клеток (МСК). МСК ОЭ обладают иммуносупрессивным эффектом в отношении клеток системы иммунитета и могут быть использованы в лечении заболеваний, ассоциированных с избыточным иммунным ответом. С 2016 года в Беларуси проведены клинические испытания для оценки эффективности применения МСК ОЭ при хронических стенозах и гортани (ХСТГ), системной красной волчанке (СКВ) и тяжелых формах COVID-19 ассоциированных пневмоний.

Клеточная терапия ХСТГ с использованием аутологичных МСК проведена 11 пациентам (одно или двукратное введение $1-5 \times 10^7$ клеток на 2–5 см протяженности дефекта слизистой) (NCT03130374). Лечение позволило предотвратить рестенозирование у всех пациентов. Восстановление площади просвета гортани и трахеи, улучшение функции дыхания отмечено у 9-ти пациентов, у которых отсутствовало нарушение хрящевого каркаса.

В клиническое испытание NCT04184258 включено 7 пациентов с СКВ (одно-, двукратное введение 1×10^6 /кг массы тела пулированных аллогенных МСК). Иммунологическая эффективность заключалась в снижении в крови количества иммунокомпетентных клеток, ассоциированных с процессом воспаления, и увеличение числа клеток, оказывающих противовоспалительный эффект. Показана клиническая эффективность терапии: спустя 6–24 мес. отсутствовало прогрессирование и снижалась общая активность СКВ (снижение индекса SELENA-SLEDAI с 10,43 до 5,14 баллов, $p < 0,05$).

В рамках клинического испытания NCT04382547 в группу исследования включено 14 пациентов с тяжелой формой COVID-19 (одно- или двукратное введение 1×10^6 /кг массы тела пулированных аллогенных МСК). 8-ми пациентам не потребовался перевод на ИВЛ, в группе исследования выжило 43% пациентов (6 из 14), в группе сравнения 5,5% (1 из 18) ($z=2,07$; $p=0,038$). Иммунологическая эффективность заключалась в достоверном увеличении содержания регуляторных Т-клеток после проведения клеточной терапии.

Применение аллогенных и аутологичных МСК ОЭ было безопасным и хорошо переносимым, а полученные данные свидетельствуют о высокой клинической эффективности клеточной терапии при ХСТГ, СКВ и тяжелых формах COVID-19-ассоциированных пневмоний.

Исследования были поддержаны грантами ГР № 20164617, № 20192163, № 20200996

Перспективы трансплантации прямо репрограммированных нейральных прогениторных клеток при спинальной травме

Баклаушев В.П.^{1,2*}, Дуров О.В.¹, Кальсин В.А.^{1,2}

¹ ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, Москва, Россия; 115682, Ореховый бульвар 28

² ИМБ РАН, России, Москва, Россия, ул. Вавилова 32

*e-mail: Baklaushev.vp@fnkc-fmba.ru

В эксперименте на макаках-резусах исследовали эффективность трансплантации аллогенных нейральных прогениторных клеток, полученных путем прямого репрограммирования (drNPCs) при травме спинного мозга. Предварительно была разработана модель необратимой спинальной травмы у нечеловекообразных приматов с интраоперационным контролем вызванных потенциалов (ВП), позволяющая получить полный односторонний анатомический перерыв кортикоспинального тракта и заднего столба на уровне Th7-8 (Baklaushev VP, 2019). В экспериментах на этой модели было обнаружено, что трансплантация 5 млн. drNPCs через 2 недели после пересечения афферентных и эфферентных путей спинного мозга в течение последующих 12 недель приводит к частичному восстановлению нарушенных функций спинного мозга в виде регресса ипсилатеральной моноплегии и восстановления сомато-сенсорных и моторных ВП. Последующий иммуногистохимический анализ показал, что drNPCs могут сохранять свою мультипотентность в пересаженном спинном мозге не менее 12 недель, мигрируя в зоны образования конусов роста поврежденных аксонов. Нейральная дифференцировка пересаженных drNPCs ни в одном из четырех исследованных случаев зарегистрирована не была. Sox2-позитивные трансплантированные клетки преимущественно обнаруживались в зоне активной регенерации, где они секретировали BDNF, что сопровождалось повышенным уровнем экспрессии синаптофизина клетками хозяина в сером и белом веществе. Полученные данные заставляют пересмотреть концепцию механизма действия трансплантированных нейральных стволовых/прогениторных клеток в которой обязательным условием восстановления поврежденного спинного мозга является интеграция пересаженных клеток в систему передачи нервного импульса.

Ключевые слова: спинальная травма, нейральные стволовые клетки, прямое репрограммирование, регенеративная терапия, вызванные потенциалы

Фенотип и цитотоксическая активность *in vitro*-генерированных противоопухолевых Т-лимфоцитов с генно-модифицированным антигенраспознающим рецептором

Кузнецова М.С.¹, Шевченко Ю.А.¹, Терещенко В.П.¹, Филиппова Ю.Г.¹, Алсаллум А.¹, Алрхмун С.¹, Вольнец М.О.¹, Акахори Я.², Шикю Х.^{1,2}, Сенников С.В.¹

¹ НИИФКИ, Новосибирск, Россия

² Высшая школа медицины Университета Миэ, Цу, Япония

Среди известных противоопухолевых иммунотерапевтических стратегий на сегодняшний день наибольший интерес исследователей вызывают подходы с использованием генно-модифицированных Т-клеток, поскольку генная модификация расширяет терапевтические возможности, ранее ограниченные естественным функционалом иммунокомпетентных клеток. CAR-T-клеточная терапия показала высокую эффективность для лечения гемобластозов, однако, существенное усложнение задачи наблюдается при переходе от терапии гематологических форм рака к лечению солидных опухолей. Поэтому высокую актуальность имеют работы, направленные на поиск различных вариантов реализации технологий получения CAR-T- и TCR-T клеток.

Целью настоящего исследования стало *in vitro* получение трех различных типов Т-лимфоцитов с генно-модифицированным рецептором, специфичных к трем различным антигенам солидных опухолей, и оценка их фенотипических и функциональных особенностей.

Объектом исследования являлись мононуклеарные клетки периферической крови условно-здоровых доноров. Путем вирусной трансдукции полученными ранее векторами, кодирующими соответствующий тип антиген-распознающего рецептора, были получены CAR-T-клетки специфичные к антигену GD2, TCR-подобные CAR-T-клетки, специфичные к MAGE-A4, а также TCR-T-лимфоциты, специфичные к молекуле NY-ESO-1.

Цитометрическое исследование фенотипа показало, что трансдуцированные клетки были представлены в большей степени CD8 и CD4 Т-лимфоцитами, обладали преимущественно фенотипом наивных клеток и клеток памяти ранних стадий дифференцировки. Незначительная доля трансдуцированных клеток несла на поверхности маркеры активации и истощения, указывая на высокий пролиферативный потенциал большинства клеток в исследуемых популяциях. Совместное культивирование Т-клеток с опухолевыми клетками-мишенями, экспрессирующими целевые антигены, приводила к увеличению числа клеток, несущих маркеры активации и цитотоксичности. Оценка цитотоксичности полученных трансдуцированных культур в условиях *in vitro* выявила, что культуры, трансдуцированные CAR-рецептором, специфичным к GD-2 и TCR-подобным CAR-рецептором, специфичными к эпитопу MAGE-A4, оказывают значимо больший цитотоксический эффект на опухолевые клетки-мишени, несущие целевые антигены GD-2 и MAGE-A4, соответственно, чем нетрансдуцированные клетки, при этом не вызывая выраженной цитотоксичности при сокультивировании с контрольными опухолевыми линиями, не несущими целевых антигенов.

Исследование поддержано грантом РНФ №21-65-00004, <https://rscf.ru/project/21-65-00004/>.

Выбор клеток-эффекторов для клеточной терапии онкологических заболеваний

Кулемзин С.В.¹

¹ *Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск*

Клеточная терапия онкологических заболеваний постепенно входит в клиническую практику. К настоящему моменту FDA одобрено шесть CAR T клеточных продуктов, которые показывают высокую эффективность и приемлемый профиль безопасности. К сожалению, несмотря на десятилетия исследований, успехи клеточной терапии в большей степени ограничены онкогематологическими заболеваниями В-клеточного происхождения. Солидные новообразования ощутимо хуже поддаются терапии CAR T-клетками, причинами этого является иммуносупрессивное опухолевое микроокружение, высокая гетерогенность опухолевых клеток и другие факторы [1]. Возможными путями решения этой проблемы может быть использование «усиленных» T- или NK-клеток, которые помимо экспрессии CAR секретируют растворимые белки, модулирующие активность эффекторных клеток, корректирующих таксис лимфоцитов или оказывающих прямое цитотоксическое действие на опухолевые клетки.

Малоизученной областью остается влияние субпопуляционного состава клеточно-го продукта на его эффективность, особенно актуально это для NK-клеток, которые обладают высокой гетерогенностью и сильными вариациями в цитотоксической активности в зависимости от источника клеток и способа их экспансии.

Отдельным перспективным направлением является генетическая модификация клеток-носителей CAR для коррекции сигналов от активирующих и ингибирующих рецепторов на их поверхности. Таким образом возможно получение CAR T/NK клеток, обладающих значительной резистентностью к иммуносупрессирующему воздействию.

1. *Sterner, R.C., Sterner, R.M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. // Blood Cancer J. 11, 69 2021.*

Исследование было поддержано грантом РНФ № 20-74-10039.

Самоорганизация МСК человека и моделирование конденсации мезенхимы для изучения морфогенетических процессов в соединительной ткани

Макаревич П.И.^{1,2}, Нимирицкий П.П.^{1,2}, Еремичев Р.Ю.^{1,2}, Александровская Н.А.^{1,2},
Кулебякина М.А.², Ткачук В.А.^{1,2}

¹ *Институт регенеративной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

² *Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Пространственно организованная конденсация мезенхимы – это структурирующее морфогенетическое событие, которое происходит при развитии многих органов (почки, легкие, кожа, конечности, мышцы, кишечник и т.д.). Конденсация является результатом повышения миграторной и митотической активности, а также агрегации клеток вследствие особенностей межклеточной адгезии и перестройки цитоскелета. Мезенхимные клетки, по-видимому, обладают внутренним потенциалом к выраженной агрегации, а особенно выраженную роль этот процесс играет в морфогенезе тканей опорно-двигательного аппарата.

Рациональным представляется создание и использование удобных модельных систем *in vitro*. Такая модельная система должна быть основана на клетках мезенхимного ряда, способных к спонтанной (без дополнительных внешних биологических или механических стимулов) компактизации, подобной по механизму мезенхимальной конденсации и завершающейся аналогичными исходами. Например, для миграции и компактизации клеток при мезенхимальной конденсации *in vivo* характерны перестройки актинового цитоскелета, зависящие от активности ГТФаз семейства Rho, с формированием способных к актомиозиновой подвижности стресс-фибрилл. В процессе агрегации клеток кроме дифференциальной межклеточной адгезии часто наблюдается формирование пространственно гетерогенного по составу внеклеточного матрикса. Результатом мезенхимальной конденсации являются обширные изменения экспрессии генов, крайним проявлением которых являются изменения способности клеток к дифференцировке в определенных направлениях. Немаловажными для модели остаются возможность для экспериментальных воздействий, микроскопического наблюдения и препаративного разделения популяций клеток с различной степенью конденсации.

В данной работе была создана и охарактеризована модельная система для изучения мезенхимальной конденсации на основе простейших тканеинженерных конструкторов – клеточных пластов (КП) из мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) человека. Также показано, что клеточные пласты из МСК человека, которые на данный момент рассматривают как инструмент трансплантации клеток, объединенных матриксом, являются системой, в которой формируются сложные межклеточные взаимодействия и идут процессы, имеющие черты морфогенетических. Известно, что конденсация играет роль не только в морфогенезе самой мезенхимы – конденсированная мезенхима передает инструктирующие сигналы окружающим клеткам других типов (эпителий, стволовые и прогениторные клетки, зрелая паренхима, сосуды), организуя их пространственно. Таким образом, КП из МСК могут быть интересным стартовым компонентом для создания сокультивационных моделей с генетической модификации (в т.ч. нокаутной), а также для получения более сложных тканеинженерных.

Исследование выполнялось при поддержке гранта РНФ №19-75-30007, а также в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова и по перспективному направлению научно-образовательного развития Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология»

Современные 3D-модели рака молочной железы для изучения взаимодействия опухолевых клеток с клетками микроокружения

Нуштаева А.А.¹, Абдурахманова М.М.^{1,2}, Кулемзин С.В.³, Беловежец Т.Н.³,
Рихтер В.А.¹, Коваль О.А.^{1,2}

¹ ФБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН»,
Новосибирск, Россия

² ФГАОУВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный
университет», Новосибирск, Россия

³ ФБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН»,
Новосибирск, Россия

Сложное микроокружение, в которой растут опухолевые клетки, имеет решающее значение для прогрессирования рака. Микроокружение опухоли состоит из внеклеточного матрикса, сформированного каркасными белками и протеазами, стромальных клеток, включая опухоль-ассоциированные фибробласты, эндотелиальных клеток и иммунных клеток. Возможность формирования многоклеточных гетерогенных 3D культур *in vitro* позволяет восполнить разрыв между экспериментальным подходом и физиологической значимостью таких моделей для тестирования противоопухолевых препаратов и изучения опухолевой прогрессии.

В рамках исследования реализован подход, позволяющий формировать трехмерные гетерогенные клеточные модели рака молочной железы (РМЖ), состоящие из опухолевых, стромальных клеток и иммунных клеток. В качестве опухолевых клеток использовали линии РМЖ: гормон-зависимую аденокарциному MCF7 и гормон-независимые аденокарциномы MDA-MB-231 и SK-BR-3, а качестве стромальных клеток – персональные культуры опухолевых и здоровых фибробластов BrC4f, BrC120f и BN120f. В качестве иммунных клеток использовали линию НК-подобных клеток YT. Для анализа влияния экзогенных стимулов на формирование и пролиферацию гетерогенных 3D сфероидов использовали 17 β -эстрадиол (E2) и TGF- β . Культивирование сфероидов проводили в режимах: 1) моно-культивирования (3D) только опухолевых клеток; 2) со-культивирования опухолевых и стромальных клеток (3D-2); 3) со-культивирования опухолевых, стромальных клеток и иммунных клеток (3D-3).

Унифицированы условия культивирования, позволяющие получать гетерогенные сфероиды РМЖ из всех типов опухолевых клеток. Показано, что стромальные клетки способствуют самоорганизации сфероидов и формируют центральный каркас, а опухолевые клетки – их внешний слой. Установлено, что E2 стимулирует пролиферацию клеток в составе 3D и 3D-2 сфероидов вне зависимости от входящих в них опухолевых клеток, тогда как при культивировании в 2D модели клетки MDA-MB-231 не чувствительны к E2. В составе сфероидов клетки MDA-MB-231 утрачивали, а SK-BR-3 приобретали чувствительность к пролиферативному воздействию TGF β . Клетки MDA-MB-231 проявляют высокую чувствительность к цитотоксическому действию НК-клеток линии YT в 2D-, 3D- и 3D-3-модели. Показано, что именно стромальные клетки привлекают НК-клетки внутрь гетерогенных сфероидов, усиливая их цитотоксическую активность.

В результате, реализована сложная трехмерная модель РМЖ из клеток человека, позволяющая исследовать динамическое взаимодействие между опухолевыми, стромальными и иммунными клетками. Такая модель является важным инструментом при изучении понимания механизмов, лежащих в основе взаимодействия между различными по происхождению клетками, что является необходимым условием для разработки новых стратегий лечения.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 20–74–10039.

Персонализированный подход к терапии глиом человека

Павлова Г.В.^{1,2,3}, Колесникова В.А.¹, Копылов А.М.⁴, Усачев Д.Ю.²

¹ ФГБУН Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН, 117485, Москва, Российская Федерация

² ФГАУ НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко Минздрава России, 125047, Москва, Российская Федерация

³ Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России, Российская Федерация, 119991, Москва, Российская Федерация

⁴ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Российская Федерация

Глиобластома (GBM) относится к самым неблагоприятным и тяжелым по течению злокачественным опухолям в организме человека. Гетерогенность, низкая чувствительность к терапии из-за присутствия гематоэнцефалического барьера и другие особенности этой опухоли делает ее практически невосприимчивой к любому лечению. На данный момент использование хирургического удаления опухоли с последующими радио- и химиотерапией лишь незначительно продлевают жизнь пациенту. Очевидно требуется поиск новых эффективных способов лечения этого заболевания. Первой важной ступенью в поиске терапии является замена линейных клеток глиомы, на которых отрабатывают лекарственные препараты, на клеточные культуры, полученные из опухолей пациентов. Такой подход может в конечном результате привести к персонализированной медицине. Известно, что глиома имеет гетерогенную структуру с aberrантной регуляцией клеточной пролиферации. Некоторые клетки опухоли погибают после лечения, а другие с иным набором мутаций оказываются устойчивыми к терапии, и их пролиферация способствует дальнейшему росту опухоли. Поэтому опухоль способна увеличиваться в размерах и выдерживать различные виды терапии. Поиск успешного терапевтического подхода с использованием клеточных культур глиобластом позволяет оценивать эти особенности опухоли. Второй важной ступенью в подходе к лечению глиомы является попытка смены парадигмы, если предыдущие подходы не принесли удачи. Нами предложен подход, который был назван дифференцировочной терапией, когда вместо поиска молекул, которые вызывают гибель опухолевых клеток, используются комбинации факторов, стимулирующие «созревание» незрелых опухолевых клеток, тем самым нарушая пролиферацию опухоли. Кроме того, мы создали платформу аптотерапии, на базе которой разрабатываются аптамеры для терапии, диагностики или в качестве таргетных носителей лекарственной молекулы. Объединение всех этих трех подходов может быть перспективным решением данной проблемы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России, грант № 075-15-2020-809 (13.1902.21.0030).

Молекулярно-биологические характеристики сарком мягких тканей для персонализации химиотерапии

Фетисов Т.И.¹, Моисеева Н.Н.¹, Кирилин Е.М.², Щербаков А.М.¹, Лалетина Л.А.¹, Махмудова Л.Ф.¹, Маникайло А.Е.¹, Алиева Ф.У.¹, Фомина Л.Я.¹, Бохян Б.Ю.¹, Зиновьева В.Ю.¹, Антошина Е.Е.¹, Морозова О.В.¹, Горькова Т.Г.¹, Труханова Л.С.¹, Белицкий Г.А.¹, Якубовская М.Г.¹, Кирсанов К.И.^{1,3}

¹ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

³ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Саркомы высокой степени злокачественности требуют многокомпонентного лечения, которое включает хирургические операции, радио- и химиотерапию. Данные литературы свидетельствуют о весьма низких показателях эффективности монотерапии сарком мягких тканей основными химиотерапевтическими препаратами, использование комбинированных режимов увеличивает эффективность химиотерапии лишь до 60%. Это свидетельствует об актуальности разработки методов прогнозного определения резистентности сарком мягких тканей к противоопухолевым агентам и их комбинациям для рационального назначения химиотерапии.

Была проведена оптимизация методики получения переживающих культур при работе с СМТ, было получено 210 образцов опухолей. При тестировании химиорезистентности доля резистентных культур к доксорубину (Dox) составила 61%, ифосфамиду (Ifo) - 64%, (Dox+Ifo) - 45%, доксетакселу (Doc) - 84%, гемцитабину (Gem) - 76%, (Doc+Gem) - 54%. Анализ компонентов системы множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) продемонстрировал отсутствие корреляции между уровнем экспрессии генов ABCB1, ABCC1, ABCG2, YB-1, MVP и резистентностью к препаратам. Для 37 образцов был проведен экзомный анализ, направленный на выявление молекулярно-генетических нарушений, обуславливающих развитие резистентности СМТ к химиопрепаратам, была выявлена связь между резистентностью опухолевых клеток к Dox и наличием мутаций в генах, кодирующих белки, регулирующие апоптоз. На модели *ex vivo* СМТ была проанализирована взаимосвязь хемочувствительности с экспрессией гипоксических белков CA IX и VEGF A. Экспрессия CA IX коррелировала с резистентностью СМТ к Ifo и его комбинации с Dox. Культуры липосарком с высоким уровнем экспрессии VEGF A имели высокую чувствительность к Gem и его комбинации с Doc. В то время как способность опухолевых клеток изменять активность экспрессии VEGF A в ответ на гипоксию была связана с резистентностью к Dox, Doc и комбинации последнего с Gem.

В результате проведенного исследования показано, что первичные культуры СМТ являются адекватной модельной системой для изучения механизма развития химиорезистентности. Изучение прогнозной значимости определения химиорезистентности *in vitro* будет продолжено путем сопоставления полученных данных с клиническими результатами.

Исследование было поддержано грантами РФФИ № 18-29-09095

Клеточная иммунотерапия солидных опухолей на моделях опухолевых сфероидов и экспериментальной глиобластомы *in vivo*

Юсубалиева Г.М.^{1,2}, Горчаков А.А.³, Кулемзин С.В.³, Дашинамаев Э.Б.⁴, Кальсин В.А.^{1,2}, Мельников П.М.¹, Калинин А.А.¹, Бочаров А.А.¹, Южакова Д.В.⁵, Баклаушев В.П.^{1,2}

¹ ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, Москва, Россия; 115682, Ореховый бульвар 28

² Институт молекулярной биологии РАН им. В.А. Энгельгардта, Москва, Россия

³ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН

⁴ РНИМУ им. Н.И. Пирогова

⁵ Приволжский национальный исследовательский медицинский университет, Н. Новгород, Россия

e-mail: gaukhar@gaukhar.org

В экспериментах *in vitro* на опухолевых сфероидах, воспроизводящих микроокружение солидных опухолей, и *in vivo* — на моделях сингенных опухолевых графтов оценивали противоопухолевую эффективность аутологичных TILs, аллогенных NK из пуповинной крови и модифицированных/таргетированных линейных NK клеток (VAV1+, CISH^{-/-}, B2M^{-/-}, EGFRvIII-CAR). Для детекции клеток мишеней в экспериментах *in vitro* и *in vivo* применили бицистронные лентивирусные векторы для одновременной экспрессии флюоресцентного белка mKate2 и люциферазы Luc2. TILs получали из интраоперационного опухолевого материала пациентов, получавших хирургическое лечение мультиформной глиобластомы в ФНКЦ ФМБА России. Фенотип иммунных клеток изучали с помощью проточного цитофлуориметра MACSQuant 10, с лазерами 405, 488 и 635 нм. В выделенных TILs определяли субпопуляционный состав: доли цитотоксических CD8 + T-клеток, T-хелперов, T регуляторных клеток, NK, NKT, B-клеток до и после активации. Для экспериментов *in vitro* и *in vivo* иммунные клетки метили витальными флюоресцентными трейсерами. Взаимодействие иммунных клеток с опухолевыми клетками в экспериментах *in vitro* и *in vivo* изучали с помощью интравитальной конфокальной микроскопии и метаболического биоимджинга.

Исходные культуры TILs характеризовались высоким уровнем экспрессии PD1, что свидетельствовало об их исходно низкой противоопухолевой цитотоксичности. Динамическая микроскопия показала, что, в отличие от исходных TILs, активированные аутологичные TILs, так же как модифицированные YT клетки и аллогенные NK способны мигрировать вглубь сфероида глиобластомы человека, разрушая трехмерную структуру, изменяя экспрессию поверхностных опухолевых маркеров и приводя к метаболическим нарушениям и апоптозу опухолевых клеток.

На сингенных ортоотопических моделях глиобластомы мыши изучали межклеточное взаимодействие аутологичных мышинных TILs с клетками глиомы GL-261 и ST-2A, а также особенности иммуносупрессивного опухолевого микроокружения, инактивирующего цитотоксические клетки. Полученные результаты могут лечь в основу новых технологий адаптивной иммунотерапии солидных опухолей, в частности, мультиформной глиобластомы, путём повышения таргетности, преодоления иммуносупрессивного микроокружения и дальнейших модификаций иммунных клеток, усиливающих их противоопухолевую активность.

Ключевые слова: адаптивная иммунотерапия, солидные опухоли, опухоль инфильтрирующие лимфоциты, TILs, PD-1.

Источник финансирования: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда №21-74-20110 и в рамках Государственного задания ФМБА России (НИР «Адаптивная иммунотерапия», проект 20.003.20.800).

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА
И БИОИМИДЖИНГ**

Системы визуализации малых некодирующих РНК: химическое расширение флуоресцентной палитры и оптимизация структуры метки

Быченко О.С.¹, Хрулев А.А.¹, Светлова Ю.И.², Цветков В.Б.², Камзеева П.Н.¹, Скворцова Ю.В.¹, Зацепин Т.С.³, Ажикина Т.Л.¹, Варижук А.М.², Аралов А.В.¹

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

² ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва, Россия

³ МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

Малые некодирующие РНК (мнРНК) являются важными модуляторами транскрипции и трансляции. Многие эукариотические мнРНК дифференциально экспрессируются при раке, нейродегенеративных заболеваниях и других патологиях, что делает их привлекательными терапевтическими мишенями или биомаркерами. Прокариотические мнРНК регулируют реакцию на стресс, адаптацию, передачу сигналов и процессы, связанные с вирулентностью, причем особый интерес представляет их вклад в уклонение от иммунного ответа. Лежащие в основе механизмы функционирования мнРНК требуют уточнения, поэтому необходимы методы визуализации и отслеживания мнРНК в живых клетках.

Несмотря на недавние успехи в визуализации внутриклеточной РНК с помощью флуоресцентной микроскопии, для мечения мнРНК доступно только несколько методов, включая введение в состав исследуемой РНК сайтов связывания флуоресцентных белков. Основные проблемы данного подхода связаны с большими размерами метки и низким контрастом системы. Вышеперечисленные проблемы могут быть решены при использовании систем визуализации на основе низкомолекулярного флуорогенного красителя, который не флуоресцирует в свободном состоянии, но разгорается при связывании с РНК аптамером, слитым с исследуемой РНК.

Среди подобных систем визуализации особенно перспективными выглядят системы на основе аптамеров семейства Манго/Персик и цианиновых флуорогенных красителей (ТО1-биотин и др.), поскольку данные аптамеры проявляют высокую внутриклеточную стабильность и аффинность связывания с красителями, а используемые краски отличаются высокой фотостабильностью, коэффициентом экстинкции, квантовым выходом и яркостью без заметной цитотоксичности. Однако синтез красителей проходит с низкой эффективностью, а применение данных систем ограничивается визуализацией в зеленом канале микроскопа.

Для решения данных проблем мы разработали эффективные методы синтеза аналога ТО1-биотин со сравнимыми с ним спектральными характеристиками, а также производного, позволяющего осуществлять визуализацию в красном канале микроскопа. Кроме того, при создании конструкта для визуализации мнРНК, длина активирующей флуоресценцию РНК метки (F30-MangoII: 70 нп) была укорочена за счет усечения одного из стеблей адаптера F30, обеспечивающего структурную стабилизацию аптамера *in vivo*. В результате была получена самая короткая на сегодняшний день метка для концевое мечения РНК (ds-MangoII: 52 нп). Применимость оптимизированной метки и нового красителя для внутриклеточной визуализации регуляторной мнРНК была подтверждена с использованием внутриклеточного паразита *M. smegmatis*, интернализованного мышинными макрофагами.

Исследование было поддержано грантом РФФИ № 20-34-70143.

Биолюминесцентный метод выявления однонуклеотидных полиморфизмов как инструмент в ассоциативных исследованиях

Башмакова Е.Е.¹, Панамарев Н.С.¹, Кудрявцев А.Н.¹, Франк Л.А.¹

¹ Институт биофизики СО РАН, Красноярск, Россия

Выявление однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) важно при исследовании генетических основ заболевания, оценке индивидуального риска его развития, определения стратегии терапии. При этом для клинически значимых SNP развитие патологии часто происходит при совместном влиянии полиморфизмов как одного, так и разных генов.

При выявлении группы лиц с риском развития патологии необходима информация о частотах аллелей и их ассоциации с клиническими характеристиками. При этом частоты аллелей и генотипов в разных популяциях отличаются, а информации о частотах в отечественной популяции для ряда клинически значимых SNP недостаточно или она отсутствует. Для проведения локальных исследований по ассоциации SNP с заболеваниями предложен способ генотипирования на основе вариантов обелина, различающихся по спектру и кинетике сигналов. Он включает в себя ферментативное удлинение аллель-специфичного праймера (PEXT) с последующим биолюминесцентным микроанализом ее продуктов. Анализ проводится в высокопроизводительном планшетном формате и занимает 2 ч. Генотип определяется по соотношению биолюминесцентных сигналов репортерных обелинов (дискриминационный фактор, Д). За последние несколько лет были генотипированы более 1600 клинических образцов ДНК на наличие SNP, предположительно ассоциированных с рядом различных патологий. Диапазон значений Д для разных вариантов генотипа: нормальная гомозигота (10-48), гетерозигота (0,9-4) и мутантная гомозигота (0,09-0,5), различается существенно, что обеспечивает достоверность генотипирования. Способ легко адаптируется для определения различных SNP заменой аллель-специфичных праймеров. При одновременном определении нескольких SNP, локализованных в разных генах, матрицы получали одновременно в одной пробирке мультиплексной амплификацией и полученную смесь без очистки использовали для четырех отдельных PEXT реакций. Во всех исследованиях были использованы контрольные образцы с подтвержденным гетерозиготным генотипом методом секвенирования по Сэнгеру.

Пользуясь разработанным способом были исследованы ассоциации SNP rs9904341 в гене *BIRC5* с риском возникновения рака мочевого пузыря, 3-х SNP в гене *MC1R* с риском развития меланомы, 4-х SNP в генах *FV*, *MTHFR*, *FII*, *FVII* с риском развития нарушений системы гемостаза, 5-ти SNP в генах *CAT*, *NCL*, *HSPA1L* и *PCDH15* с угрозой возникновения нейросенсорной тугоухости при работе во вредных условиях труда.

Биолюминесцентный способ выявления аллельных вариантов гена позволяет быстро и с высокой достоверностью проводить локальные скрининговые исследования, направленные на определение предикторной значимости того или иного полиморфизма для медицинской диагностики.

Анализ антительного ответа к различным вариантам SARS-CoV-2 с помощью микрочиповой тест-системы

Ведехина Т.С.¹, Густин Д.Д.², Варижук А.М.¹

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия

Детекция уровней антител к различным вариантам SARS-CoV-2 имеет значение для своевременного выявления инфекции и мониторинга заболевания, а также для оценки эффективности вакцинирования. В нашей работе мы осуществляли анализ уровня антител к SARS-CoV-2 с помощью разработанных нами многофункциональных микрочипов с иммобилизованными белками-антигенами.

Детальный анализ на нескольких группах доноров позволил подобрать оптимальные панели маркеров для переболевших и вакцинированных. Линейный коэффициент корреляции показал, что данные по уровню антител к уханьскому варианту (WIV04/2019) SARS-CoV-2 на микрочипах сходятся с данными по иммуноферментному анализу [1]. Варианты альфа (B.1.1.7), каппа (B.1.617.1), дельта (B.1.617.2) и омикрон (B.1.1.529) коррелируют с уханьским вариантом SARS-CoV-2.

Результаты на микрочипах со структурными белками SARS-CoV-2 показали, что у переболевших пациентов первой волны значительно выше иммунный ответ в отношении RBD (рецептор-связывающий домен) S-белка исходного дикого типа SARS-CoV-2 по сравнению с другими вариантами коронавируса, в некоторых случаях антитела к последним отсутствовали. Для вакцинированных препаратом Спутник V был показан примерно одинаковый уровень антител к RBD всех пяти вариантов SARS-CoV-2, за исключением омикрона, где иммунный ответ оказался несколько ниже. У доноров, вакцинированных препаратом КовиВак, наблюдали высокий уровень антител к белку S2. Также следует отметить, что у вакцинированных зафиксирован небольшой аутоиммунный ответ на фибриноген, а антитела к тромбину наблюдали как у переболевших, так и у вакцинированных доноров.

1. *Matyushkina D., Shokina V., Tikhonova P., Manuvera V., Shirokov D., и др. всего 19 человек. Autoimmune effect of antibodies against the SARS-CoV-2 nucleoprotein. // Viruses. – 2022. – V. 14. – № 1141.*

Авторы благодарят центр технологий и микрофабрикации (ФНКЦ ФХМ ФМБА), лабораторию генной инженерии (ФНКЦ ФХМ ФМБА), лабораторию простых систем (НИИ СБМ Роспотребнадзора), центр молекулярной медицины и диагностики (ФНКЦ ФХМ ФМБА) и лабораторию медицинских нанотехнологий (ФНКЦ ФХМ ФМБА) за помощь с оборудованием и предоставление рекомбинантных белков и образцов сывороток крови. Исследование было поддержано грантом РНФ № 22-25-00420.

Особенности получения и применения антигенов вируса SARS-CoV-2 и его клеточного рецептора для иммунодиагностики

Воробьев И.И.^{1,2}, Орлова Н.А.¹, Синегубова М.В.¹, Ковнир С.В.¹, Колесов Д.Э.¹, Даянова Л.К.^{1,2}, Должикова И.В.³

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Институт биоорганической химии РАН

³ НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи МЗ РФ

Определение уровней связывающих антител к двум главным антигенам вируса SARS-CoV-2 и уровня нейтрализующих антител к его S-белку для больших групп людей необходимо для определения размеров и групп людей, развивших эффективный гуморальный иммунный ответ на введенные вакцины и прошедших заражение вирусом вне зависимости от тяжести симптомов заболевания. Чувствительность и специфичность иммунодиагностических тестов в значительной степени определяется чистотой и степенью мультимеризации используемого белкового антигена. При быстром внедрении систем иммунодиагностики новой вирусной инфекции получение рекомбинантных антигенов проводилось не всегда в наиболее корректной форме не представлялось приоритетной задачей, вследствие чего в некоторых случаях фиксировались относительно высокие уровни ложноположительных или ложноотрицательных результатов тестирования.

Нуклеопротеин (N) вируса SARS-CoV-2, широко используемый в качестве антигена для иммунодиагностики, является крайне щелочным белком, склонным к образованию мультимеров и разделению фаз в присутствии РНК. Для нуклеопротеина, полученного в растворимой форме в цитоплазме *E.coli*, нами было обнаружено, что его иммунореактивность в отношении набора стандартных сывороток крови больных COVID-19 существенно увеличивается после полного удаления примеси РНК при помощи двух различных процедур – обработки лизата рибонуклеазой А и удалением остатков РНК на колонке при промывке металлохелатного сорбента раствором с 2 М хлорида натрия.

Рецептор-связывающий домен шиповидного белка вируса SARS-CoV-2 (RBD) является вторым иммунодоминантным антигеном вируса, титр антител к нему в наибольшей степени коррелирует с уровнем вирус-нейтрализующих антител. RBD для иммунодиагностики может быть получен в больших количествах и в преимущественно мономерной форме в клетках CHO для границ домена 320–537, но не 319–541 и очищен до гомогенности при помощи одной стадии металлохелатной хроматографии.

Внеклеточная часть рецептора вируса SARS-CoV-2 - ангиотензин-превращающего фермента-2 (ACE2) также может быть получена в больших количествах при помощи клеток CHO и применена для разработки тестов суррогатной вирус-нейтрализации (sVNT) в формате ИФА. Данный тест предпочтительно проводить, используя иммобилизованный на микропланшетах RBD и зонд ACE2-HRP. Такой формат проведения sVNT обеспечивает высокую корреляцию его результатов с результатами теста на вирус-нейтрализацию с живым вирусом, значительно большую прецизионность определения, чем для теста с иммобилизованным ACE2 и легкость адаптации процедуры к новым вариантам SARS-CoV-2.

Исследование было поддержано грантом РФФИ № 20-58-55001.

Перспективы применения олигонуклеотидных аптамеров в диагностике и терапии ревматических заболеваний

Воробьева М.А.¹, Королев М.А.^{1,2}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

² *Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной
лимфологии – филиал ФИЦ ИЦИГ СО РАН, Новосибирск, Россия*

Олигонуклеотидные аптамеры – молекулы ДНК или РНК с характерной вторичной структурой, способные прочно и специфично связываться с определенными молекулярными мишенями. Аптамеры представляют собой многообещающую альтернативу моноклональным антителам в качестве узнающих элементов для создания диагностических систем и таргетных терапевтических препаратов. При этом по сравнению с антителами они обладают целым рядом уникальных преимуществ, которые обусловлены как их химической природой, так и возможностью селекции аптамеров «в пробирке». В настоящее время активно идут работы по созданию тест-систем и средств терапии на основе аптамеров к биомолекулам, ассоциированным с определенными патологиями. Основные усилия сосредоточены в области инфекционных, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, но применение технологий с использованием аптамеров может быть весьма удачным и в других областях медицины.

В докладе рассмотрены перспективы применения олигонуклеотидных аптамеров для решения задач ревматологии. Ревматические заболевания достаточно широко распространены в популяции, а для их эффективного лечения нужна ранняя, в том числе доклиническая диагностика. Их хронический характер требует регулярного, длительного мониторинга ряда биомаркеров, для чего необходимы доступные тест-системы с высокой воспроизводимостью. Таргетная терапия ревматических заболеваний направлена на белки-участники воспалительных каскадов и основана на использовании молекул, специфически связывающихся с этими белками. Для решения всех перечисленных задач могут быть использованы ДНК- и РНК-аптамеры. Хотя на данный момент количество исследований в этой области относительно невелико, очевиден большой потенциал применения аптамеров в ревматологическом контексте. Для его успешного развития нужен систематический подход и использование опыта, уже накопленного при создании таргетных препаратов и тест-систем на основе антител.

Исследование было поддержано совместным грантом РФФИ и правительства Новосибирской области № 22-15-20050.

Неспецифическая активность цепь-вытесняющих ДНК-полимераз как основа для разработки новых способов обнаружения НК-мишеней

Сахабудинова А.Р., Купова О.Ю., Ханова Л.И., Гарафутдинов Р.Р.

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

В настоящее время продолжается разработка новых и совершенствование существующих методов обнаружения/анализа ДНК и РНК мишеней, большинство из которых основано на амплификации специфических нуклеотидных последовательностей. Безальтернативным компонентом любой амплификационной системы являются ДНК- или РНК-полимеразы, которые, к сожалению, не обеспечивают абсолютную точность синтеза полинуклеотидных цепей. Ранее неоднократно была показана способность многих термостабильных ДНК-полимераз осуществлять синтез ДНК *ab initio*, а ДНК-полимеразы с цепь-вытесняющей активностью склонны вести мультимеризацию НК [1, 2]. Подобная неспецифическая активность обуславливает недостаточную достоверность получаемых результатов, что снижает ценность некоторых предложенных методов молекулярной диагностики.

Нами обнаружено, что многие ДНК-полимеразы с цепь-вытесняющей активностью способны вести мультимеризацию НК [3], которая, по-видимому, запускается за счет неспецифического связывания фермента со свободными цепями ДНК [4], и показана зависимость эффективности мультимеризации от ряда факторов. У одной из коммерческих ДНК-полимераз без заявленной цепь-вытесняющей активности обнаружена способность к вытеснению НК-цепей, а у ряда ДНК-зависимых ДНК-полимераз - ревертазная активность. Совокупность полученных данных позволила разработать несколько новых способов амплификационно-опосредованного обнаружения специфических НК-мишеней: микроРНК (на примере микроРНК растений пшеницы) и вирусной РНК (на примере РНК коронавируса SARS-CoV-2). Показана большая специфичность и чувствительность предложенных подходов по сравнению с традиционно используемыми.

1. Hafner G.J., Yang I.C., Wolter L.C., Stafford M.R., Giffard P.M. *Isothermal amplification and multimerization of DNA by Bst DNA polymerase* // *BioTechniques*. - 2001. - V. 30. - P. 852-867.
2. Wang G., Ding X., Hu J., Wu W., Sun J., Mu Y. *Unusual isothermal multimerization and amplification by the strand-displacing DNA polymerases with reverse transcription activities* // *Sci. Rep.* - 2017. V. 7. - e13928.
3. Garafutdinov R.R., Gilvanov A.R., Sakhabutdinova A.R. *The influence of reaction conditions on DNA multimerization during isothermal amplification with Bst DNA polymerase* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* - 2020. - V. 190. - P. 758-771.
4. Sakhabutdinova A.R., Kamalov M.I., Salakhieva D.V., Mavzyutov A.R., Garafutdinov R.R. *Inhibition of nonspecific polymerase activity using poly(aspartic) acid as a model anionic polyelectrolyte* // *Anal. Biochem.* - 2021. - V. 628. 114267.

Исследование было поддержано грантами РФФИ № 19-34-90010 и РНФ № 22-24-00235.

Обнаружение модели коронавируса с помощью нанопроволочного биосенсора

Генералов В.М.¹, Наумова О.В.², Щербаков Д.Н.¹, Черемискина А.А.¹,
Меркульева Ю.А.¹, Асеев А.Л.²

¹ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Российская Федерация

² Институт физики полупроводников им. Ржанова Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, Российская Федерация

Пандемия COVID-19 сопровождается глубокими изменениями в повседневной жизни многих стран [1]. Меры, принятые для борьбы с передачей вируса, имели обширные и глубокие социально-экономические последствия. Коронавирусы (Cov) представляют собой большое семейство РНК-содержащих вирусов, которые вызывают различные заболевания, начиная от обычной простуды и заканчивая более серьезными заболеваниями. Коронавирус (nCoV) - это штамм, ранее не обнаруженный у людей. Помимо вакцины, еще одним фактором сдерживания коронавируса, по данным ВОЗ, является лабораторная диагностика. Наиболее распространенным методом лабораторной диагностики коронавируса является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Для нее основным видом биоматериала является мазок из носоглотки и/или рта. Метод ПЦР-анализа дает прямое указание на наличие определенной части ДНК/РНК возбудителя в материале, взятом у пациента. Другой эффективный метод диагностики ИФА основан на специфическом связывании антигенов с антителами. Однако ВОЗ призывает к разработке новых, более чувствительных и быстрых методов обнаружения вирусов. Целью данной работы является обнаружение модели коронавируса с помощью нанопроволочного биосенсора на основе полевого транзистора и изучение свойств вируса как частицы.

Здесь представлены результаты обнаружения вирусоподобных частиц (ВПЧ) коронавируса с использованием нанопроволочного биосенсора. В эксперименте мы использовали суспензии ВПЧ и специфические антитела к вирусу. Значение тока биосенсора измеряли до и после введения ВПЧ в суспензию на его поверхности.

Результаты:

- ВПЧ, комплексы антитело + ВПЧ на участке фазы - поверхность нанопроволоки, исследуемая суспензия модулируют ток биосенсора;
- чувствительность биосенсора составляет $\sim 10^{-16}$ М.

По результатам экспериментов сформулирован вопрос о полярности электрического заряда ВПЧ и комплексов антитело + ВПЧ.

1. Вступительное слово Генерального директора ВОЗ на брифинге для СМИ, посвященном COVID-19, 11 марта 2020 года. URL: <https://www.who.int/ru/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19> (11 марта 2020 года).

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ Грант № 1829-02091. Образцы подготовлены в рамках Государственного задания 21/21 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

ДНК-аптамеры как узнающий элемент сенсоров

Завьялова Е.Г.¹, Жданов Г.А.¹, Тихонова Д.А.¹, Кукушкин В.И.²

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Институт физики твердого тела РАН, Черноголовка, Россия

Аптамеры – структурированные олигонуклеотиды, способные к специфическому связыванию аналитов. Константы диссоциации комплексов аптамер-белок находятся в диапазоне $10^{12}10^{10}$ М, что сопоставимо с аффинностью антител. В отличие от других узнающих элементов, аптамер можно разработать к аналиту любого класса, а сами аптамеры получают автоматическим химическим синтезом, при этом есть возможность сайт-специфического введения модификаций. Эти обстоятельства делают аптамеры на основе нуклеиновых кислот привлекательными узнающими элементами, которые могут быть применены для создания биосенсоров.

В настоящее время аптасенсоры – биосенсоры на основе аптамеров – активно разрабатываются с привлечением самых разных физических принципов детекции: от спектроскопии до электрохимических устройств. Одно из перспективных сочетаний – аптамеры и спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР), где аптамеры определяют специфичность определения аналита, а ГКР позволяет достичь высокой чувствительности сенсора.

В настоящее время первостепенной задачей является специфическое высокочувствительное определение вирусов с помощью экспресс-тестов. Мы предложили несколько ГКР-аптасенсоров со временем анализа менее 15 минут. Чувствительность составила: 1) $2 \cdot 10^5$ вирусных частиц гриппа А или SARS-CoV-2 в пробе для варианта сенсора с использованием коллоидного серебра; 2) $4 \cdot 10^3$ вирусных частиц гриппа А в пробе для варианта сенсора с использованием наноструктурированных подложек; и 3) $2 \cdot 10^2$ вирусных частиц гриппа А в пробе для варианта сенсора с использованием коллоидного серебра и префильтрации образца. Последний из перечисленных сенсоров сопоставим по чувствительности с полимеразной цепной реакцией с обратной транскрипцией, золотым стандартом диагностики респираторных вирусов.

Производные аденозина не вызывают иммунный, поэтому для их детекции невозможно использовать антитела. Нам удалось создать ГКР-аптасенсор, который определяет концентрацию аденозин монофосфата в диапазоне от $2 \cdot 10^{-9}$ до $2 \cdot 10^{-4}$ М.

Основываясь на этих результатах, представляется чрезвычайно перспективным поиск новых сочетаний аптамеров и методов и активных поверхностей, которые позволяют достичь ультра-чувствительности методик.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 18-74-10019.

Сайт-специфические диагностические и терапевтические конъюгаты антител

Коршун В.А.¹, Сапожникова К.А.¹, Гуляк Е.Л.¹, Орешков С.Д.^{1,2}, Верютин Д.А.^{1,2}, Михайлова А.С.^{1,3}, Мисюрин В.А.⁴, Алфёрова В.А.¹, Брылёв В.А.¹

¹ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

² Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ НИУ «Высшая школа экономики», Москва, Россия

⁴ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

Антитела (иммуноглобулины) могут быть использованы как инструменты для диагностики или как средства доставки терапевтических препаратов. В первом случае применяют флуоресцентно меченые антитела. Во втором случае к антителу присоединяют терапевтические молекулы (обычно противоопухолевые антибиотики или цитотоксические агенты). Терапевтические конъюгаты (ADC, antibody-drug conjugate) разрабатываются весьма активно; к настоящему времени одобрено для клинического применения около полутора десятков таких конъюгатов, и более сотни находятся на различных стадиях клинических исследований [1]. Для эффективности ADC важны сайт-специфичность модификации антитела (чтобы она не затрагивала антиген-связывающие домены), структура линкера (длина, гидрофильность) и его способность к расщеплению после доставки препарата к опухолевой клетке, гомогенность конъюгата и его стехиометрия – число молекул препарата на молекуле антитела (DAR, drug-antibody ratio). Недавно обнаружена особая эффективность ADC, несущих два различных цитотоксических агента. При флуоресцентном мечении антител также необходимо сайт-специфическое введение красителя с сохранением аффинности.

Мы исследуем потенциал применения модификации антител с помощью периодатного окисления гликанов с последующей реакцией с О-алкилгидроксиламинами (оксимное лигирование). Этот сайт-специфический метод можно применить к любому полноразмерному иммуноглобулину G, причём биоортогональность обеих стадий и консервативность локализации сайта гликозилирования гарантируют сохранение аффинности к антигену. Мы осуществили успешное мечение моноклональных антител к опухоль-ассоциированному белку PRAME флуоресцентными красителями, как с помощью ступенчатого [2], так и прямого [3] метода. Флуоресцентные антитела были использованы для анализа целевого антигена. Мы также разработали линкеры для контроля DAR при получении ADC и разветвлённые линкеры для увеличения DAR или комбинации двух препаратов в одном ADC.

1. Fu Z. et al. Antibody drug conjugate: the “biological missile” for targeted cancer therapy. *Sign. Transduct. Target. Ther.*, 2022, 7, 93.
2. Sapozhnikova K.A. et al. Detection of the PRAME protein on the surface of melanoma cells using a fluorescently labeled monoclonal antibody. *Rus. J. Bioorg. Chem.*, 2021, 47, 1077–1085.
3. Sapozhnikova K.A. et al. Sensitive immunofluorescent detection of the PRAME antigen using a practical antibody conjugation approach. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22, 12845.

Исследование поддержано грантом РФФ № 20-15-00361.

Перспективы целентеразин-зависимых люцифераз в качестве генетически-кодируемых репортеров для биолюминесцентного биоимиджинга

Маркова С.В.¹

¹ Институт биофизики СО РАН,
ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН», Красноярск, Россия

Технологии биолюминесцентного имиджинга (БЛИ), интенсивно развивающиеся в последнее десятилетие, позволяют с высокой чувствительностью неинвазивно мониторить клеточные процессы в реальном времени. Такое развитие обусловлено как быстрым прогрессом чувствительности светорегистрирующей аппаратуры, так и созданием ряда биолюминесцентных (БЛ) репортеров из клонированных биолюминесцентных белков. Благодаря независимому возникновению БЛ систем в разных таксонах живых организмов из предковых биохимических путей, в процессе их исследования был получен ряд негомологичных биолюминесцентных белков с различными репортерными свойствами. И этот список постоянно пополняется как в процессе изучения новых БЛ организмов, так и в результате улучшения репортерных свойств известных БЛ белков.

Несмотря на вышеуказанный список, на сегодняшний день критическим для развития технологий БЛИ является отсутствие достаточно хороших биолюминесцентных репортеров. Свойства всех имеющихся БЛ репортерных белков далеки от свойств идеального БЛИ-репортера, для которого желательно: 1) высокая активность, 2) эмиссия света в диапазоне «окна прозрачности» биологических тканей (~700-1000 нм), 3) простая биолюминесцентная реакция без кофакторов, 4) полное отсутствие токсичности и влияния на клеточные процессы у биолюминесцентного субстрата, 5) оптимумы условий протекания БЛ реакции близки к оптимумам условий существования изучаемых клеток и организмов.

По спектру излучения, который ближе всего к диапазону оптической прозрачности живых тканей, в настоящее время нет конкурентов у различных улучшенных производных люциферазы насекомых, и люциферазы светлячков, в частности. Но зависимость активности этой группы от концентрации АТФ и Mg²⁺ существенно сужает область их применения.

Целентеразин-зависимые люциферазы – разнородная группа белков из морских организмов, включая внутриклеточную люциферазу коралла *Renilla*, секретируемые люциферазы copepod *Metridia* и *Gaussia*, рачков *Ophrophorus* и *Cypridina*, которые катализируют простую реакцию окисления биолюминесцентного субстрата целентеразина без каких-либо кофакторов. Это обуславливает их привлекательность для технологий БЛИ, но спектр их излучения в основном находится в голубом диапазоне и интенсивно поглощается живыми тканями. Для преодоления данного недостатка ведутся интенсивные работы как по совершенствованию репортерных свойств этих БЛ белков, так и по изменению спектральных свойств их общего биолюминесцентного субстрата.

1. Markova S.V., Larionova M.D., Vysotski E.S. *Shining light on the secreted luciferases of marine copepods: current knowledge and applications. // Photochem Photobiol.*, 2019, 95(3):705-721.

Исследование было поддержано грантом № 20-44-242003\20 РФФИ, Правительством Красноярского края и Краевого фонда науки.

Нанопроволочные сенсоры для молекулярной диагностики

Наумова О.В., Зайцева Э.Г.

Институт физики полупроводников им. Ржанова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Интенсивные усилия и исследования по созданию современных средств молекулярной диагностики, предпринимаемые в последние десятилетия, показали, что нанопроволочные или нанополосковые сенсоры на основе кремниевых полевых транзисторов являются универсальной платформой для высокочувствительных систем экспресс-диагностики с широким спектром применений [1, 2]. Такие сенсоры могут быть использованы для индикации аналита в области медицинской диагностики, персональной медицины, для решения задач по созданию вакцин и лекарственных препаратов, для решения исследовательских задач – определению параметров самих биочастиц.

В данной работе на основе экспериментальных исследований проведен анализ возможностей использования нанопроволочных сенсоров для детекции биологических частиц (белков, РНК, вирусов), включая чувствительность сенсоров, динамический диапазон, возможность определения концентрации/зарядового состояния целевых частиц, в частности, при использовании диэлектрофоретической (ДЭФ) манипуляции частицами. На основе результатов моделирования в программе TCAD Sentaurus показано, что для получения предельных параметров сенсора критичным является режим его работы, даже при ДЭФ-доставке аналита к сенсорному элементу.

1. *Mu L., Chang Y., Sawtelle S.D., Wipf M., Duan X., Reed M.A. Silicon Nanowire Field-Effect Transistors—A Versatile Class of Potentiometric Nanobiosensors. IEEE Access – 2015. – V. 3. - P 287–302.*
2. *Наумова О.В., Генералов В.М., Зайцева Э.Г., Латышев А.В., Асеев А.Л., др. всего 12 человек. Биосенсоры на основе КНИ-нанопроволочных транзисторов для биомедицины и вирусологии. Микроэлектроника. - 2021. - Т. 50. - С 166–174.*

Оптимизация структуры модельных iM для дизайна внутриклеточных pH-сенсоров

Петрунина Н.А.^{1,2}, Варижук А.М.^{1,2}, Шторк А.С.^{1,2}, Лукина М.М.^{1,2},
Ходорович Ю.М.³, Аралов А.В.³, Богомазова А.Н.¹, Шендер В.О.¹, Лагарькова М.А.¹

¹ ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва, Россия

² ФГАО УВО МФТИ, Долгопрудный, Россия

³ ГНЦ ФГБУН ИБХ РАН, Москва, Россия

В геноме человека цитозин-богатые участки способны формировать неканонические вторичные структуры – интеркалированные мотивы (iM). Одним из таких iM, вероятно участвующим в регуляции экспрессии гена SHANK1, является фрагмент его промоторной области (CCCCCCTCCCCCACCACCC). Формирование iM происходит за счёт образования гемипротонированных цитозиновых пар и зависит от pH среды. Нуклеотиды на седьмой (Т), четырнадцатой (А) и двадцать первой (А) позициях находятся в петлях образовавшейся структуры. Введение в эти петли iM модификаций, имитирующих отщепление гетероциклов, приводит к увеличению скорости сворачивания и расплетения структуры iM при смене pH. [1].

Геномные конструкции, подобные производным iM из SHANK1, могут применяться как pH-сенсоры в биоимиджинге живых объектов, таких как живые клетки и ткани [2]. Однако кинетические характеристики и рабочий диапазон сенсоров, сконструированных на основе геномных iM, уступают искусственно синтезированным последовательностям. Пример искусственного iM серии C5T1 (X-CCCCCCTCCCCCCTCCCCCCTCCCCC-Y, где X и Y – это донорно-акцепторная пара флуорофоров) является удачной основой для создания быстрого биосовместимого сенсора.

Донорно-акцепторная пара на основании FRET-эффекта при изменении конформации iM позволяет детектировать его состояние и определять по нему pH среды. И целью данной работы была оптимизация структуры iM для создания на его основе биосовместимого pH-сенсора. При введении в петли модельных iM модификаций, аналогично как и в iM из SHANK1, улучшаются кинетические характеристики сенсоров серии C5T1. Однако более эффективной модификацией является замена всех Т в последовательности на алкильные линкеры.

Калибровка сенсоров производилась на линии клеток A549 и показала, что сенсоры образуют конденсаты в ядрах клеток. Работоспособность сенсоров была проверена с модельным краудинг-агентом – PEG, влияние которого на характеристики сенсора не велико, так как iM сохраняет способность менять конформацию, что делает его применимым для измерения pH в ядрах.

1. Петрунина Н.А., Лебедев В.В., Кириллова Ю.Г., Аралов А.В., Варижук А.М., Сардушкин М.В. Интеркалированные мотивы ДНК с нуклеозидными вставками // *Биоорганическая химия (Russian Journal of Bioorganic Chemistry)*. - 2021. - Т. 47, № 6. - Стр. 837-840.
2. Turaev A.V., Isaakova E.A., Severov V.V., Bogomazova A.N., Zatsepin T.S., *др. всего 10 человек*. Genomic DNA i-motifs as fast sensors responsive to near-physiological pH microchanges // *Biosensors & Bioelectronics*. - 2021. - V. 175. - P 112864.

Нековалентные конструкции на основе наночастиц золота и нуклеиновых кислот – принципы сборки, проблемы и перспективы использования

Пышная И.А.¹, Епанчинцева А.В.¹, Довыденко И.С.¹, Воробьев П.Е.¹,
Рябчикова Е.И.¹, Пышный Д.В.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

Терапевтические препараты и диагностические зонды (белки и/или нуклеиновые кислоты), связанные с различными носителями, уже нашли свое место для фундаментальных исследований и практических приложений. Присоединение к поверхности носителя этих соединений, как правило, осуществляют ковалентно с помощью нерасщепляемого или стимул-чувствительного линкера. Этот метод обеспечивает контролируемое количество вещества (емкость) на поверхности. Нековалентную сорбцию соединений, неизбежно сопровождающую ковалентный процесс, ранее считали недостатком и старались ее нивелировать. При этом есть работы, демонстрирующие перспективность конструкций, собранных на основе нековалентной сорбции. Используя уникальные свойства наночастиц золота и нуклеиновых кислот (НК), не содержащих линкеры, мы систематически исследовали возможность получения нековалентных конструкций.

Все этапы сборки и очистки нековалентных конструкций контролировали методами гель-электрофореза, спектроскопии оптического поглощения, динамического рассеяния света и просвечивающей электронной микроскопии. Нами выявлены факторы и проблемы, влияющие на эффективность сборки нековалентных конструкций, их коллоидную стабильность и, таким образом, на качество полученных наноконструкций. Показано, что, варьируя длину и природу нуклеиновой кислоты (ДНК, РНК), ее вторичную структуру (одно- и двуцепочечные НК, нависания в составе дуплексов), наличие флуоресцентных остатков в ее составе, возможно получить нековалентные конструкции с заранее заданными емкостными нагрузками (по нуклеиновой кислоте). Продемонстрировано использование этих нековалентных конструкций как ко́ра для сборки многоуровневых носителей.

Исследование поддержано грантом РФ № 22-15-00228 «Разработка метода определения состава белковой короны на липидных наночастицах при инкубации с сывороткой крови».

Разработка новых подходов для диагностики на основе изотермической амплификации, CRISPR-Cas системы и мембранных тестов

Сафенкова И.В.¹, Иванов А.В.¹, Буркин К.М.¹, Жердев А.В.¹, Дзантиев Б.Б.¹

¹ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Биосенсорные системы, обладающие высокой чувствительностью, востребованы во многих сферах, включая медицину, сельское хозяйство, пищевую промышленность. Эффективными инструментами для повышения чувствительности детекции РНК/ДНК-содержащих аналитов являются изотермические амплификации и CRISPR-Cas системы. Простое, экспрессное и бесприборное выявление генерируемых при этом продуктов может быть обеспечено с помощью иммунохроматографических тест-систем (ИХТС). В докладе представлены результаты применения сочетания рекомбиназной полимеразной амплификации (РПА), CRISPR-Cas12a и ИХТС для детекции фитопатогенов (вирус мозаики люцерны, X-вирус картофеля, вириод веретеновидности клубней картофеля, *Dickeya solani*).

РПА проводили с использованием одной пары праймеров с биотиновой и флуоресцеиновой метками на 5'-концах и коммерческой смеси ферментов TwistDx, получая гомогенный продукт в виде дцДНК (ампликона) с метками на противоположных концах, специфично распознаваемыми на тест-полоске. Мы сравнили два подхода, отличающиеся способом введения меток с ампликоны: с использованием только меченых праймеров и с дополнительными компонентами – эндонуклеаза pfo и олигонуклеотидный зонд с тетрагидрофурановым основанием в центральной части, меткой на 5'-конце и блокирующей 3'-фосфатной группой. Установлено, что для первого, более простого подхода чувствительность диагностики на два порядка выше при сохранении селективности.

Для повышения специфичности и чувствительности детекции использовали РНК-зависимую эндонуклеазу LbCas12a. Комплекс гидовой РНК с Cas12a селективно распознает дцДНК-ампликоны и расщепляет их, после чего приобретает транс-эндонуклеазную активность в отношении любых оцДНК. Для регистрации каталитической активности Cas12a был проведен дизайн и синтез ДНК-зондов, иммобилизуемых на поверхности носителя. ДНК-зонд включал оцДНК с меткой на конце (15-dT-флуоресцеин) и дцДНК для отдаления сайта расщепления от поверхности. Длину дцДНК варьировали от 0 до 1000 п.о.; оптимум составил 160-300 п.о. для микропланшета и 80-300 п.о. для магнитных частиц-носителей.

Предложенные подходы увеличивают чувствительность и специфичность диагностики и могут быть использованы в тест-системах для детекции различных РНК/ДНК-содержащих патогенов.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения №075-15-2022-318 от 20.04.2022 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Особенности применения наноматериалов, содержащие квантовые точки, в медицине

Туманов Ю.В.¹, Гладышев П.П.², Грибова Е.Д.²

¹ Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Роспотребнадзора, Новосибирск, Россия

² Государственный университет «Дубна», г. Дубна, Россия

В последние десятилетия наноразмерные системы квантовых точек привлекли огромное внимание благодаря своим уникальным электрооптическим свойствам. Они оказали значительное влияние на исследования в области физических, химических и биологических наук, в различных областях клинической диагностики и медицины в качестве флуоресцентных меток и фотосенсибилизаторов в составе лекарств, для фототермической и фотодинамической терапии онкологических заболеваний. Спектральный диапазон излучения квантовых точек охватывает ультрафиолетовое и инфракрасное излучение и может регулироваться путем изменения размера, формы и состава квантовых точек (КТ). Кроме того, отличная фотостабильность КТ (в 100-1000 раз выше, чем у органических красителей или флуоресцентных меток), позволяет отслеживать отдельные вирусы в течение нескольких часов с высоким временным разрешением [1,2]. Применение квантовых точек (КТ) с разными спектральными характеристиками дает возможность одновременной специфической визуализации нескольких белков, достижение высокой чувствительности метода. Квантовые точки обладают превосходными оптическими свойствами, которые используются в биологических системах визуализации, таких как *in vitro* и *in vivo*, при исследованиях на моделях животных. Использование наноконструкций КТ с другими наноматериалами на основе углерода или графена позволило разработать новые системы для биовизуализации, терапевтической доставки, оптогенетики и тераностики. Определение минимально инвазивных биомаркеров, способных обнаруживать злокачественные новообразования на ранней стадии на основе квантовых точек, может быть полезным для снижения уровня заболевания [3].

1. Gladyshev P. P., Tumanov Y. V., S. A. Ibragimova, V. V. Kouznetsov, E. D. Gribova. "Quantum dots in proteomic studies and medical diagnostics" // *Russian Chemical Bulletin*. – 2018. – V. 67(4). – P. 600–613.
2. Liu S.-L., Wang Z.-G., Xie H.-Y., Liu An-An., Lamb D. C., Pang D.-W. *Single-Virus Tracking: From Imaging Methodologies to Virological Applications* // *Chem. Rev.* – 2020. – V. 120. – P. 1936–1979.
3. Chen L. L., Zhao L., Wang Z. G., Liu S. L., Pang D. W. *Near-Infrared-II Quantum Dots for In Vivo Imaging and Cancer Therapy* // *Small*. – 2021. – P. e2104567.

Системы для ПЦР диагностики, мультимодального биоимаджинга и тераностики опухолей

Чубаров А.С.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия

Многие исследователи на данный момент склоняются к необходимости использованию малоинвазивных методов диагностики. Магнитно-резонансная томография (МРТ) является малоинвазивным методом, обладающим неограниченной глубиной диагностики и высоким разрешением. Для визуализации патологических очагов часто используются различные контрастирующие агенты. В настоящей работе использованы новые подходы получения контрастных препаратов для ^{19}F - и ^1H -МРТ, не содержащих токсичных ионов тяжелых металлов. В качестве транспортной молекулы был использован человеческий сывороточный альбумин (HSA). Выбор HSA обусловлен биосовместимостью и способностью накапливаться в различных типах опухолей за счет пассивного транспорта или путем связывания с рецепторами. Для присоединения магнитно-резонансных меток к белку использован подход, основанный на посттрансляционной модификации альбумина – его N-гомоцистеинилировании. Использование N-замещённого тиолактона гомоцистеина в качестве ацилирующего агента позволяет сайт-специфически модифицировать HSA, не вредя его структуре. Для получения мультимодального зонда как для пред-, так и интраоперационной диагностики к белку альбумину был также присоединен краситель ИК-диапазона Cy7. Исследования с помощью флуоресцентной томографии в процессе операции позволяют точно определить границы опухоли, что чрезвычайно актуально, например, в случае опухолей головного мозга. Применение мультимодальных зондов в качестве контрастного агента было продемонстрировано в экспериментах на мышцах с опухолью головного мозга (глиома U87 человека). Свойства полученных зондов позволило в дальнейшем создать на их платформе уникальную платформу для тераностики.

Синтетические олигонуклеотиды в настоящее время нашли широкое применение в ПЦР-диагностике. В ИХБФМ СО РАН был разработан новый класс олигонуклеотидов – фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО). ФГ-модификация представляет собой незаряженный органический остаток в межнуклеотидном фосфодиэфирном фрагменте. Присутствие такого остатка в тесном сайте взаимодействия ДНК/фермента влияет на эффективность и селективность ферментативной реакции. Было показано, что включение одной ФГ-модификации в праймеры приводит к идентификации одиночных мутаций с помощью метода аллель-специфичной ПЦР с хорошей специфичностью и чувствительностью на фоне ДНК дикого типа для обнаружения мутаций KRAS. Продемонстрирована возможность определения 0,1% мутации на уровне 20 копий мутантной ДНК в экспериментах на плаزمидах. Показано, возможность использования праймеров, модифицированных 3 ФГ-модификациями в методе блокирующей аллель-специфичной ПЦР. Использование блокера, имеющего большее сродство к ДНК дикого типа, привело к возможности детекции 0,1-0,01% мутантной ДНК.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 22-24-00996.

ОНКОЛИТИЧЕСКИЕ ВИРУСЫ И ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ

Противоопухолевая эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении иммунокомпетентной модели глиомы С6 крысы

Васильева Н.С.^{1,2}, Агеенко А.Б.¹, Юсубалиева Г.М.³, Кулигина Е.В.^{1,2}, Рихтер В.А.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

² ООО Онкостар, Новосибирск, Россия

³ Федеральный научно-клинический центр ФМБА России, Москва, Россия

Для изучения развития опухолевого процесса у человека было разработано множество экспериментальных моделей. Они используются для исследования факторов, участвующих в злокачественной трансформации, инвазии и метастазировании, а также для изучения ответа на терапию. Особой популярностью пользуется ксенотрансплантат опухоли человека. В этой модели опухолевые клетки человека трансплантируют либо под кожу, либо ортотопически в орган-мишень мышам с ослабленным иммунитетом, например, SCID.

При исследовании противоопухолевых свойств онколитических вирусов (ОВ) подобные модели имеют ряд ограничений. Известно, что ОВ обеспечивают специфическую репликацию в опухолевых клетках и индуцируют их гибель, не затрагивая нормальные клетки. Однако, современные данные свидетельствуют, что ОВ индуцируют адаптивные иммунные ответы, косвенно способствующих гибели опухолевых клеток, во-вторых, способны вызывать тромбоз сосудов опухоли путем избирательного инфицирования эндотелиальных клеток в микроокружении опухоли. Таким образом, для исследования таких отличительных свойств ОВ необходима сингенная ортотопическая модель глиобластомы.

Для решения поставленных задач была выбрана глиома С6 крысы. Линия была разработана в конце 1960-ых годов при многократном введении N-нитрозо-N-метилмочевины взрослым крысам линии Wistar–Furth. Глиома С6 крысы имеет большое сходство с человеческой глиобластомой по клеточной морфологии, экспрессии специфических белковых маркеров и наличием схожих мутаций.

В данной работе мы показали, что онколитический вирус осповакцины VV-GMCSF-Lact обладает высокой цитотоксической активностью в отношении клеток глиомы С6 крысы *in vitro*. В эксперименте *in vivo* эффективность цитотоксического действия VV-GMCSF-Lact на глиому С6 при внутривенном и внутриопухолевом введении оценивали методом динамического МРТ с применением контрастного вещества, гистологической оценки опухолевой инвазии, выживаемость по методу Каплан-Майера. Было отмечено изменение характера роста глиомы, снижение объемов опухолей по сравнению с контрольной группой, увеличилась продолжительность жизни. В зависимости от способа введения VV-GMCSF-Lact, наблюдали различной выраженности побочные эффекты как у экспериментальных, так у интактных животных.

Таким образом, онколитический вирус VV-GMCSF-Lact, независимо от способа введения, проявляет противоопухолевое свойство *in vivo*. Для достижения эффективной противоопухолевой эффективности со снижением количества побочных эффектов необходима коррекция дозы препарата и/или разработка новых схем комбинированной терапии.

Аденоассоциированные вирусные векторы для доставки генов в клетки жировой ткани

Егоров А.Д.¹

¹ Центр трансляционной медицины, Университет «Сириус», ФТ Сириус, Россия

Ожирение диагностируется более чем у полумиллиарда людей и, являясь предвестником сахарного диабета 2-го типа, напрямую влияет на преждевременную смертность в этой группе.

Показано, что наличие бурой жировой ткани обратно коррелирует с кардиометаболическими заболеваниями.

Активация программы бурового адипогенеза в белой жировой ткани приводит к появлению «бежевых» адипоцитов, в которых происходит интенсивный липолиз и термогенез (Seale et al., 2011). С использованием метода ультразвукового микропузырькового разрушения было показано, что доставка «генного коктейля» BMP7/PRDM16/PGC-1a в скелетно-мышечную ткань вызывает эктопическую экспрессию UCP1 (Chen et al., 2018).

Ранее был определён серотип AAV, обеспечивающего тканеспецифичную доставку генов в жировую ткань (Jimenez et al., 2013). Кроме того, доставка гена лептина с помощью AAV с капсидом 8 серотипа с использованием тканеспецифичного промотора адипонектина и miRNA-122 нокаутным мышам ob/ob позволила достичь терапевтических эффектов (O'Neill et al., 2014).

Использование тканеспецифичного AAV 8 серотипа позволит обеспечить доставку генов оптогенетических модулей с транскрипционными регуляторами для локальной активации термогенеза и трансдифференцировки в бежевый жир.

1. Seale P, Conroe HM, Estall J et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest.* 2011 Jan;121(1):96-105.
2. Chen, S., Bastarrachea, R.A., Shen, JS. et al. Ectopic BAT mUCP-1 overexpression in SKM by delivering a BMP7/PRDM16/PGC-1a gene cocktail or single PRMD16 using non-viral UTMD gene therapy. *Gene Therapy* 25, 497–509 (2018). doi: 10.1038/s41434-018-0036-5
3. Jimenez V, Muñoz S, Casana E et al. In vivo adeno-associated viral vector-mediated genetic engineering of white and brown adipose tissue in adult mice. *Diabetes.* 2013 Dec;62(12):4012-22. doi: 10.2337/db13-0311.
4. O'Neill SM, Hinkle C, Chen SJ et al. Targeting adipose tissue via systemic gene therapy. *Gene Therapy.* 21(7):653-61 (2014). doi: 10.1038/gt.2014.38.

Исследование было поддержано грантом РФФИ №22-14-20046.

Конструирование новых аттенуированных штаммов аденовируса серотипа 6

Забелина Д.С., Осипов И.Д., Романенко М.В., Нетёсов С.В.

Новосибирский государственный университет

Нами была разработан и оптимизирован метод получения плазмидных векторов, содержащих начало генома аденовируса серотипа 6, а также метод внесения модификаций в этот геном, затрагивающих раннюю область генов E1. Для дальнейшего конструирования аттенуированных штаммов аденовируса серотипа 6 были получены шаттл-плазмиды, одна из которых содержит делецию 24 п.н. в раннем вирусном гене E1A, а другая — полную делецию области E1.

В настоящее время большинство аденовирусных препаратов конструируют на основе широко распространенного аденовируса серотипа 5 (Ad5). Несмотря на свою доступность, Ad5 имеет ряд существенных недостатков, из-за чего есть потребность в поиске эффективных альтернатив. Таковой является аденовирус серотипа 6 (Ad6). Геном Ad6 обладает высокой степенью гомологии с Ad5, а сам вирус намного меньше распространен в человеческой популяции. Существуют различные подходы к модификации аденовирусного генома для дальнейшего использования вируса в качестве векторной вакцины или основы для онколитических препаратов. Полная делеция области ранних генов E1 делает вирус полностью неспособным к репликации и безопасным для применения в качестве вектора для генной терапии или вакцины. В свою очередь онколитическим вирусам необходима репликация для эффективного лизиса клеток. Делеция 24 п.н. в раннем гене E1A позволяет сохранить способность вируса к размножению, ограничив его специфичность опухолевыми клетками.

Методом рестрикции-лигирования в классическую плазмиду pBR322 нами был внесен начальный участок генома Ad6, содержащий ранний ген E1A. Используя праймеры, фланкирующие участок длиной 24 п.н., была внесена делеция во встроенный ген. При помощи набора для гомологичной рекомбинации In-Fusion (Takara Bio, Япония) к полученной плазмидной ДНК был добавлен следующий участок аденовирусного генома длиной 9162 п.н. Таким образом, мы получили рекомбинантную плазмиду pBRAd15k-delta24 длиной 15 тыс. п.н.

На основе pBRAd15k-delta24 было решено получить альтернативный вариант, содержащий полную делецию области ранних генов E1. Для этого использовали пару праймеров, фланкирующих всю область E1 (~2 тыс. п.н.). В данном случае к праймерам были добавлены комплементарные хвосты. Таким образом, при проведении рекомбинации набором In-Fusion линейаризованный вектор зацкливался сам на себя, образуя целевую конструкцию pBRAd15k-dE1. Соответствие всех полученных конструкций теоретической картине было проверено методами рестрикционного анализа и секвенирования по Сенгеру.

Таким образом, нами были получены две шаттл-плазмиды, содержащие начальный участок генома Ad6 — pBRAd15k-delta24 и pBRAd15k-dE1. В дальнейшем вариант с делецией 24 п.н. будет использован в качестве основы для получения вируса с опухоле-специфичной репликацией, а dE1 — основой нереплицирующегося вируса, пригодного для получения векторных вакцин.

Векторная система для генотерапии на основе онколитического вируса Сендай

Зайнутдинов С.С.¹, Сиволобова Г.Ф.¹, Гражданцева А.А.¹, Кочнева Г.В.¹

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово, Россия

Вирус Сендай является парамиксовирусом мышей, непатогенен для человека, но способен размножаться и лизировать опухолевые клетки человека, не повреждая нормальные ткани. Мы работаем с российским штаммом Москва вируса Сендай, который в доклинических исследованиях, а также в ряде случайных клинических исследований в России продемонстрировал хороший противоопухолевый потенциал [1].

Вирус Сендай обладает высокой вариабельностью генома при культивировании *in vitro*, что существенно влияет на его онколитическую активность. Нами была определена структура генома штамма Москва вируса Сендай, обладающего наибольшей онколитической активностью (GenBank: KP717417.1). Эта последовательность легла в основу создания векторной системы для оживления онколитического штамма Москва вируса Сендай, а также для создания его рекомбинантных вариантов для генотерапии опухолей и для других целей.

Векторная система включает три рекомбинантных плазмидных ДНК, экспрессирующих гены *N*, *P* и *L* вируса Сендай штамма Москва, и плазмиду с полноразмерной ДНК-копией его геномной РНК. Экспрессия генов *N*, *P* и *L* является необходимым условием оживления рекомбинантных вариантов вируса: они кодируют белки репликативного комплекса, который синтезирует геномную РНК, используя в качестве матрицы плазмиду, содержащую её полноразмерную ДНК-копию.

Для встройки и экспрессии трансенов в геномную плазмиду между генами *P* и *M* был введён структурный элемент, включающий полилинкер из пяти уникальных сайтов для крупнощеплящих эндонуклеаз рестрикции BsiW I, Nru I, Cla I, Asc I, BssH II, за которым следует сигнал терминирования транскрипции трансгена и сигнал реинициации транскрипции последующего гена (*M*) для РНК-полимеразы вируса Сендай. Экспрессия генов *N*, *P* и *L* вируса Сендай штамма Москва так же, как и синтез геномных РНК рекомбинантных штаммов вируса Сендай, осуществляется с соответствующих плазмидных ДНК под контролем промотора РНК-полимеразы фага Т7 в культуре клеток почки эмбриона человека 293Т7, постоянно продуцирующих РНК-полимеразу фага Т7. Точность размера геномной РНК контролируется рибозимами, находящимися на её 3'- и 5'-концах. Проверка работоспособности полученной векторной системы была проведена на примере модельного трансгена зелёного флюоресцентного белка EGFP.

1. Матвеева О. В., Кочнева Г. В., Зайнутдинов С. С., Ильинская Г. В., Чумаков П. М. Онколитические парамиксовирусы: механизм действия, доклинические и клинические исследования. // Молекулярная биология. – 2018. – Т. 52. – № 3. – С. 360–379

Работа выполнена в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора ГЗ-37/21.

Клинические исследования противоопухолевого лекарственного препарата на основе рекомбинантного вируса осповакцины

Кулигина Е.В.^{1,2}, Рихтер В.А.¹, Коваль О.А.¹, Кочнева Г.В.³

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

² *ООО Онкостар, Сколково, Москва, Россия*

³ *ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия*

Противоопухолевый лекарственный препарат на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины, разработанный коллективом авторов ИХБФМ СО РАН и ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора успешно прошел доклинические исследования в 2017 – 2019 гг. Препарат показал высокую противоопухолевую эффективность в отношении опухолей молочной железы человека, в том числе трижды негативных, низкую общую и специфическую токсичность.

В период 2019–2021 гг ООО «Онкостар» - компания, организованная для коммерциализации разработанного препарата, занималась подготовкой клинических исследований VV-GMCSF-Lact. Разрешение Минздрава РФ на проведение первой фазы клинических испытаний по Протоколу Oncolact2020 «Открытое мультикогортное исследование I фазы безопасности, переносимости и фармакокинетики лекарственного препарата на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины, раствор для инъекций, замороженный, у пациенток с рецидивирующим и/или рефрактерным метастатическим раком молочной железы в последовательных когортах с эскалацией дозы при однократном и многократном введении» было получено 26 ноября 2021 г.

Клинической базой для проведения исследований является НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России, г. Санкт-Петербург. Открытие Клинического центра состоялось 13 апреля 2022 г.

Основные задачи исследования:

Исследование проводится в два этапа.

Этап 1, однократное введение: Лекарственный препарат будет применяться интратуморально однократно в дизайне «3+3» в дозах от 107 до 108 БОЕ. МПД будет считаться дозой, более низкая изученная по отношению к дозе, на которой была определена дозолимитирующая токсичность.

Этап 2, многократное введение: Лекарственный препарат будет применяться интратуморально 1 раз в неделю в течение 4 недель в 3 дозах, определенных по результатам этапа 1: максимальная переносимая доза (МПД) и 2 более низкие дозы.

Ход исследований и первые полученные результаты будут представлены в докладе.

ОНКОЛИТИЧЕСКИЕ ВИРУСЫ: НОВЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ

Нетёсов С.В.¹, Осипов И.Д.^{1,2}, Г.В.Кочнева²

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

² ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия

e-mail: svn15@hotmail.com

Обновлен перечень новых онколитических вирусных штаммов, допущенных для клинических испытаний. Представлено состояние дел с разработками в области онколитических вирусов в 2022 году и информация о перспективных направлениях разработок по этому направлению в разных странах.

Ключевые слова: виротерапия рака, онколитические вирусы, генная терапия, вирусная терапия рака

Бактерии и другие микроорганизмы, способные селективно и эффективно лизировать опухолевые клетки, долгое время были мечтами врачей-онкологов, поскольку еще в начале 20 века были отмечены случаи исчезновения опухолей после инфекционных заболеваний или вакцинаций. Однако, из-за непредсказуемой в то время эффективности такого лечения, невыясненных до конца причин образования и развития опухолей и отсутствия до недавнего времени методов получения специально сконструированных для этих целей рекомбинантных вирусов данный подход начал целенаправленно развиваться лишь в конце 90-х годов XX века. Но уже к 2007 году в КНР к массовому применению для лечения рака были разрешены два рекомбинантных штамма аденовируса 5 серотипа Онкорин и Гендицин. В свою очередь в США в течение последних 30 лет были проведены более 200 клинических испытаний различных онколитических вирусов, и в результате в 2015 году в США впервые в истории Управлением по контролю лекарств и пищи (FDA) было разрешено широкое клиническое использование рекомбинантного, специально аттенуированного штамма герпес-вируса (Имлиджик, Imlygic) для лечения меланомы и клинические испытания 3 фазы противоракового препарата на основе рекомбинантного штамма вируса осповакцины (Реха-Vec). Не только в США, но и в других странах проводятся также расширенные клинические испытания с использованием рекомбинантных штаммов парамиксовирусов, реовирусов, аденовирусов и энтеровирусов. В России в 2007 году в РОНЦ им. Н.Н.Блохина были относительно успешно проведены клинические испытания 1 фазы онколитического рекомбинантного аденовируса 1 поколения, но средств на 2 фазу найти в то время не удалось.

Это новое направление активно развивается не только в США, но и в Японии, Германии, Китае, Финляндии. Там в том числе развернулись широкие клинические испытания таких вирусов с одобрением на уровне государственных органов здравоохранения. Аналогичные разработки сейчас начинают реализовываться в Москве в Институте молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, в Новосибирском государственном университете, ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» и Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а также в Санкт-Петербурге, где начинают проводиться доклинические и клинические испытания разрабатываемых препаратов.

Single cell-технологии: от единичной клетки до производства

Сердюков Ю.А.

ООО «БИОГЕН-АНАЛИТИКА»

Автоматический отбор одной живой клетки или целевой культуры клеток – тонкая операция, зачастую определяющая успех всего исследования. Автоматизация процесса работы с клетками и клеточными культурами (сканирование клеток, сканирование колоний, сбор клеток, сбор клеточных колоний, перенос клеток, перенос клеточных колоний и т.д.) в сочетании с возможностями наблюдения и анализа в режиме реального времени позволяет легко обнаруживать, отбирать и выращивать целевые культуры без повреждения клеток, включая стволовые клетки.

Разработка лекарственной формы онколитического препарата на основе природного штамма вируса болезни Ньюкасла с оценкой противоопухолевых свойств

Юрченко К.С.¹, Трашков А.П.², Адаменко Л.С.¹, Гуляева М.А.^{1,3}, Шестопапов А.М.¹

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», НИИ Вирусологии, Новосибирск, Россия

² ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

³ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Онколитические вирусы (ОВ) представляют большой класс природных и генетически модифицированных агентов, которые способствуют регрессии опухоли путем репликации в опухолевых клетках, индукции иммуногенной гибели клеток и стимуляции противоопухолевого иммунитета. Штамм вируса болезни Ньюкасла (ВБН) NDV/Altai/pigeon/770/2011, выделенный нами из природного резервуара, демонстрирует онколитические свойства по результатам клеточных исследований на широкой панели перевиваемых опухолевых линий человека. Вивальные работы на животных с различными экспериментальными опухолями (сингенные опухоли: Кребс-2, меланома В16, карцинома Льюиса, и ксенографты: НМРК человека и глиома С6) демонстрируют противоопухолевый эффект ВБН при интратуморальной и внутривенной терапии. Последние исследования при внутривенной терапии сингенной аденокарциномы толстой кишки СТ26 и эктопическисубкутанно трансплантированной и органотопическиинтракраниальной глиомы С6 вирус-содержащим препаратом оказались эффективной, а степень терапевтического воздействия ОВ-терапии была сопоставимой по всем основным показателям с группами животных, получавших стандартное лечение циклофосфамидом.

Доклинические исследования выявляют новые штаммы ДНК- и РНК-вирусы в качестве потенциальных кандидатов для разработки лекарств. Однако не существует стандартного метода отбора ОВ, поскольку некоторые вирусы проявляют естественный тропизм к опухолевым клеткам, а другие демонстрируют репликацию только после генетической модификации. Также обсуждаются многочисленные механизмы действия ОВ и выбор оптимального способа доставки вируса - в первоначальных исследованиях использовались преимущественно внутриопухолевые инъекции с целью прямой доставки вируса в опухолевый узел, но для ряда труднодоступных опухолей данный метод малоэффективен. Внутривенное введение больше подходит для виротерапии множественных метастатических поражений, но может быть ограничено быстрым разведением в кровотоке и нейтрализацией противовирусными антителами и сывороточными белками. Таким образом, ряд критериев, такие как, дозы и схемы вирусных инъекций, комбинирование ОВ с другими препаратами, выбор пациентов и типов опухолей, являются весьма противоречивыми и требуют дальнейшего изучения и стандартизации.

Исследование выполнено при финансовой поддержке по договору с ООО «ТПК Промтехдепо».

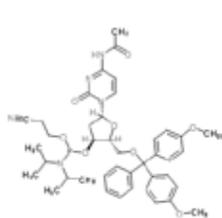
**СИМПОЗИУМ
«30 ЛЕТ КОМПАНИИ «БИОСАН».
РОССИЙСКАЯ РЕАГЕНТНАЯ БАЗА
ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ»**

Организация отечественного производства мономеров олигонуклеотидного синтеза

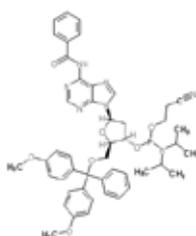
Криворотов Д.В., Абзианидзе В.В., Захаренкова С.А., Челуснова Ю.В., Радилов А.С.

ФГУП НИИ «Гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России,
Санкт-Петербург, Россия

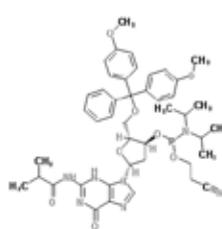
Олигонуклеотиды применяют в разработке методов ПЦР-диагностики и разнообразных генетических исследованиях. Основой автоматизированного синтеза олигонуклеотидов выступает амидофосфитный метод, основанный на использовании в качестве мономеров амидофосфитов (фосфорамидитов) – производных дезоксирибонуклеозидов: дезоксиаденозина, дезоксицитидина, дезоксигуанозина, дезокситимидин (dA, dC, dG, dT).



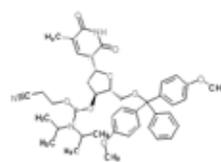
DMT-dC(ac)
фосфорамидит



DMT-dA(bz)
фосфорамидит



DMT-dG(ib)
фосфорамидит



DMT-dT
фосфорамидит

На сегодняшний день, фосфорорганические мономеры для синтеза олигонуклеотидных праймеров не производятся в Российской Федерации, тогда как спрос на синтез олигонуклеотидов, в том числе с применением синтезаторов отечественного производства, весьма велик.

ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России в инициативном порядке разрабатывает технологи малотоннажного химического синтеза 4-х основных нуклеозидных фосфорамидитов, включающие постановку защитных групп, синтез фосфорорганического интермедиата и получение целевых продуктов. Контроль качества готовых фосфорамидитов базируется на методах ядерного магнитного резонанса на ядрах ^1H и ^{31}P в совокупности с хроматографическими методами, обеспечивающими выпускающий контроль по показателям «подлинность» и «количественное содержание». В соответствии с требованиями ТР ТС 041/2017 «О безопасности химической продукции» на полученную химическую продукцию разрабатываются комплекты технологической и нормативной документации для обеспечения государственной регистрации и серийного выпуска.

Число лабораторий и производств, занимающихся синтезом олигонуклеотидов в РФ и странах Таможенного союза, можно оценить в несколько сотен, что определяет суммарную потребность в нуклеозидных фосфорамидитах на уровне 30-50 кг/год. Действующая во ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России технологическая платформа производства малотоннажных химических продуктов имеет необходимые возможности для обеспечения разработки промышленной технологии и серийного производства данной продукции. В соответствии с постановлением Правительства Российской Федерации от 12.12.2019 № 1649 «Об утверждении Правил предоставления субсидий из федерального бюджета российским организациям на компенсацию части затрат на проведение

научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ по современным технологиям в рамках реализации такими организациями инновационных проектов..» поданы предложения для формирования «Перечня современных технологий в целях проведения конкурса для предоставления субсидий на НИОКР». Рост спроса на базовые нуклеозиды простимулирует развитие биотехнологий их промышленного производства, обеспечивая аддитивный эффект для экономики и развитие Российской реагентной базы для генетических технологий.

Создание высококонкурентной реагентной базы для диагностики в рамках импортозамещения

Науменко О.Б.¹, Лосев М.В.²

¹ ООО «МБС-Технология», Новосибирск, Россия

² ООО «Медико-биологический Союз», Новосибирск, Россия

За 8 лет санкций, лишивших возможности вести деловые отношения с партнерами из Евросоюза, США и ряда других государств в России реализовано более 1,5 тысяч проектов по созданию аналогов продукции, которая ранее поставлялась из-за рубежа. Стратегией развития ГК «Медико-биологический Союз» всегда было создание собственной реагентной базы для обеспечения автономного производства диагностических тест-систем. В докладе будут обсуждаться успехи и сложности реализации производства широкой линейки ферментов для молекулярной диагностики, включающей в себя полимеразы, ревертазы, эндонуклеазы, лигазы, транспозазы, а также ферменты, необходимые для пробоподготовки библиотек для NGS секвенирования. Будут освещаться аспекты разработки методики получения флавинадениндинуклеотид глюкозодегидрогеназы (ФАД-ГДГ), необходимой для производства тест-полосок для глюкометров.

СИСТЕМЫ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ И ТЕХНОЛОГИИ УПРАВЛЕНИЯ ГЕНОМОМ

Система на основе ДНК-матриц, содержащих искусственные нуклеотиды, для контролируемой экспрессии терапевтических белков

Алкалаева Е.З.¹, Колосов П.М.², Шувалова Е.Ю.¹, Шувалов А.В.¹, Егорова Т.В.¹, Мукба С.А.¹, Бизяев Н.С.¹, Пустогаров Н.А.¹, Пантелеев Д.Ю.², Власов П.К.³

¹ *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия*

² *Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, Москва, Россия*

³ *Институт науки и технологий, Вена, Австрия*

Вирусная терапия заболеваний подразумевает создание векторов на основе вирусных, кодирующих и экспрессирующих терапевтические белки в определенных тканях и в опухолевых клетках. Из-за вирусного характера доставки генетического материала такая терапия имеет серьезные ограничения. Прежде всего они связаны с риском неконтролируемой репликации вируса и преждевременной экспрессии терапевтических белков. Данная работа была посвящена разработке искусственной генетической системы, позволяющей экспрессировать специфические белки в клетках-мишенях, но не способной реплицироваться в них, что обеспечит защиту организма от побочных эффектов генной терапии, вызываемых терапевтическими вирусами. Эта система включает в себя репортерный ген, несущий искусственные нуклеотиды, и мутантную РНК полимеразу, способную читать искусственные нуклеотиды в генах и транскрибировать их в природную мРНК. Такая генетическая конструкция не способна реплицироваться, а гены в ней транскрибироваться клеточными ДНК и РНК полимеразами. То есть ее существование полностью контролируемо. Для этого на основе сопряженной бесклеточной системы трансляции в экстракте зародышей пшеницы нами была разработана система быстрого анализа активности мутантных РНК полимераз. Далее, было проведено моделирование 32000 комплексов мутантных T7 РНК полимераз (T7 RNAP) с матрицами несущими ненатуральные нуклеотиды. В результате для дальнейшего мутагенеза было выбрано 147 вариантов фермента. На основе литературных данных было выбрано еще 28 мутантных вариантов. После нескольких раундов сайт-направленного мутагенеза было получено 175 мутантных T7 RNAP. Активность этих белков была проанализирована в разработанной ранее сопряженной системе трансляции как на натуральной ДНК матрице, так и на 8 матрицах, содержащих разные пары ненатуральных нуклеотидов. В результате были выявлены мутанты способные эффективно синтезировать РНК *in vitro* на матрицах, несущих ненатуральные нуклеотиды. Помимо этого, нами продемонстрирована принципиальная работоспособность разработанной системы на матрицах несущих ненатуральные нуклеотиды в культуре клеток. В будущем разработанная система позволит создавать «одноразовые» вирусы, с подавленной способностью к репликации и преждевременной экспрессии терапевтических белков. Это решит проблему биобезопасности вирусной терапии и откроет широчайшие возможности модуляции синтеза терапевтических белков.

Исследование было поддержано грантом РФФИ № 18-29-08044.

CRISPR-активация цитидин-дезаминаз APOBEC: безопасность и противовирусное действие

Брезгин С.А.^{1,2}, Костюшева А.П.¹, Пономарёва Н.И.^{1,2}, Лукашёв А.Н.¹,
Чуланов В.П.^{1,2,3}, Костюшев Д.С.^{1,2}.

¹ *Институт медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет)*

² *Научно-технологический университет «Сириус»*

³ *Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний Министерства здравоохранения России, Москва, Россия*

Введение: ежегодно от исходов хронического гепатита В (ХГВ) в мире погибает более 1 млн человек. Современные противовирусные препараты подавляют репликацию вируса гепатита В (ВГВ), но не способны элиминировать персистентную форму генома вируса (ккзДНК). Одним из перспективных методов разрушения ккзДНК является активация экспрессии генов с противовирусной активностью, таких как цитидин-дезаминазы APOBEC.

Цель: активировать экспрессию генов APOBEC с помощью систем CRISPR-активации (CRISPRa). Оценить противовирусное действие систем на модели ВГВ in vitro.

Материалы и методы: Эксперименты проводились на модели ко-трансфекции клеток HepG2 рекомбинантной ккзДНК ВГВ и рибонуклеопротеиновыми (РНП) комплексами dCas9-p300 с РНК-проводниками к промоторам APOBEC3A, APOBEC3B и контрольным РНК-проводником либо аттенуированными (ослабленными) РНК-проводниками. Анализ противовирусного действия проводили методом ПЦР-РВ (прегеномная РНК ВГВ, ккзДНК) и ИФА (HBsAg). Анализ целевого дезаминирования ккзДНК и внецелевого дезаминирования генома (гены ARID1, ARID2, TP53, PAX5, MLL) проводили методом 3Д-ПЦР.

Результаты: РНП CRISPRa увеличивают транскрипцию целевых генов в 150-250 раз. К 5-м суткам после трансфекции РНП уровни прегеномной РНК и ккзДНК ВГВ суткам при активации APOBEC3A/3B снижались на 90-99% ($p < 0.05$). Уровни HBsAg снижались на 40-60% ($p < 0.05$). Анализ дезаминирования ккзДНК методом 3Д-ПЦР показал значительное дезаминирование в образцах активации APOBEC3A/3B, но также дезаминирование генома в областях гена ARID2. Аттенуированные РНК-проводники снижали уровни активации генов на 40-50% с сохранением противовирусной активности, но снижением/блокированием внецелевого дезаминирования.

Выводы: CRISPR-активация APOBEC3A/3B в виде РНП значительно подавляет репликацию вируса (снижение параметров цикла вируса до 99%); оставшиеся молекулы ккзДНК содержат частые количество мутаций по типу G→A/C→T. Аттенуированные РНК-проводники позволяют контролировать уровни CRISPRa и снижать внецелевую активность генов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ №20-515-12010 и РФФИ № 20-015-00442.

Направленная модификация ДНК с помощью новой нуклеазы типа V-A из *Ruminococcus bromii*

Васильев Р.А.^{1,2}, Евтеева М.А.², Гуничева Н.М.²

¹ Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

² НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

Нуклеазы Cas12a типа V являются широко используемыми редакторами ДНК, однако поиск новых ферментов, работающих в широком диапазоне температур и использующих расширенные мотивы, прилегающие к протоспейсеру (PAM), продолжается непрерывно [1]. Здесь мы демонстрируем новый ортолог из *Ruminococcus bromii* sp. под названием RbCas12a, который способен эффективно осуществлять направленный гидролиз ДНК-матриц, используя 5'-YYN PAM-последовательности в относительно широком диапазоне температур от 20°C до 42°C. По сравнению с *Acidaminococcus* sp. (AsCas12a), нуклеаза RbCas12a способна более эффективно разрезать ДНК в условиях *in vitro*. Также мы показываем, что кодон-оптимизированная для человека нуклеаза RbCas12a активна в культуре клеток НЕК293Т и может применяться для эффективного внесения делеций в геном человека. Учитывая полезные свойства RbCas12a, этот фермент демонстрирует потенциал для использования в клинических и биотехнологических приложениях в области редактирования генома.

1. Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, др. всего 11 человек. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. 2015 Oct 22;163(3):759-71.

Исследование было поддержано грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2019-1659.

Оптимизация неадресующего фрагмента sgPНК для системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 методом молекулярной селекции *in vitro*

Воробьев П.Е., Вохтанцев И.П., Мещанинова М.И., Кабилов М.Р.,
Жарков Д.О., Воробьева М.А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Система геномного редактирования CRISPR/Cas9 широко применяется в настоящее время в фундаментальных и прикладных исследованиях. Известно, что такие свойства системы CRISPR/Cas9, как селективность и эффективность расщепления ДНК, во многом определяются взаимодействиями неадресующего фрагмента РНК-субъединицы с белком Cas9. С целью повышения эффективности и селективности воздействия системы на геномную ДНК получают новые варианты основных компонентов системы - нуклеазы Cas9 и единой направляющей РНК (sgPНК). В нашей работе впервые предложено использовать молекулярную селекцию *in vitro* для получения новых вариантов sgPНК, которые обеспечивают улучшенные характеристики системы, такие как повышенная селективность по отношению к корректным мишеням, повышенная скорость диссоциации продуктов расщепления из комплекса с ферментом и многооборотность расщепления ДНК.

Предложен новый подход к *in vitro* селекции из комбинаторной библиотеки новых sgPНК, содержащих замены в неадресующей области (инвариабельной части). Разработаны схемы селекции вариантов sgPНК, которые придают системе геномного редактирования необходимые характеристики. Выполнены эксперименты по селекции и высокопроизводительному секвенированию конечного и промежуточных пулов. Проведен анализ последовательностей – лидеров отбора, химический синтез новых вариантов sgPНК, содержащих замены в инвариабельной части. Показано, что новые варианты направляющих РНК обладают отличными от исходной sgPНК свойствами и обеспечивают улучшенные характеристики системе Cas9/sgPНК.

Исследование было поддержано грантом РНФ №22-24-00930.

Термодинамические параметры формирования комплексов эндонуклеазой Cas9 с нуклеиновыми кислотами

Жданова П.В.^{1,2}, Черноносков А.А.¹, Ломзов А.А.¹, Коваль В.В.^{1,2}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Системы CRISPR-Cas являются мощными инструментами изменения генома с высокой точностью. Нуклеаза Cas9 из *Streptococcus pyogenes* относится ко второму типу CRISPR-Cas-систем и широко применяется в генной инженерии. Для активации нуклеазной активности Cas9 в лабораторных условиях требуется химерная молекула РНК (sgРНК), сочетающая в себе свойства направляющей и транс-активирующей РНК. Используя sgРНК, Cas9 можно запрограммировать на расщепление двухцепочечной ДНК в любом сайте, определяемом направляющей последовательностью РНК и включающим РАМ мотив.

Большое количество исследований посвящено структурным особенностям организации тройного комплекса Cas9-sgРНК-ДНК. Однако наблюдается недостаток информации о термодинамической составляющей таких взаимодействий, полученной с помощью различных экспериментальных и аналитических методов. Вопросы взаимодействий в биологических молекулах тесно связаны с изменением теплоты, происходящем в процессе узнавания, комплексообразования и др. Метод изотермической титрационной калориметрии (ИТК) напрямую измеряет изменение тепла, поглощаемого из окружающей среды для эндотермического процесса или выделяемого в окружающую среду для экзотермического процесса. ИТК является мощным инструментом для изучения биомолекулярных взаимодействий, отображая полный термодинамический профиль.

В данной работе исследованы термодинамические аспекты формирования комплекса Cas9-РНК и комплекса Cas9-sgРНК-ДНК. Особенности комплексообразования были изучены с помощью комбинации методов изотермической титрационной калориметрии и компьютерного моделирования.

Авторы выражают благодарность Сибирскому суперкомпьютерному центру СО РАН за предоставление суперкомпьютерных мощностей. Исследование было поддержано грантом РНФ № 20-14-00214.

Новые регуляторы митохондриальной трансляции

Каменский П.А.¹, Левицкий С.А.¹, Балева М.В.¹, Чичерин И.В.¹, Пиунова У.Е.¹

¹ Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

Митохондрии эукариотических клеток содержат собственные геномы и осуществляют экспрессию имеющихся в них генов. Матричные процессы в митохондриях организованы по бактериальному типу, однако отличаются от последних рядом структурных и механистических особенностей.

Биосинтез белка в митохондриях характеризуется большим количеством отличий от бактериальной трансляции. Так, митохондриальные рибосомы структурно устроены несколько иначе, чем бактериальные. Помимо этого, набор и функции белковых факторов трансляции в митохондриях и у бактерий совершенно различны. Наконец, митохондриальная трансляция регулируется принципиально иначе, чем бактериальная. При этом если у низших эукариот (в частности, у дрожжей) этот процесс описан достаточно подробно, то механизмы регуляции митохондриальной трансляции в клетках млекопитающих остаются практически неизвестными.

В нашей работе мы описали функции нескольких белков человека, про которые ранее было известно, что они так или иначе важны для процессов биосинтеза белка в митохондрии. Также мы провели аналогичный анализ для нескольких белков, ортологи которых принимают участие в регуляции митохондриальной трансляции у дрожжей. В результате были описаны новые регуляторы биосинтеза белка в митохондриях клеток человека, действующие либо на процесс трансляции целиком, либо на трансляцию каких-либо конкретных митохондриальных мРНК. Помимо этого, оказалось, что функции ортологичных белков в митохондриях дрожжей и человека могут кардинальным образом отличаться друг от друга.

Исследование поддержано грантом РФФ № 21-14-00008.

Разработка программируемых биологических наночастиц для упаковки и целевой доставки CRISPR/Cas-систем: испытания на модели вируса гепатита В

Костюшев Д.С.^{1,2}, Брезгин С.А.^{1,2}, Костюшева А.П.¹, Пономарева Н.И.^{1,2},
Максимов Г.В.⁴, Слатинская О.В.⁴, Лукашев А.Н.¹, Чуланов В.П.^{1,2,3,5}

¹ *Институт медицинской паразитологии и тропической медицины
им. Е.И. Марциновского, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный
медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России
(Сеченовский Университет)*

² *Научно-технологический университет «Сириус»*

³ *Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии
и инфекционных заболеваний Министерства здравоохранения России, Москва, Россия*

⁴ *Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова*

Введение: хронический гепатит В (ХГВ) является одной из ключевых проблем мирового здравоохранения[1]the World Health Assembly endorsed the Global Health Sector Strategy (GHSS). Элиминации вируса гепатита В (ВГВ) с помощью современных препаратов невозможно. Системы нуклеаз CRISPR/Cas могут разрушать вирусные геномы[2]but off-target effects of nucleases in the human genome limit their clinical utility. CRISPR/Cas9 systems from four different species were co-expressed in cell lines with guide RNAs targeting conserved regions of the HBV genome. CRISPR/Cas9 systems from *Streptococcus pyogenes* (Sp. В перспективе, системы CRISPR/Cas могут использоваться для полной элиминации вирусов при хронических формах инфекции, в том числе при ХГВ. Ключевой проблемой при использовании CRISPR/Cas *in vivo* является практически полное отсутствие эффективных методов упаковки и целевой доставки компонентов CRISPR/Cas[3]. Использование биологических наночастиц (БН) в качестве средств доставки CRISPR/Cas-систем имеет ряд преимуществ: высокая биосовместимость, способность преодолевать биологические барьеры, не иммуногенность, возможность упаковки CRISPR/Cas любого вида и модификации, защита комплексов от внешнего воздействия.

Целью данной работы была разработка молекулярных методов и подходов упаковки и целевой доставки комплексов CRISPR/Cas в составе БН.

Материалы и методы: на основе систем индуцируемой димеризации и систем взаимодействия белок-РНК были созданы регулируемые системы упаковки Cas белков и РНК-проводников. Функционирование систем было изучено с помощью конфокальной микроскопии, FACS и ПЦР-анализа. БН получали из кондиционной среды с помощью анионообменной хроматографии с этапом ультрафильтрации либо с помощью экструзии экзосом-подобных частиц напрямую из клеток. Характеризацию БН проводили с помощью динамического светорассеяния. Противовирусное действие частиц с комплексами CRISPR/Cas на модели ВГВ оценивали по секреции HBsAg. Функционализацию БН изучали *in vitro* с помощью FACS.

Результаты: впервые созданы технологии регулируемой со-упаковки Cas белков и РНК-проводников в БН. БН с CRISPR/Cas снижают репликацию ВГВ на 90%. Функционализация наночастиц увеличивает эффективность доставки в клетки HepG2 в >10 раз.

Заключение: БН с системами CRISPR/Cas являются перспективными инструментами для разработки на их основе лекарственных препаратов.

Исследование выполнено при поддержке РФФ № 20-15-00373.

Элиминация гепатита В с помощью высокоспецифичных рибонуклеопротеиновыми комплексами CRISPR/Cas9

Костюшева А.П.¹, Пономарева Н.И.^{1,2}, Брезгин С.А.^{1,2}, Лукашев А.Н.¹,
Чуланов В.П.^{1,2,3}, Костюшев Д.С.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Минздрава России, Москва, Россия

² Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний Министерства здравоохранения России, Москва, Россия

Система CRISPR/Cas обладает высокой противовирусной активностью в отношении вируса гепатита В (ВГВ). Транзиторная доставка CRISPR/Cas9 в виде рибонуклеопротеиновых комплексов (РНП) — наиболее эффективный метод, минимизирующий риски нецелевой активности. Мы оценили влияние короткоживущих РНП CRISPR/Cas9 на вирусный цикл ВГВ. В работе использовали рекомбинантный белок Cas9 от организма *Streptococcus thermophilus* (StCas9) и *in vitro* транскрибированные РНК-проводники, направленные к геному вируса. Нуклеолитическое действие РНП оценивали в тесте разрезания *in vitro* и с помощью высокопроизводительного секвенирования. Оценку противовирусного действия проводили по параметрам кольцевой ковалентно замкнутой ДНК (ккзДНК), общей ДНК, прегеномной РНК (пРНК), S-мРНК ВГВ методом ПЦР, а также по подсчету секретируемого поверхностного антигена вируса (HBsAg) методом ELISA и с помощью иммуноцитохимического окрашивания на кор-белок ВГВ (HBcAg). Противовирусную активность оценивали на 3 сутки после трансфекции с последующим наблюдением в течение 17-19 суток. Обработку клеток ингибитором обратной транскрипции ВГВ, ламивудином, использовали для предотвращения образования ккзДНК ВГВ. Мы показали, что РНП CRISPR/Cas9 разрушают ~99% рккзДНК ВГВ в течение 24 часов после доставки комплексов и при этом не оказывают внецелевого действия на геном клеток. Метилирование ккзДНК (частая эпигенетическая модификация у пациентов с ВГВ) блокирует противовирусную активность РНП CRISPR/Cas9 для отдельных позиций в геноме вируса, но при увеличении дозы РНП этот эффект нивелируется. Мы выявили, что (1) РНП CRISPR/Cas9 удаляют до 99% вирусных геномов и приводят к полной элиминации вирусных транскриптов; (2) разрушения вирусных геномов недостаточно для элиминации инфекции – репликация вируса восстанавливается к 14-17 суткам наблюдения; (3) блокирование обратной транскрипции препятствует реактивации ВГВ; (4) метилирование генома вируса блокирует нуклеолитическую активность StCas9 для отдельных РНК-проводников, однако этот эффект нивелируется повышением дозы StCas9 РНП. Эти результаты впервые определяют молекулярно-генетические основы стратегии полной элиминации ВГВ-инфекции из инфицированных клеток с помощью систем CRISPR/Cas9. Блокирование пополнения пула рккзДНК из формы-предшественника имеет решающее значение для полной элиминации вируса от инфицированных клеток.

Работа выполнена при поддержке РФФ № 20-15-00373.

Белок PTCD2 регулирует трансляцию мРНК COIII в митохондриях человека

Левицкий С.А., Балева М.В., Чичерин И.В., Каменский П.А.

Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва, Россия

В ходе эволюции эндосимбиотические органеллы большинства эукариотических клеток – митохондрии, сохранили лишь малую часть предкового генома. Подавляющая часть митохондриально кодируемых белков является компонентами комплексов электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) внутренней мембраны митохондрий. Биосинтез белка в митохондриях в общих чертах сходен с прокариотической трансляцией, при этом имеет целый ряд существенных отличий. В значительной степени эти отличия обусловлены необходимостью строгой регуляции трансляции отдельных мРНК, которая должна быть скоординирована с биосинтезом ядерно-кодируемых компонентов комплексов ЭТЦ. Несмотря на значительный прогресс в изучении митохондриальной трансляции, в первую очередь, благодаря достижениям криоэлектронной микроскопии, молекулярные механизмы такой регуляции остаются невыясненными [1, 2] which in mammals is used exclusively for the synthesis of the membrane proteins responsible for oxidative phosphorylation 1,2 . The initiation of protein synthesis in mitochondria differs substantially from bacterial or cytosolic translation systems. Mitochondrial translation initiation lacks initiation factor 1, which is essential in all other translation systems from bacteria to mammals 3,4 . Furthermore, only one type of methionyl transfer RNA (tRNA Met . Мы предположили, что одним из участников регуляции трансляции в митохондриях человека может являться пентатрикопептидный белок PTCD2. Для проверки этого предположения с помощью методов редактирования генома мы получили линию клеток HeLa с функциональной делецией в соответствующем гене и продемонстрировали, что отсутствие PTCD2 приводит к избирательному снижению биосинтеза митохондриально кодируемого белка COIII. В результате этого у клеток с делецией снижено потребление кислорода, а также изменен стехиометрический состав суперкомплексов ЭТЦ. Помимо этого, нам удалось продемонстрировать, что в митохондриях клеток человека белок PTCD2 взаимодействует с ассоциированными, т.е., транслирующими миторибосомами, что прямо указывает на его участие в регуляции митохондриальной трансляции. Полученные нами данные расширяют знания о регуляции митохондриальной трансляции и могут способствовать разработке подходов к персонализированной терапии митохондриальных болезней, обусловленных недостаточностью цитохром с оксидазы.

1. Amunts A. et al. The structure of the human mitochondrial ribosome // *Science*. -2015. -V. 348. -№ 6230. -P. 95–98.
2. Kummer E. et al. Unique features of mammalian mitochondrial translation initiation revealed by cryo-EM // *Nature*. -2018. -V. 560. -№ 7717. -P. 263–267.

Исследование поддержано грантом Российского Научного Фонда № 21-14-00008.

Направленное редактирование геномов индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека для создания моделей наследственных болезней

Медведев С.П.^{1,2,3}, Устьянцева Е.И.^{1,2,3}, Григорьева Е.В.^{1,2,3}, Павлова С.В.^{1,2,3},
Малахова А.А.^{1,2,3}, Закиян С.М.^{1,2,3}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский центр им. Академика
Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия

Исследование молекулярно-генетических механизмов мультигенных наследственных заболеваний представляет собой комплексную, во многом нерешенную проблему. Это связано с большим разнообразием генов, большим числом и разнообразием типов мутаций, которые непосредственно связаны с развитием болезни, наличием большого спектра однонуклеотидных полиморфизмов генома и других модифицирующих факторов, многие из которых носят персонализированный характер. Все это приводит к большим трудностям в разработке новых средств для лечения наследственных болезней. С использованием CRISPR/Cas9-опосредованного редактирования геномов индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) и технологии генетически кодируемых биосенсоров нами были созданы трансгенные системы для изучения уровня внутриклеточной перекиси водорода на клеточной модели бокового амиотрофического склероза (БАС) и изучения окислительно-восстановительного потенциала глутатиона на модели болезни Паркинсона. На примере наследственной формы БАС (мутации в гене *SOD1*, в том числе полученных при направленном редактировании геномов) мы показали, что моторные нейроны, полученные в результате направленной дифференцировки из ИПСК со встроенными в локус *AAVS1* (*Adeno-associated virus integration site 1*) флуоресцентными биосенсорами перекиси водорода Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1, являются моделью для изучения роли окислительного стресса в патогенезе БАС. Они адекватно воспроизводят реакции на присутствие экзогенной перекиси водорода, реагируют на депривацию питательных веществ, наличие или отсутствие в среде антиоксидантов и нейротрофических факторов, а также на стимуляцию глутаматной эксайтотоксичности. При этом наблюдается достоверная разница по данным показателями у клеток с разным генотипом. Таким образом, совокупность технологий редактирования геномов, генетически кодируемых биосенсоров и ИПСК открывает перспективу создания более совершенных моделей для поиска и тестирования новых лекарственных препаратов.

Исследование было поддержано бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН FWNR-2022-0015 и грантом РФФИ 19-29-04011 мк.

Использование сайт-специфического встраивания генов для выявления районов генома *Arabidopsis thaliana* с максимально высоким выходом целевого рекомбинантного белка

Пермякова Н.В., Маренкова Т.В., Белавин П.А., Загорская А.А., Сидорчук Ю.В., Уварова Е.А., Кузнецов В.В., Розов С.М., Дейнеко Е.В.

ФГБНУ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

Суспензионные культуры растительных клеток хорошо зарекомендовали себя как системы наработки биофармацевтических белков. Синтез рекомбинантных белков в растительных системах экспрессии, в частности, в культурах клеток высших растений сочетает возможность посттрансляционных модификаций по эукариотическому типу, и простоту и рентабельность бактериальных систем экспрессии. Тем не менее они также имеют ряд недостатков, связанных с посттрансляционными модификациями белков, нежелательными вторичными метаболитами, а также все еще недостаточно высоким выходом рекомбинантных белков. Основные усилия исследователей в настоящее время направлены на оптимизацию генетических конструкций и отбор наиболее «благоприятных» событий при случайной интеграции трансгенов в растительный геном.

Мы предлагаем новый подход, предполагающий сайт-специфическое встраивание целевых генов в районы генома, характеризующиеся высокой транскрипционной активностью, например, в районы генов «домашнего хозяйства», с применением методов геномного редактирования. На примере редактирования гена *gfp* в геноме трансгенных суспензионных клеток *A. thaliana*, были отработаны способы доставки в клетки конструкций для редактирования. Экспериментальным путем был подобран оптимальный состав конструкции для *knock-in*. Было показано, что сайт-специфическое встраивание успешно происходит как при наличии в конструкции участков гомологичных целевому району генома (встраивание идет по механизму гомологичной рекомбинации), так и при их отсутствии (встраивание идет по механизму негомологичного сращивания концов). При встраивании по обоим механизмам в местах соединения растительной и трансгенной ДНК происходят мутации. Также было показано, что наличие в конструкции для *knock-in* сайтов узнавания эндонуклеазы Cas9 повышает частоту успешных событий. С применением созданных конструкций методом биобаллистической трансформации были получены клеточные линии *A. thaliana* с геном *dIFN*, кодирующим гамма интерферон человека, доставленный в район гистонового гена H3.3. Получены моноклональные клеточные линии, несущие в геноме целевой ген *dIFN*. Проведена оценка накопления целевого белка – гамма интерферона человека методом ИФА. В одной из моноклональных линий уровень накопления целевого белка превышал 2% от ОРБ. Анализ экспрессии генов *A. thaliana*, окружающих сайт встраивания, в моноклональных клеточных линиях с *knock-in*, показал, что уровень экспрессии хозяйских генов не изменился.

Работа поддержана проектом РНФ 21-14-00091.

Ретровирусы и ретровирусные векторы в молекулярной биологии

Прасолов В.С., Спирин П.В.

Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН
Москва 119991, ул. Вавилова, д.32

По оценке ведущих вирусологов, в настоящее время известны лишь 1-3% всех существующих вирусов. В полной мере это относится и к простым, и к сложным ретровирусам (лентивирусам). Хотя первые ретровирусы были выделены более 100 лет назад, предметом интенсивных исследований они стали только после того, как было установлено, что геном ретровирусов содержит ген обратной транскриптазы - фермента, осуществляющего синтез двуцепочечной ДНК на геномной вирусной РНК – матрице. Такая ДНК (провирус) способна встраиваться в геном клетки хозяина с помощью вирус-специфического фермента интегразы и ряда клеточных ферментов, что может приводить к появлению у зараженных, содержащих провирус, клеток новых свойств. В ходе репликации ретровирусов в клетках вирусный геном способен включать последовательности клеточных генов и при последующем заражении новых клеток вносить в их геном в составе провирусов такие захваченные последовательности «чужих» генов. В случае захвата последовательностей регуляторных генов последние выходят из-под контроля регуляторных элементов клетки; их экспрессия контролируется вирусными сигналами, что нередко приводит к злокачественной трансформации клеток. Захват вирусным геномом клеточных генов должен сопровождаться потерей последовательностей одного или нескольких вирусных генов, что объясняется необходимостью сохранения определенного размера геномной РНК, требующегося для его укладки в вирусную капсиду строго определенной емкости. На этом самостоятельная жизнь трансформирующего вируса прекращается. Дальнейшее его существование зависит от вируса-помощника, снабжающего трансформирующий вирус отсутствующими у него белками (вследствие делеций в его геноме последовательностей соответствующих полноценных генов). Зрелые частицы трансформирующего ретровируса в отсутствие вируса-помощника способны однократно встроить свой ДНК-провирус в геном клетки. При этом входящие в состав провируса гены экспрессируются с помощью клеточной РНК-полимеразы II, но формирования инфекционных ретровирусных частиц не происходит. В то же время экспрессия захваченных ранее генов осуществляется достаточно эффективно. Эти наблюдения нацелили исследователей на разработку эффективных систем переноса и экспрессии целевых и маркерных генов в клетках позвоночных, в том числе и человека, *in vitro* и *in vivo* с помощью ретровирусных векторов. Первая в нашей стране и одна из первых в мире систем эффективного переноса генов была сконструирована в начале 80-х годов в ИМБ им. В.А.Энгельгардта РАН П.М.Чумаковым и В.С.Прасоловым. Эта система была успешно применена во многих фундаментальных исследованиях, в современной биомедицине и биотехнологии. Исследования эндогенных ретровирусов, провирусы которых интегрированы в геномы не только соматических клеток, но и репродуктивных, представляют особый интерес. Некоторые провирусы присутствуют в геномах миллионы лет. Выделение и анализ эндогенных ретровирусов позволили нам использовать гены их белков оболочки для конструирования уникальных систем ретровирусного переноса и экспрессии генов для адресной доставки генов, в том числе и цитотоксических, в злокачественные клетки определенной природы. Так, на основе эндогенного вируса из азиатского мышевидного грызуна *Mus caroli* нами получены ретровирусные векторы, обеспечивающие доставку *in vitro* и *in vivo* гена тимидинкиназы вируса простого герпеса в злокачественные клетки ряда глиом и нейробластом человека, экспонирующие на своей поверхности плазмолипин. В присутствии ганцикловира эта тимидинкиназа, в отличие от клеточных тимидинкиназ, фосфорилирует ганцикловир, что в конечном итоге позволяет ему встроиться в реплицирующуюся геномную ДНК злокачественной клетки и терминировать её синтез. Этот процесс приводит к гибели злокачественных клеток.

Удаление сайтов связывания CTCF в локусе *Unc5b/Slc29a3* мыши *in vivo*

Сальников П.А.^{1,2}, Весна Э.С.^{1,2}, Кораблев А.Н.^{1,2}, Серова И.А.^{1,2},
Лукьянчикова В.А.^{1,2}, Степанчук Я.К.^{1,2}, Белокопытова П.С.^{1,2}, Ян А.П.^{1,2},
Тихомиров С.А.^{1,2}, Фишман В.С.^{1,2,3}

¹ Институт цитологии и генетики, Новосибирск, Россия

² Новосибирский Государственный Университет, Новосибирск, Россия

³ АНО «Институт искусственного интеллекта», AIRI, Москва, Россия

Система редактирования генома CRISPR/Cas9 находит применение в широком спектре исследований, включая изучение некодирующих элементов генома. Одной из точек применения CRISPR/Cas9 является функциональное исследование роли границ Топологически Ассоциированных Доменов (ТАДов) в регуляции развития и патологических процессах. Эксперименты в этой области требуют модификации сгруппированных регуляторных элементов, таких как сайты связывания CTCF, ассоциированные с границей ТАДов. Это является сложной задачей, поскольку элементы-мишени часто расположены в близости с другими функциональными элементами, такими как промоторы и экзоны генов. Последовательное удаление отдельных сайтов связывания CTCF неэффективно, особенно при создании трансгенных животных. В этой работе мы удалили сайты связывания CTCF в границе ТАДов, используя сразу два подхода — внесение протяженной геномной делеции, захватывающей сайты связывания CTCF, и одновременного таргетирования соседних сайтов, используя набор gRNAs и ssODN в одном раунде геномного редактирования *in vivo*. Используя этот подход, мы получили когорту трансгенных мышей, проанализировали разнообразие полученных мутаций и обнаружили потенциальные преимущества и недостатки такого подхода в геномном редактировании.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 22-14-00247). Анализ данных NGS выполнен на узлах высокопроизводительного кластера Института цитологии и генетики, поддержанного проектом № 121031800061-7. Анализ ChIP-seq выполнен на оборудовании Новосибирского государственного университета при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, грант № 2019-0546 (FSUS-2020-0040).

CRISPR/Cas9-редактирование интронов: что можно узнать нового о жизни гена в результате редактирования его интронов

Матвеева А.М.^{1,2}, Журавлев Е.С.¹, Виноградов Д.И.¹, Семенов Д.В.¹, Власов В.В.^{1,2}, Степанов Г.А.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Развитие систем редактирования генома CRISPR/Cas привело к значительному расширению арсенала подходов генетической инженерии. Рутинное использование данных методов в исследованиях по регуляции экспрессии белок-кодирующих генов предполагает, в основном, редактирование экзонов. При этом интроны как белок-кодирующих генов, так и генов lncРНК содержат многочисленные регуляторные сайты, интересные для направленного изменения.

С использованием системы CRISPR/Cas9 в клетках эмбриональной почки человека 293FT были отредактированы интроны гена *Gas5* (Growth Arrest Specific 5), содержащие гены малых ядрышковых РНК (мяоРНК). Точечное редактирование генов индивидуальных мяоРНК привело к специфическому подавлению мяоРНК-мишеней. Интересно, что в модифицированных клетках было выявлено созревание новых форм мяоРНК-мишеней, содержащих мутации. Для длинной некодирующей РНК (днкРНК) хост-гена *Gas5* были выявлены новые зрелые формы сплайсинга, содержащие пропуски экзонов и новые стыки экзонов. Метаанализ ранее опубликованных данных и анализ экспериментальных транскриптомных данных позволил выявить участие механизмов m6A-модификации в регуляции созревания хост-гена мяоРНК *Gas5*.

Одновременное редактирование двух генов мяоРНК, расположенных в первом и последнем интронах *Gas5*, позволило получить линии клеток человека с протяженной делецией в одном из аллелей *Gas5*. Интересно, что в полученных культурах наблюдалось подавление не только интрон-закодированных мяоРНК, но и самой днкРНК *Gas5*. Полученные результаты позволили предложить роль отдельных SNORD в регуляции созревания РНК хост-гена.

В рамках дальнейшего применения полученных данных наибольший интерес вызывает такое направление, как разработка инструментов модуляции сплайсинга для тонкой регуляции экспрессии гена без нарушения его структуры. Посредством CRISPR/Cas9-опосредованной гомологичной рекомбинации удалось перенаправить модифицирующую активность мяоРНК на пре-мРНК модельного гена *IFITM3* в клетках человека 293FT. Специфическое снижение уровня зрелой мРНК в условиях активации врожденного иммунного ответа показало возможность направленной мяоРНК-опосредованного подавления сплайсинга в модельной линии клеток человека.

Представленные результаты демонстрируют, что разработка подходов к функциональному анализу на основе редактирования интронов – это многообещающий инструмент, обладающий потенциалом для применения в регуляции функций отдельных генов.

Исследование проведено при поддержке гранта РФФИ 18-29-07073 и проекта государственного задания ИХБФМ СО РАН № 122022100238-7 (разработка методов).

Увеличение специфичности системы CRISPR/Cas9 *in vitro* за счет введения модификаций в направляющие РНК

Прохорова Д.В.^{1,2}, Толстова П.О.^{1,2}, Шукин Д.В.^{1,2}, Купрюшкин М.С.¹, Довыденко И.С.¹,
Переверзев И.М.¹, Фомин А.С.¹, Пышный Д.В.¹, Степанов Г.А.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

В настоящее время система CRISPR/Cas9 применяется для регуляции транскрипции, изменения эпигенетического профиля, проведения полногеномного скрининга, визуализации хромосом и нокаута заданных генов-мишеней [1]. Однако остается актуальной проблема, связанная с возникновением неспецифичных эффектов при редактировании генов системой CRISPR/Cas9 в эукариотических клетках. Перспективным подходом к ее решению является введение модификаций в направляющие РНК.

В данной работе было исследовано влияние как природных модифицированных нуклеотидов: N6-метиладенозина (m6A), 5-метилцитозина (m5C) и псевдоуридина (ψ), так и фосфорилгуанидиновых групп (ФГ) на активность и специфичность функционирования системы CRISPR/Cas9 *in vitro*. Было показано, что включение природных модифицированных мономеров в структуру как единых направляющих РНК, так и трансктивирующих РНК позволяет сохранить высокую эффективность гидролиза модельных ДНК-субстратов *in vitro*. Кроме того, замена канонических нуклеотидов на их модифицированные аналоги в направляющих РНК приводит к повышению специфичности системы CRISPR/Cas9 *in vitro* по сравнению с немодифицированным вариантом. Также нами были описаны новые химерные направляющие РНК, содержащие единичные ФГ-группы. Впервые была продемонстрирована возможность формирования каталитически активных комплексов белка Cas9 с химерными sgРНК, содержащими ФГ-модификации. Было выявлено, что включение как единичных, так и нескольких фосфорилгуанидиновых группировок в РНК-дистальном районе направляющих РНК позволяет контролировать активность и повышать специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*. Таким образом, введение как природных модифицированных нуклеотидов, так и фосфорилгуанидиновых модификаций позволяет улучшить работу системы CRISPR/Cas9, что открывает перспективы внедрения новых направляющих в решение прикладных задач

1. Modell A.E., Lim D., Nguyen T.M., Sreekanth V., Choudhary A. CRISPR-based therapeutics: current challenges and future applications // *Trends Pharmacol. Sci.* - 2022. - Vol. 43. - P. 151–161.

Исследование было выполнено при поддержке гранта РФФИ № 21-64-00017 и государственного задания ИХБФМ СО РАН № 122022100238-7.

Синтетические хромосомы человека

Томилин А.Н.

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербургский Государственный
Университет, Санкт-Петербург, Россия*

Искусственные хромосомы человека (НАС, Human Artificial Chromosomes) представляют собой генетические вектора, главными особенностями которых является способность нести до миллиона пар оснований, а также свойство поддерживаться в виде самостоятельных генетических элементов без интеграции в хромосомы хозяйских клеток. Различают два класса НАС, один из которых включает различные мини-хромосомы, полученные посредством редуцирования природных хромосом, тогда как другой класс включает синтезированные *de novo* НАС. На сегодняшний день единственным представителем второго класса являются НАС, полученные путем *in vitro*-мультипликации альфоидного повтора центромерного участка 17 хромосомы человека и TetO-оператора с повторной последующей сборкой синетзированных модулей в дрожжах и клетках млекопитающих (a^{TetO} -НАС). В докладе подчеркивается незаменимость a^{TetO} -НАС для задач, решение которых невозможно с помощью существующих вирусных векторов и систем редактирования генома, обозначены перспективные области использования a^{TetO} -НАС, среди которых основанная на стволовых клетках генотерапия наследственных заболеваний человека. Также указываются выявленные в ходе экспериментальной работы недостатки a^{TetO} -НАС, устранение которых ускорит практическое внедрение этих синтетических эписомных векторов высокой емкости.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Санкт-Петербургского государственного университета в рамках научного проекта № 60257027.

Разработка системы доставки целевых соединений в клетки микоплазм

Фисунов Г.Ю., Матюшкина Д.С.

ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва, Россия

Бактерии класса Молликут, в частности, микоплазмы обладают существенно редуцированным геномом, сохраняя при этом способность расти на питательных средах. Это делает их удобным объектом для системной и синтетической биологии. В частности, геном *Mycoplasma mycoides* был первым геномом, искусственно синтезированным и доставленным в живую клетку. Системы доставки различных соединений и ДНК большого размера в клетки микоплазм являются важным инструментом для развития исследований в области системной и синтетической биологии на этих объектах.

В данной работе мы демонстрируем принцип работы системы доставки в клетки микоплазм на основе липосом и вирусного белка, облегчающего слияние липидных мембран. Ряд вирусов эукариот, в частности, вирус везикулярного стоматита (VSV), обладают поверхностными белками, индуцирующими слияние липидных мембран при изменении pH среды. В данной работе мы использовали наружный домен белка VSV-G вируса везикулярного стоматита, слитый с мембранной частью гемагглютинаина микоплазмы VhA. Кодированная последовательность была синтезирована из олигонуклеотидов. Транспозонный вектор был использован для получения штамма *M. gallisepticum*, экспрессирующего соответствующий химерный белок. Полученный рекомбинантный штамм был использован для проверки системы доставки с липосомами, меченными родамином. Липосомы добавлялись к культуре *M. gallisepticum*. Затем проводилось титрование pH с 7.0 до 6.0. Клетки отмывались и измерялась флуоресценция родамина. Клетки, экспрессирующие химерный белок демонстрировали флуоресцентный сигнал в два раза больший, чем клетки дикого типа. Таким образом, можно заключить, что система доставки на основе вирусного белка VSV-G может быть использована для увеличения эффективности доставки целевых соединений в клетки микоплазм. Работа поддержана грантом РФФИ 18-29-08043.

**ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ НУКЛЕИНОВЫЕ
КИСЛОТЫ, РНК И ДНК-ВАКЦИНЫ,
СРЕДСТВА ИХ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ**

Сенсоры на основе мотивов интеркалированных ДНК-дуплексов для измерения pH в нуклеоплазме и ядерных биоконденсатах

Варижук А.М.^{1,2}, Петрунина Н.А.^{1,2}, Шторк А.С.^{1,2}, Лукина М.М.^{1,2},
Ходорович Ю.М.³, Аралов А.В.³, Богомазова А.Н.¹, Шендер В.О.¹, Лагарькова М.А.¹

¹ ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва, Россия

² Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

³ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Интеркалированные мотивы (iM), образуемые цитозин-богатыми олигодезоксирибонуклеотидами (ОДН) в условиях гемипротонирования цитозиновых остатков, активно используются в дизайне биосовместимых pH-сенсоров для диагностики и прояснения патогенеза нейродегенеративных заболеваний, онкологических заболеваний, а также метаболических нарушений. Ранние прототипы сенсоров представляли собой объемные межмолекулярные конструкции. Их применение ограничивалось медленным откликом и неоптимальным рабочим диапазоном pH.

Недавно на основе цитозин-богатых последовательностей из генома человека [1] наша группа разработала упрощенные ОДН-сенсоры, чувствительные к малым изменениям pH в пределах физиологического диапазона значений [2]. В слабокислой/нейтральной среде такие ОДН формируют мономолекулярные iM, и их терминальное мечение FRET-парой флуорофоров позволяет зарегистрировать pH-зависимый конформационный переход в ОДН по соотношению интенсивностей флуоресценции меток.

Высокие значения констант скорости мономолекулярных перестроек обуславливают близкую к оптимальной кинетику отклика предложенных нами сенсоров. Дополнительно улучшить кинетические характеристики и оптимизировать диапазон pH-чувствительности сенсора удастся за счет химической модификации остова ОДН в петлях iM. На данный момент наиболее перспективной модификацией представляется замена нуклеозидных остатков в петлях на алкильные линкеры.

Калибровка на нескольких клеточных линиях подтвердила применимость новых сенсоров для детекции pH в нуклеоплазме и ядерных биоконденсатах. Последнее поколение сенсоров на основе модифицированных iM открывает возможность мониторинга ассоциированных с изменением pH внутриядерных процессов в норме и патологии, включая динамику формирования биоконденсатов.

1. Assi H.A., Garavis M., Gonzalez C., Damha M. *i-Motif DNA: structural features and significance to cell biology* // *Nucleic Acids Res.* - 2018. - V. 46. - P 8038–8056.
2. Turaev A.V., Isaakova E.A., Severov V.V., Bogomazova A.N., Zatsepin T.S., *др. всего 10 человек.* *Genomic DNA i-motifs as fast sensors responsive to near-physiological pH microchanges* // *Biosensors & Bioelectronincs.* - 2021. - V. 175. - P 112864.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 22-15-00129.

Замена уридина на N1-метилпсевдоуридин делает невозможным эффективное использование IRES-элементов в мРНК

Панова Е.А.^{1,2,3}, Сорокин И.И.^{1,2}, Гушин В.А.², Дмитриев С.Е.^{1,2,3}

¹ НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ, Москва, Россия

² НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, Москва, Россия

³ ФББ МГУ, Москва, Россия

мРНК-трансфекция считается многообещающим подходом для доставки генов из-за минимальной опасности модификации генома и отсутствия зависимости от пролиферативного статуса клеток. Синтетические мРНК, полученные с помощью *in vitro* транскрипции, могут успешно применяться для вакцинации, заместительной терапии или репрограммирования клеток. Однако такие транскрипты зачастую активируют ответ врождённого иммунитета, что усложняет трансфекцию первичных клеток и использование мРНК-технологий в живых организмах. Включение модифицированных нуклеотидов в транскрипт может снизить иммунный ответ, увеличить стабильность мРНК и таким образом повысить продолжительность экспрессии и общий выход белкового продукта. Однако опубликованные данные о влиянии нуклеотидных модификаций на продукцию белка противоречивы. Важную роль в мРНК-технологиях играет также использование специфических регуляторных элементов – в частности, сайтов внутренней посадки рибосомы (IRES), обеспечивающих эффективную трансляцию мРНК в условиях стресса.

Мы исследовали влияние наиболее широко используемого в мРНК-терапии модифицированного нуклеозида, N1-метилпсевдоуридина, на экспрессию репортерных мРНК, различающихся механизмами инициации трансляции, в нескольких системах *in vitro* и *in vivo* [1], сравнив эффективность и кинетику накопления люциферазы в случае обычных и модифицированных транскриптов в клеточных экстрактах, культивируемых линиях клеток человека и первичных фибробластах мыши. Эффекты модификаций сильно различались в зависимости от механизма инициации трансляции. В случае мРНК с кэп-зависимыми лидерами влияние модификаций на эффективность, а часто и на продолжительность экспрессии было положительным, в то время как в случае IRES-зависимой трансляции введение N¹mΨ вместо 100% U практически полностью ингибировало трансляцию. Мы показали, что эти эффекты характерны для вирусных IRES-элементов всех четырёх типов [2] (на примере IRES из мРНК вирусов HRV, EMCV, CSFV, CrPV и ряда других). Очевидно, замена U на N¹mΨ мешает образованию правильной вторичной и третичной структуры, критически необходимой для их работы. Мы также проанализировали влияние замены на некоторые другие типы инициации трансляции (в частности, опосредованные 5'-концевыми кэп-независимыми энхансерами трансляции, 5'-CITE). Кроме того, для модифицированных мРНК мы зафиксировали задержку появления продукта, что указывает на снижение скорости элонгации. Обнаруженные закономерности важны для разработки новых эффективных вариантов терапевтических мРНК.

1. Akulich et al. (2016) *Sci Rep* 6, 37905.

2. Sorokin et al. (2021) *Biochemistry (Moscow)* 86, 1060–1094.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 18-14-00291.

Заряд или конфигурация? Исследования преорганизованных анионных γ -ПНК

Кириллова Ю.Г.^{1,2}, Прохоров И.А.¹, Варижук А.М.²

¹ Институт тонких химических технологий, Российский технологический университет-МИРЭА

² Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, e-mail: pna-mitht@yandex.ru

К настоящему времени ПНК [1] и их производные как биостабильные и мембранотропные миметики олигонуклеотидов находят применение в молекулярной медицине для исследований в области геномики, разработки новых диагностических и геннотерапевтических подходов. Среди различных модификаций классических аминоксилглициновых (*aeg*) ПНК наиболее перспективными признаны ациклические γ -S-производные [2]. Такие хиральные ПНК имеют преорганизованную вторичную структуру. Введение функциональных групп в боковой радикал ПНК позволяет модулировать их свойства. В настоящей работе для снижения токсичности ПНК мономеры несли отрицательный заряд, представленный карбоксимэтильным (*ce*) радикалом [3].

Мы предполагаем, что отрицательный заряд позволит преодолеть недостатки предыдущих аналогов, поскольку позволит решить вопросы, связанные с растворимостью и самоагрегацией олигомеров ПНК, обеспечит управляемое комплексование с комплементарными мишенями. Также наличие отрицательного заряда в ПНК будет способствовать расширению применений этих веществ *in vivo*, поскольку станет возможным их взаимодействие с положительными противоионами как пептидных молекул, так и неветторных катионных систем, разработанных для доставки природных нуклеиновых кислот в клетки.

Было получено три типа мономеров - *aeg*-, γ -S-метил- из L-Ala и γ -S-(3-бензилкарбоксии)этил- из L-Glu. Оптимизация известных Вос-протоколов [3] позволила получить полианионный γ -олигомер H-Gly-CAGACTTA-Gly-NH₂ (1), а также серию додекамеров ПНК (2-4), состоящих из чередующихся *aeg*- и γ -S-замещенных мономеров с общей последовательностью TCACSTTCCCTCC.

Исследование зависимости физико-химических свойств ПНК от наличия отрицательно заряженных остатков и числа хиральных центров в последовательности показало, что ключевую роль при молекулярном узнавании полинуклеотидов играет стереохимия мономерных единиц ПНК, тогда как отрицательный заряд может вносить лишь небольшой вклад в образование и стабильность комплексов олигомерных ПНК с ДНК(ПНК). При этом, в буфере, имитирующем внутриклеточную среду, октамер (1) на основе L-Glu образовывал стабильные параллельные и антипараллельные дуплексы с комплементарными олигодезоксирибонуклеотидами и рибоолигонуклеотидами с высокой чувствительностью к единичным мисматчам. Причем стабильность дуплексов была выше, чем стабильность дуплексов, образованных *aeg*-ПНК той же последовательности оснований.

Синтетические додекамеры образовывали стабильные ПНК₂;ДНК триплексы, подобно пиримидиновым *aeg*-ПНК. Также будут представлены исследования взаимодействия додекамеров ПНК (2-4) с G-насыщенными олигодезоксирибонуклеотидными мишенями, способными образовывать несовершенные квадруплексы.

1. Nielsen P.E., Egholm M., Berg R.H., Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide // *Science*. 1991.-V. 254. - P 1497-1500.
2. Dragulescu-Andrasi A., Rapireddy S., Frezza B.M., Gayathri C., Gil R.R., Ly D.H. A Simple γ -Backbone Modification Preorganizes Peptide Nucleic Acid into a Helical Structure // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. – V. 128. – P 10258-10267.
3. Kirillova Y, Boyarskaya N, Dezhenkov A, Tankevich M, Prokhorov I, Varizhuk A, et al. Poly-anionic Carboxyethyl Peptide Nucleic Acids (*ce*-PNAs): Synthesis and DNA Binding // *PLoS ONE*. 2015. - V. 10. - e0140468.

Олигогликолевые пролекарственные формы 5-модифицированных производных 2'-дезоксинуридина

Макаров Д.А.¹, Негря С.Д.¹, Ясько М.В.¹, Карпенко И.Л.¹, Сольев П.Н.¹,
Ефременкова О.В.², Александрова Л.А.¹, Кочетков С.Н.¹

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
Москва, 119991, Россия

² Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков
им. Г.Ф. Гаузе, Москва, 119435, Россия

Аналоги нуклеозидов являются перспективными соединениями для разработки противомикробных средств. Среди модифицированных нуклеозидов значительной противотуберкулезной активностью обладают С-5-модифицированные производные 2'-дезоксинуридина, содержащие различные протяженные заместители [1]. Однако их крайне низкая водорастворимость представляет собой серьезную проблему, которая препятствует исследованию их противобактериальной активности. Наиболее распространенным методом изменения необходимых фармакологических параметров соединений является подход с созданием пролекарств.

Ранее в нашей лаборатории были получены производные 2'-дезоксинуридина с объёмными заместителями по 5-му положению азотистого основания, которые проявили заметную активность против лабораторного H37Rv и клинического лекарственно-устойчивого MS-115 штаммов *M. Tuberculosis* [1]. Однако они оказались практически не растворимы в водных средах, что препятствовало дальнейшему изучению их антибактериальной активности против других бактерий. Поэтому нами была получена библиотека пролекарственных форм этих нуклеозидов, основанная на присоединении к углеводной части углеводного фрагмента целевой молекулы нуклеозида гликолевого остатка через легко гидролизуюмую ферментами бактерий карбонатную вставку [2-4].

Полученные нами гликольсодержащие производные модифицированных нуклеозидов эффективно подавляли рост граположительных бактерий (МИК99 20-160 мкМ), при этом показали оптимальное время полугидролиза (3-12 ч) и не проявляли цитотоксического действия на линиях клеток A549 and Jurkat (CD50 120-175 мкМ).

Полученные данные указывают на удобство и перспективность использования гликолевых карбонатов в качестве пролекарств противобактериальных производных нуклеозидов.

1. Shmalenyuk E. R. et al. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* strains H37Rv and MDR MS-115 by a new set of C5 modified pyrimidine nucleosides // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2013. – V. 21. – P. 4874-4884.
2. Negrya S. D. et al. Synthesis of water-soluble prodrugs of 5-modified 2-deoxyuridines and their antibacterial activity // *The Journal of Antibiotics*. – 2020. – V. 73. – P. 236-246.
3. Negrya S. D. et al. Glycol and Phosphate Depot Forms of 4-and/or 5-Modified Nucleosides Exhibiting Antibacterial Activity // *Molecular Biology*. – 2021. – V. 55. – P. 143-153.
4. Negrya S.D. et al. Oligoglycol carbonate prodrugs of 5-modified 2'-deoxyuridines: synthesis and antibacterial activity// *Mendeleev Communications*. – 2022. In press

Работа проводилась при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-04-00094.

Dendritic cell-derived cytochalasin induced artificial microvesicles as antitumor vaccines

Markov O.V.¹, Sen'kova A.V.¹, Maslov M.A.², Mironova N.L.¹, Zenkova M.A.¹

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

² MIREA – Russian Technological University, Moscow Russia

Here three types of vaccines were investigated: dendritic cell (DC)-based vaccines obtained from bone marrow of C57Bl/6 mice or tsDCs loaded; liposomal vaccines on the base of cationic lipid and mannosylated lipoconjugate, and cell-free vaccines based on the cytochalasin B-induced membrane vesicles obtained from DCs (CIMVs). To prepare DC-based and cell-free vaccines DCs were loaded with liposomal complexes containing total RNA of murine melanoma B16 or lymphosarcoma RLS₄₀.

CIMV obtained from B16 RNA-loaded DCs exhibited similar potential to activate anti-tumor cytotoxic T lymphocytes *in vivo* as DC-based vaccines. All types of vaccines loaded with RLS₄₀ RNA at single subcutaneous administration significantly retarded growth of primary tumor node as well as inhibited metastases in liver in RLS₄₀ model *in vivo*, and booster vaccination did not improve the antitumor effect of vaccines. DC- and CIMV-based vaccines reduced mitotic activity in tumor tissue and the effect was 2-time higher at booster vaccination. Double but not single administration of DC- and CIMV -based vaccines led to increase of apoptosis in tumor tissue. Liposomal vaccines did not affect either mitotic activity or apoptosis in tumor tissue. Single and double vaccination of mice with RLS₄₀ with DC- and CIMV-based vaccines led to the most pronounced activation of the immune response, which was expressed in alterations in the spleen and thymus, whereas liposome-based vaccines activated the immune organs to a lesser extent. Post-therapeutic evaluation of the immune checkpoint expression and the type of Th response revealed that vaccination of RLS₄₀-bearing mice with DC-, liposome- or CIMV-based vaccines resulted in switching of humoral immune response formed upon RLS₄₀ progression in mice to cellular immunity by activation of Th1/Th17 cells as well as induction of positive immune checkpoint 4-1BBL and downregulation of suppressive immune checkpoints in a raw PD-1>>>TIGIT>CTLA4>TIM3.

This work was supported by the RSF grant No. 19-74-30011.

Липосомальные системы доставки нуклеиновых кислот: проблемы и перспективы

Маслов М.А.

*Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова, РТУ МИРЭА,
119571 Москва, проспект Вернадского, 86*

Открытия в области строения и функций нуклеиновых кислот создали основу для разработки новых лекарственных препаратов – терапевтических нуклеиновых кислот (ТНК), избирательно воздействующих на первопричину заболеваний – генетические программы, ответственные за развитие патологических процессов. ТНК селективно взаимодействуют с молекулярными мишенями, что обеспечивает высокую специфичность вызываемых ими биологических эффектов. Захват клетками ТНК в свободной форме в целом считается малоэффективным, что обусловлено свойствами, как клеточной мембраны, так и самих кислот, поэтому успешное практическое применение ТНК невозможно без разработки систем их доставки в эукариотические клетки к месту терапевтического воздействия.

Конструирование липосомальных систем доставки ТНК представляет собой комплексную проблем, а ее решение связано с созданием модульных систем, которые представляют собой самособирающиеся транспортные контейнеры, построенные из ковалентно несвязанных друг с другом липофильных модулей, и «запрограммированные» на преодоление биологических барьеров. Концепция «модульности» позволяет конструировать транспортное средство под конкретную задачу, а методы синтеза основных структурных модулей позволяют получить соединения в количествах, необходимых для проведения широкомасштабных биологических исследований.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 0706-2020-0019).

Новые флексимерные аналоги пуриновых нуклеозидов: дизайн, синтез и возможности биологического применения

Матюгина Е.С.¹, Елецкая Б.З.², Фатеев И.В.², Константинова И.Д.²,
Хандажинская А.Л.¹, Кочетков С.Н.¹

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Создание эффективных противовирусных, антибактериальных и противоопухолевых препаратов является одной из основных задач медицинской химии. Дизайн биологически-активных соединений, в состав которых входят те или иные компоненты нуклеиновых кислот, занимает отдельную нишу в этой области [1]. Флексимерные аналоги нуклеозидов, проявивших широкий спектр биологической активности, являются весьма перспективным классом соединений [2]. Флексимеры представляют собой модифицированные нуклеозиды, в которых основание разделено на два гетероциклических фрагмента на расстояние С-С связи. Внедрение таким образом дополнительной подвижности является выгодным для молекулы и может поспособствовать лучшему связыванию в активном центре фермента-мишени.

В данной работе мы представляем дизайн и синтез серии пиразол-содержащих флексимерных аналогов нуклеозидов и исследование спектра их биологической активности. Рибо- и 2'-дезоксирибо- флексимеры получали тремя разными методами: химическим путем, ферментативным с помощью бактериальной пурииннуклеозидфосфорилазы (ПНФ, PNP E.Coli) и биотехнологическим с использованием интактных клеток E. Coli. Серию 5'-карбоциклических флексимеров получали в условиях реакции Троста.

Новые флексимерные аналоги нуклеозидов были изучены на широкой панели ДНК- и РНК-содержащих вирусов, коллекционных тест-культурах грамположительных и грамотрицательных бактерий и против лабораторного штамма *M.tuberculosis* H37Rv. Некоторые соединения показали существенную противовирусную активность на вирусе желтой лихорадки (EC₉₀ 11,3 мкМ), норовирусе (EC₅₀ 4.2 мкМ), коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 (EC₅₀ 80 мкМ) и вирусе клещевого энцефалита (EC₅₀ < 50 мкМ), избирательное воздействие на *M. smegmatis* в концентрации 10 и 1.3 мкг/мл и негативное влияние на рост *M.tuberculosis* в концентрации 40 мкг/мл.

В настоящее время работы по изучению биологических свойств новых флексимерных аналогов нуклеозидов продолжаются, а также проводятся дополнительные исследования для понимания механизма их противовирусного и антибактериального действия.

1. Seley-Radtke, K. L. and Yates, M. K. *The evolution of nucleoside analogue antivirals: A review for chemists and non-chemists.* // *Antivir Res.* - 2018. - V. 154, - P 66-86.
2. Seley-Radtke, K. *Flexibility-Not just for yoga anymore!* // *Antivir Chem Chemother.* - 2018. - V. 26, p. 2040206618756788.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 19-74-10048

A diversity of approaches to the synthesis of oligonucleotide conjugates

Meschaninova M.¹, Vorobyeva M.¹

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia*

Functional nucleic acids (FNA), such as ribozymes, aptamers, siRNA, or antisense oligonucleotides provide a powerful basis for precise molecular biology tools, specific diagnostic probes and targeted therapeutics for treating malignant, viral, hereditary and other disorders.

Conjugation of synthetic nucleic acids with other ligands allows imparting them additional properties depending on a particular task. For improving pharmacokinetic characteristics, *in vivo* or *in vitro* visualizing or targeted action on cellular proteins and nucleic acids, FNA can be conjugated with a variety of molecules: fluorophores, RNA-cleaving agents (e.g., imidazole-based RNase mimics), different delivery vehicles (peptides, lipophilic compounds, receptor-targeted ligands), groups for complementary addressed NA modification, etc.

We have developed several approaches, either solution-based or solid phase-based, to the synthesis of oligonucleotide conjugates with hydrophobic moieties, vitamins, peptides, fluorophores, different small molecules. Within these conjugates, functional group is attached to the oligonucleotide by a stable linker or by stimuli-responsive one. The latter type of linkers (e.g., acid-labile azomethene or amidophosphite linkage, ox/red sensitive SS-linkage, or photolabile linkage) allows for releasing of oligonucleotide from delivery vehicle or small molecule from oligonucleotide in desired location inside the cell or at certain time moment, thus potentiating its biological activity.

We demonstrated feasibility of synthetic approaches by an example of different conjugates of antisense oligonucleotides, siRNAs, miRNAs, mitochondrial RNAs and RNA components of CRISPR/Cas systems. In the report, we also overview remaining challenges and prospects in the field.

This study is supported by the RSF project no. 19-14-00251.

Rationally combined cocktail of anti-miRNA N-mesyolphosphoramidate oligonucleotides for efficient antitumor therapy

Patutina O.A.¹, Gaponova S.K.¹, Burakova E.A.², Sen'kova A.V.¹, Savin I.A.¹,
Markov A.V.¹, Shmendel' E.V.³, Maslov M.A.³, Stetsenko D.A.², Vlassov V.V.¹, Zenkova M.A.¹

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ MIREA – Russian Technological University, Moscow, Russia

miRNAs are potent regulators of gene expression that are actively involved in managing of all physiologically important processes. Dysregulation of miRNA functioning is closely related to human pathologies, including initiation and progression of malignant diseases, which assigns miRNAs as relevant therapeutic targets. Rational combinations of miRNA inhibitors can efficiently interfere with specific tumor survival pathways, offering a great promise for targeted therapy of different human oncological diseases.

In the present work, we evaluated the potential of multi-component therapy, including double or triple combinations of anti-miRNA oligonucleotides, targeted to miRNAs miR-17, miR-21 and miR-155, which are known to be potent multifunctional drivers of carcinogenesis. To inhibit miRNA activity, we applied recently developed N-(methansulphonyl)-phosphoramidate antisense oligonucleotides (μ -ONs), which were shown to exhibit high therapeutic properties in human and mouse tumor models.

Investigation of antiproliferative and antimigrative effects of pair combinations of μ -ONs in B16 melanoma cells revealed strong synergism for cocktails μ -21-ON/ μ -155-ON and μ -21-ON/ μ -17-ON with Loewe synergy score over 16. Evaluation of antimetastatic potential of mono- and combined therapy with μ -ONs in mice showed that *in vitro* transfection of B16 cells either in a monotherapy mode or in pair or triple combinations exhibited profound inhibition of lung tissue metastasis in mice, reaching 85 %. In contrast, in lymphosarcoma RLS₄₀ model with solid primary tumors a clear benefit of combinative antitumor therapy was identified. Transfection of cells with triple combination μ -17-ON/ μ -155-ON/ μ -21-ON provided 9-fold retardation of tumor growth. *In vivo* administration of triple combination μ -17-ON/ μ -155-ON/ μ -21-ON into RLS₄₀-bearing mice provided 4-fold delay of tumor growth. Significant decrease in number of mitoses and PCNA-positive cells was observed in tumor sections in this group of mice. Moreover, it was shown that μ -21-ON/ μ -17-ON/ μ -155-ON cocktail led to 2-fold decrease in total destructive changes in livers compared to control mice without treatment, which indicates both the absence of specific toxicity of the proposed therapy, and the reduction of total toxic burden resulting from malignant growth. Thus, miRNA-based combining therapies may represent a step forward in the fight against oncology.

The work was supported by Russian Science Foundation (grant No 19-74-30011).

Доставка РНК с помощью гибридных липосом-экзосом

Пономарева Н.И.^{1,2}, Брезгин С.А.^{1,2}, Костюшева А.П.¹, Слатинская О.В.³,
Максимов Г.В.³, Лукашев А.Н.¹, Чуланов В.П.¹, Костюшев Д.С.^{1,2}

¹ *Институт медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет)*

² *Научно-технологический университет «Сириус»*

³ *МГУ имени М.В. Ломоносова*

Введение: в последние годы препараты на основе РНК стали активно внедряться в практическое здравоохранение (препараты на основе siRNA, РНК-вакцины и пр.). Создание новых средств доставки РНК-препаратов, позволяющих эффективно упаковывать и доставлять молекулы РНК в целевые органы и ткани является актуальной задачей при создании новых лекарственных препаратов и вакцин. Биологические наночастицы – перспективные средства доставки лекарственных соединений, обладающие уникальными свойствами биосовместимости, возможностью программирования поверхности, тропности к областям воспаления, раковым клеткам и безопасностью использования. Использование биологических наночастиц для упаковки и доставки РНК-препаратов может обеспечить высокую эффективность и безопасность терапии. Ключевой проблемой биологических наночастиц является отсутствие молекулярно-генетических и физико-химических методов упаковки РНК в наночастиц без нарушения свойств наночастиц.

Целью данной работы была разработка подхода по упаковке РНК в биологические наночастицы с помощью создания гибридных экзосом-липосом.

Материалы и методы: биологические наночастицы были получены из культуральной среды клеток НЕК293Т с помощью анионообменной хроматографии с этапом ультрафильтрации. РНК исходно упаковали в коммерческие липосомы Lipofectamine2000 по протоколу производителя. Набор гибридных наночастиц получали за счет инкубации разных пропорций липосом с РНК и биологических наночастиц с последующей экструзией гибридных частиц. Физические свойства наночастиц (средний размер, распределение по размеру, дзета-потенциал) анализировали с помощью динамического светорассеяния при рН=7.4 и рН=4.0 (для изучения возможной агрегации частиц). Упаковку РНК в гибридные частицы оценивали методом ПЦР-РВ.

Результаты: Полученные гибридные липосомы-экзосомы обеспечивают увеличение уровней упаковки РНК в 4-20 раз в сравнении со стохастической упаковкой РНК в биологические наночастицы.

Заключение: Создание гибридных липосом-экзосом является эффективным методом упаковки РНК в биологические наночастицы.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-15-00373.

Новый дисульфидный поликатионный амфифил для доставки терапевтических нуклеиновых кислот

Пучков П.А.¹, Туманов А.В.¹, Маслов М.А.¹

¹ Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова,
МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия

Генная терапия – потенциальный метод лечения не только наследственных заболеваний, но и различных приобретенных заболеваний, включая рак, путем доставки терапевтических нуклеиновых кислот (ТНК). Для доставки используются специальные системы, например, катионные липосомы, которые формируются на основе катионных амфифилов. Данные соединения обладают рядом преимуществ: способность к упаковке ТНК, сходство с химическим составом природных мембран, низкая цитотоксичность и иммуногенность, и биоразлагаемость.

Использование поликатионных амфифилов с дисульфидной группой позволяет создавать катионные липосомы, обладающие высоким уровнем трансфекции за счет селективного расщепления дисульфидной связи в цитоплазме клеток. При этом положение дисульфидной связи оказывает влияние на чувствительность липосом к действию внутриклеточных восстановителей [1]. В данной работе осуществлен синтез нового поликатионного амфифила с дисульфидной группой в центре молекулы.

В качестве исходного соединения был взят холестерин, к которому через ряд стадий присоединяли спейсерную группу. Полученное соединение бромировали в условиях реакции Аппеля и алкилировали им сульфонамидное производное 3-аминопропанола в условиях реакции Фукуямы. Для введения дисульфидной связи использовали бисульфонамидное производное цистамина, которое алкилировали по атомам азота производным холестерина, полученным на первом этапе, в присутствии диизопропилазодикарбоксилата и трифенилфосфина. На заключительных стадиях осуществляли удаление защитных групп. Структура целевого амфифила, а также всех промежуточных соединений подтверждена данными физико-химических методов анализа.

Таким образом, нами получен новый поликатионный амфифил с дисульфидной связью в центре молекулы. Соединение будет использовано для формирования катионных липосом для доставки ТНК.

1. Puchkov P.A., Shmendel E.V., Luneva A.S., Zenkova M.A., Maslov M.A. Position of disulfide bond determines the properties of novel stimuli-responsive cationic lipids // *ChemistrySelect.* – 2020. - V. 5. - P. 4509–4514.

Исследование было поддержано при финансовой поддержке Минобрнауки России (проект № 0706-2020-0019)

Синтетические олигонуклеотиды - потенциальные терапевтические агенты и поиск новых мишеней *in vitro* и *in vivo*

Сергеева О.В.¹, Щербинина Е.¹, Абакумова Т.¹, Курочкин И.¹, Зацепин Т.^{1,2}

¹ Сколковский институт науки и технологии, Москва, Россия

² Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Синтетические препараты на основе нуклеиновых кислот приобретают всё большую популярность в качестве терапевтических средств. Уже больше 15 препаратов на основе мРНК и антисмысловых олигонуклеотидов получило одобрение от Управления по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) и Европейского агентства по лекарственным средствам (EMA) [1]. Применение терапевтических нуклеиновых кислот нацелено на модулирование экспрессии генов и привлекает внимание за счет высокой специфичности и длительности действия для лечения наследственных и приобретенных заболеваний. Однако также имеется ряд проблем, связанных с деградацией олигонуклеотидов под действием нуклеаз и неспецифичностью действия при наличии гомологичных мишеней, а также активацией иммунитета. Для решения этих вопросов ведется поиск новых химических модификаций синтетических нуклеиновых кислот, адресных методов доставки и специфичных новых мишеней для терапии [2]. В рамках данной работы мы валидировали РНК-хеликазу DDX3 в качестве мишени для терапии синтетическими мРНК в гепатоцитах, а также охарактеризовали потенциальный новый биомаркер - длинную некодирующую РНК LL35 *in vitro* и *in vivo*. Мы показали, что эффективность ингибирования мРНК DDX3 синтетическими мРНК *in vitro* и *in vivo* влияет на фенотип гепатоцитов, а при снижении уровня мРНК более чем на 85% приводит к гибели клеток, что необходимо принимать во внимание при разработке терапии на основе этой мишени. Для характеристики длинной некодирующей РНК LL35 было использовано ингибирование антисмысловыми олигонуклеотидами *in vitro* и *in vivo*. Показано, что количество РНК LL35 снижено в раковых гепатоцитах и при частичной гепатектомии. Анализ транскриптома, протеома, липидома и метаболома *in vitro* и *in vivo* показал, что LL35 вовлечена в регуляцию процессов гликолиза и биосинтеза липидов. Полученные данные демонстрируют необходимость комплексного подхода к поиску как новых мишеней для терапии, так и применения синтетических нуклеиновых кислот в качестве терапевтических агентов.

1. Goga A., Stoffel M. // *Therapeutic RNA-silencing oligonucleotides in metabolic diseases. Nat Rev Drug Discov.* – 2022. – V. 21. – P. 417-439.
2. Kulkarni J., Witzigmann D., Thomson S., Chen S., Leavitt B., Cullis P., Meel R. // *The current landscape of nucleic acid therapeutics. Nat Nanotechnol.* – 2021. – V. 16. – P. 630-643.

Исследование было поддержано грантами РФФ № 19-74-00119, 17-74-10140.

Peptidyl-oligonucleotide conjugates: implementation of the idea of sequence-specific RNA cleavage with catalytic turnover

Staroselets Y.Y., Zenkova M.A.

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

An idea of sequence-specific RNA targeting started from antisense oligonucleotides (ASOs) and now has evolved into rapidly growing area utilizing great variety of chemically modified and fancy designed ASOs and newly adopted approaches including siRNA and CRISPR/Cas. Peptidyl-oligonucleotide conjugates (POCs) synthetic ribonucleases with amphiphilic peptide remained in the background for a long time and only recently have emerged as promising RNA-targeted agents.

POCs consist of the recognition ASO based motif that brings the sequence selectivity through hybridization with the target RNA and the catalytic group that cleaves the phosphodiester bond. The functions of catalytic group is executed by short amphiphilic peptide (up to 10-mer), consisting of alternating leucine and arginine residues promoting transesterification via simultaneous action of two guanidinium groups. This foundation allowed designing a variety of structural variants of POCs including “linear”, “dual”, “bulge-inducing”, “hairpin” and “crab” conjugates, expanding the variety of POCs with a set of linker structures [1].

POCs proved to be pretty versatile instrument applicable to both short and long targets like miRNAs and mRNAs, respectively. The latter are challenging targets because of secondary and tertiary RNA structures that can prevent the binding with POC. However the correct choice of target site and accurate POC design allow destroying selected RNA. Moreover complex tertiary structural elements make distant regions vulnerable for cleavage by POCs, amplifying number of cleaved linkages, which might be advantageous in achieving total inhibition of targeted RNA. This effect is a special feature of POCs in comparison with other RNA targeted techniques.

The thorough investigation of various structural options of POCs cleaving both short and long substrates allowed developing a model describing interaction of POCs with RNA targets in kinetic terms [2]. This model helped to reveal such hidden effects as imperfect conjugate-conjugate self-associations and ‘double-substrate’ occupancy of POCs at higher substrate concentrations, influencing final efficiency of POCs.

1. Staroseletz Y. Gaponova S. Patutina O. Bichenkova E. Amirloo B. Heyman T. Chiglintseva D. Zenkova M. *Molecules*. 2021;26:1732. doi: 10.3390/molecules26061732.
2. Amirloo B., Staroseletz Y., Yousaf S., Clarke D.J., Brown T., Aojula H., Zenkova M.A., Bichenkova E.V.. “Bind, cleave and leave”: multiple turnover catalysis of RNA cleavage by bulge-loop inducing supramolecular conjugates. *Nucleic Acids Res.* 2022; 50(2): 651–673.

The work was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 19-74-30011.

Оценка противовирусного потенциала модифицированных гетероциклических оснований и аналогов нуклеозидов в отношении SARS-CoV-2

Хандажинская А.Л.¹, Матюгина Е.С.¹, Новиков М.С.², Маслова А.А.¹, Кезин В.А.¹, Козловская Л.И.^{3,4}, Волок В.П.³, Шустова Е.Ю.³, Ишмухаметов А.А.^{3,4}, Кочетков С.Н.¹

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

² Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

³ ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», Москва, Россия

⁴ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

Пандемия, вызванная бетакоронавирусом SARS-CoV-2, унесла более 4 миллионов жизней [1]. Несмотря на разработку и применение вакцин против COVID-19, данное заболевание остаётся серьёзной проблемой мирового здравоохранения. К настоящему моменту не существует общепринятых эффективных методов терапии COVID-19, в связи с чем создание специфических препаратов для лечения этого заболевания остается весьма актуальной задачей, для решения которой используют различные подходы: препараты на основе антител, ингибиторы вирусных ферментов (РНК-зависимой РНК полимеразы, протеаз и др.), ингибиторы проникновения вируса в клетку, и др.[1]. В рамках перепрофилирования существующих лекарственных средств во всем мире ведутся интенсивные исследования препаратов, созданных для терапии других вирусных (грипп, ВИЧ инфекция, гепатит С, лихорадка Эбола и др.), бактериальных и паразитарных инфекций, аутоимунных, онкологических и других заболеваний [1]. В контексте данной стратегии проведен скрининг библиотеки аналогов гетероциклических оснований и нуклеозидов, полученных нами ранее и показавших противовирусную, антибактериальную, противопаразитарную или антипролиферативную активность.

Противовирусную активность определяли по способности исследуемых соединений ингибировать гибель клеток Vero, индуцированную заражением штаммом ПИК35 вируса SARS-CoV-2. В качестве положительного контроля использовали N-гидроксицитидин. В результате скрининга выявлены соединения-лидеры, способные ингибировать размножение вируса SARS-CoV-2 со значениями EC₅₀ в диапазоне 20-70 мкМ [2]. Структуры данных соединений могут быть использованы для дальнейшей оптимизации с целью создания противовирусного препарата.

1. https://covid-nma.com/living_data/index.php.

2. Matyugina E.S., Novikov M.S., Kozlovskaya L.I., Volok V.P., Shustova E.Y., Ishmukhametov A.A., Kochetkov S.N., Khandazhinskaya A.L. Evaluation of the Antiviral Potential of Modified Heterocyclic Base and 5'-Norcarbocyclic Nucleoside Analogs Against SARS-CoV-2. // *Acta Naturae*. - 2021 - V.13(4) - P 78-81.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (государственное задание по теме «Аналоги компонентов нуклеиновых кислот как потенциальные ингибиторы коронавирусов») и РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-60414.

Фосфоаналоги аминокислот и S-аденозилметионина: синтез и биологическая активность

Хомутов А.Р.

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Замена карбоксильной группы аминокислот на кислый фосфорсодержащий фрагмент приводит к обширному семейству аналогов общего вида:



Этот тип веществ отличается пространственными характеристиками и имеет отличные от аминокислот константы ионизации, в том числе и рКа H₂N-группы. Тем не менее, аминофосфонаты способны вмешиваться в метаболизм аминокислот как на уровне изолированных ферментов, так и на уровне целостных организмов, причем их действие может проявляться на различных стадиях метаболизма.

Среди фосфоаналогов аминокислот наиболее исследованными являются аминофосфоновые кислоты, а также их производные (X= HO, CH₃, R', OR'', NHR''''), фосфорсодержащий фрагмент которых рассматривается как стабильный аналог промежуточного тетраэдрического состояния карбоксильной группы в превращениях соответствующих аминокислот. Среди производных аминофосфонатов найдены эффективные ингибиторы многих ферментов, например пептидаз, аминоацил-тРНК-синтетаз, синтетазы глутамината и т.д.

Аминофосфонистые кислоты (X=H) принципиально отличаются от аминофосфоновых кислот, так как их однозарядный фосфорсодержащий фрагмент представляет собой сплюснутый тетраэдр, который в ряде случаев хорошо моделирует плоскую однозарядную карбоксильную группу. Поэтому, проникнув в клетку, некоторые фосфонистые аналоги аминокислот способны действовать не только как таковые, но и претерпевать субстратоподобные превращения, приводящие к образованию новых биологически активных метаболитов.

Синтезированы фосфоновые и фосфонистые аналоги метионина, S-аденозилметионина, S-аденозилгомоцистеина, глутаминовой кислоты и аланина. Рассматривается взаимодействие декарбоксилазы S-аденозилметионина (ключевой фермент на путях биосинтеза полиаминов спермина и спермидина) с фосфоновым и фосфонистым аналогами субстрата; аналогов S-аденозилметионина и S-аденозилгомоцистеина с ДНК-метилтрансферазой Dnmt3a; а также взаимодействие дистальных фосфоаналогов глутаминовой кислоты с декарбоксилазой глутаминовой кислоты и последовательность дальнейших превращений, приводящих к фосфонистому аналогу сукцината. Обсуждаются антибактериальная и фунгицидная активности фосфоаналогов метионина, глутаминовой кислоты, аланина и некоторых их производных.

Работа поддержана грантом РФ № 22-14-00291.

Терапевтические олигонуклеотиды в ГенТерре: дизайн, синтез и валидация *in vitro* и *in vivo*

Челкин А.А.¹, Середа К.Н.¹

¹ АО «ГенТерра»

Применение синтетических олигонуклеотидов в медицине является одним из революционных подходов для эффективной и селективной терапии ряда заболеваний. На сегодняшний день в мире одобрено 15 препаратов, в основе которых синтетические миРНК и антисмысловые олигонуклеотиды [1, 2]. Биотехнологическая компания АО «ГенТерра» предлагает полный спектр услуг по дизайну, синтезу и очистке синтетических миРНК, антисмысловых олигонуклеотидов, аптамеров, гидовых РНК для ингибирования генов-потенциальных мишеней для терапии *in vitro* и *in vivo*, а также специализируется на синтезе праймеров, химически модифицированных олигонуклеотидов, флуоресцентно-меченых зондах, применяемых в ПЦР, ОТ-ПЦР, флуоресцентной гибридизации *in situ*, генотипировании и других методах молекулярной биологии и диагностики. Компания предлагает магнитные сорбенты для выделения нуклеиновых кислот собственного производства, разрабатывает новые ферменты для ПЦР и ОТ-ПЦР и наборы на их основе. АО «ГенТерра» предоставляет услуги по синтезу олигонуклеотидов для применений в доклинических исследованиях (в количествах до нескольких граммов), включая разработку биоаналитических методов (ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС), дополнительные методы очистки, проверку на эндотоксины и тестированию миРНК/антисмысловых РНК *in vitro/in vivo*, а также оценке жизнеспособности, миграции и апоптоза в клетках. Также мы предлагаем различные работы по клонированию и сборке контрольных образцов на основе лямбда и MS2 фагов для *in vitro* диагностики. Команда АО «ГенТерры» открыта к новому сотрудничеству и проектам как в области молекулярной диагностики, так и в научной сфере.

1. Stein S., Castanotto D. FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017.// *Mol Ther.* – 2017.- V. 25. – P 1069-1075.
2. Xiong H., Veedu R., Diermeier S. Recent Advances in Oligonucleotide Therapeutics in Oncology.// *Int J Mol Sci.* – 2021.- V. 22. – P 3295.

Малые интерферирующие РНК для применения *in vivo*

Черников И.В.¹, Гладких Д.В.¹, Веньямина А.Г.¹, Мещанинова М.И.¹, Бишани А.^{1,2},
Зенкова М.А.¹, Власов В.В.¹, Черноловская Е.Л.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

² Новосибирский Государственный Университет, Новосибирск, Россия

Малые интерферирующие РНК (siРНК) считаются новым, многообещающим классом лекарственных средств, способным эффективно и избирательно подавлять экспрессию генов, связанных с заболеваниями. В настоящее время три препарата на их основе, предназначенные для подавления генов-мишеней в клетках печени, уже одобрены для применения в клинической практике.

Конъюгация siРНК с молекулами природного происхождения является наиболее перспективным способом доставки siРНК в клетки-мишени. Для решения проблемы доставки siРНК в клетки нами использованы липофильные аналоги нуклеазоустойчивых siРНК. Показано, что присоединение холестерина к siРНК обеспечивает эффективное накопление полученного конъюгата в клетках без носителя и проявление его биологической активности. При переходе от *in vitro* к *in vivo* появляется необходимость преодоления siРНК дополнительных биологических барьеров на пути к клеткам-мишеням: высокая рибонуклеазная активность сыворотки, ограниченная проницаемость сосудов, фильтрация почками, поглощение фагоцитирующими клетками и накопление в нецелевых органах.

Для решения задачи разработки ингибиторов РНК-мишеней с улучшенной эффективностью и биодоступностью *in vivo* мы использовали платформы sisiРНК (сегментированной siРНК) и супрамолекулярной tsiРНК (тримерной siРНК). Показано, что изменяя длину супрамолекулярных комплексов возможно изменять их биораспределение в организме животного и увеличивать накопление siРНК в целевом органе. Исследование динамики ингибирования целевых генов показало, что применение siРНК *in vivo* выдвигает более высокие требования к нуклеазоустойчивости и биологической эффективности, по сравнению с экспериментами в культуре клеток. Эксперименты на животных наглядно демонстрируют преимущество «тяжелых» паттернов модификации, обеспечивающих длительное подавление экспрессии гена-мишени.

Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 19-14-00251.

Флуоресцентные соединения для анализа биологических макромолекул

Чудинов А.В.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Индоцианиновые красители рядов Cy3, Cy5 и Cy7 характеризуются яркой флуоресценцией и устойчивостью в условиях биохимического анализа.

Полиметиновые индоцианиновые красители исследовали для их применения в качестве индикаторных флуоресцентных красителей в молекулярно-генетического анализе нуклеиновых кислот.

Синтезировали асимметричные цианиновые красители рядов Cy3, Cy5 и Cy7 с реактивной карбоксильной группой на линкерах различного химического строения и функциональными заместителями в хромофорном ядре.

Синтезировали флуоресцентно-меченные 5'-трифосфаты-2'-дезоксисуридина и 2'-дезоксцитидина. Красители связаны через линкер с пиримидиновым основанием по 5-положению транс-алкеновой связью.

Спектральные характеристики красителей после связывания с нуклеотидами практически не изменяются. Красители несущие гидрофильные группы - сульфогруппы, сульфамидные, сульфамидоацильные и четвертичные аммониевые группы ярко флуоресцируют, имеют высокие коэффициенты молярной экстинкции и высокие квантовые выходы флуоресценции.

В ПЦР с праймерами, маркированными по 5'-С6-аминомодификации индоцианиновыми красителями ингибирование Taq ДНК-полимеразы не наблюдается. При взаимодействии продуктов амплификации с матрицей ДНК-зондов в случае красителей с гидрофильными заместителями неспецифическое связывание не наблюдается.

Эффективность флуоресцентного маркирования продуктов ПЦР с немаркированными праймерами и флуоресцентно-мечеными нуклеотидами зависит от химического строения красителей. Эффективность трифосфатов, несущих краситель с отрицательным или положительным зарядом в конъюгированном состоянии, крайне низкая. Значительно выше эффективность трифосфатов с электронейтральными красителями. В ряду электронейтральных красителей, более эффективны красители с гидрофильными заместителями.

Эффективность молекулярно-генетического анализа с использованием трифосфатов дезоксиуридина маркированных индоцианиновыми красителями возрастает в ряду $Cy3 < Cy5 < Cy7$.

С использованием Cy5 флуоресцентно-меченых 5'-трифосфатов 2'-дезоксисуридина в ИМБ РАН разработан, сертифицирован и производится ряд диагностических тест-систем:

Результаты, полученные при исследовании субстратной совместимости и эффективности флуоресцентно-меченных трифосфатов дезоксиуридина, используются при разработке новой платформы для твердофазной ПЦР на чипе.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №20-14-00287.

Растительные экзосомы – переносчики терапевтического экзогенного белка HSP70 в клетки человека

Гараева Л.А.¹, Емельянова С.С.¹, Комарова Е.Ю.², Путевич Е.Д.¹,
Спицына А.С.¹, Штам Т.А.^{1,2}

¹ НИЦ «Курчатовский институт»-ПИЯФ, Гатчина, Россия

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Экстраклеточные везикулы (ЭВ) представляют собой окруженные липидным бислоем нановезикулы, секретлируемые многими клетками¹. В силу того, что ЭВ являются природными переносчиками нуклеиновых кислот и белков, сохраняя их стабильность, разработка систем доставки терапевтических биомолекул на основе ЭВ вызывает широкий интерес у научного сообщества². В том числе и растительные экстраклеточные везикулы (PEVs) рассматриваются как перспективные системы для решения таких задач. PEVs биосовместимы, биоразлагаемы и могут быть получены в значительном количестве. Одним из кандидатов для загрузки везикул является белок теплового шока, HSP70. Так, в ряде работ продемонстрировано, что белки теплового шока, в особенности HSP70, способны активировать врожденный и приобретенный противоопухолевый иммунный ответ организма³.

В настоящей работе PEVs из грейпфрутового сока были выделены и охарактеризованы по размеру, концентрации и морфологии при помощи анализа траектории наночастиц, динамического светорассеяния, атомно-силовой микроскопии и криоэлектронной микроскопии. Используя модели культивирования клеток *in vitro*, было показано, что внеклеточные везикулы грейпфрута высокоэффективны для доставки экзогенных белков, включая HSP70, в различные опухолевые клетки человека. Кроме того, было подтверждено сохранение функциональной активности белков, доставляемых в клеточные линии человека при помощи растительных везикул. В рамках работы было также проанализировано биораспределение нагруженных меченым ¹²⁵I белком растительных везикул в животных тканях и органах *in vivo*. В этих экспериментах было показано, что белок, доставляемый при помощи везикул, более эффективно покидает место инъекции и распространяется по кровотоку. Более того, нагруженный в везикулы белок более эффективно накапливался в почках, печени, селезенке по сравнению со свободным белком ($p > 0.05$). Таким образом, в этом исследовании впервые продемонстрирована эффективная доставка белков, включая иммуномодулирующий Hsp70, с сохранением их функциональности в клетки млекопитающих с помощью нативных везикул растительного происхождения. В совокупности представленные данные могут стать основой для дальнейшего развития фармакологических наносистем.

1. Hessvik NP et al. *Current knowledge on exosome biogenesis and release. Cell Mol Life Sci.* 2018;75(2):193-208.
2. Sil S. et al. *Strategies for the use of Extracellular Vesicles for the Delivery of Therapeutics. J Neuroimmune Pharmacol.* 2019;10.
3. Komarova E. et al. *Hsp70-containing extracellular vesicles are capable of activating of adaptive immunity in models of mouse melanoma and colon carcinoma. Sci Rep* 11, 21314 (2021).

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ (№19-74-20146).

Nucleic acid based constructions for wide range of applications

Эльдиб А.А.¹, Недорезова Д.Д.¹, Анвар М.Ш.¹, Дрозд В.С.¹, Патра Х.К.¹,
Мустафа А.Я.Н.¹, Хусейн З.¹, Куликова А.В.¹, Колпашиков Д.М.^{2,3}

¹ Институт SCAMT, НИУ ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

² Chemistry Department, University of Central Florida, Флорида, США

³ Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida, Флорида, США

Thanks to DNA-Nanotechnology we could develop an advanced generation of different DNA-apparatuses that can be the light of hope to open the door for cancer treatment, and transform diagnostics of viral diseases to be much simpler and cost-effective. Deoxyribozymes evolved from a single probe to the Bi-Deoxyribozyme and have been demonstrating promising improvements in the past years. Deoxyribozymes are single-stranded deoxyribonucleic acids that have enzymatic (catalytic) activity, and especially (10-23) can bind to a certain ribonucleotide sequence and cleave it in a specific site. It acquires this activity due to a catalytic core that can be arranged by hybridization to the target. However, antisense oligonucleotides are showing bright futures towards cancer treatment. We are proposing in this study several DNA-apparatuses that can be activated only in the presence of a cancer marker or viral RNA. These machines give the output by reporting the viral presence or cleaving a specific essential mRNA molecule to kill the cancer cell.

Работа выполнена при поддержке программы «Приоритет 2030»

ЯДЕРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В БИОМЕДИЦИНЕ

Перспективные подходы для повышения эффективности лучевой терапии рака

Бугай А.Н.

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

Хорошо известно, что для улучшения эффективности лучевой терапии необходимо как повышение биологической эффективности действия излучения на опухолевые клетки, так и снижение радиационной нагрузки на здоровые ткани. В последние годы в мировой онкологической практике активно внедряется протонная терапия, в некоторых странах успешно работают и более дорогостоящие ускорители ионов углерода [1]. Значительным преимуществом адронных видов излучений по сравнению с рентгеновскими и гамма-квантами является особенность глубинного распределения поглощенной дозы с максимумом в конце пробега частицы (пик Брэгга) и резким спадом за ним, а также возможность регулирования пробега частиц путем изменения их энергии.

В настоящем докладе приведен обзор перспективных подходов для дальнейшего улучшения эффективности ускорителей медицинского назначения [1,2], таких как использование пучков сверхвысокой мощности дозы, гребенчатых узко коллимированных пучков, радиоактивных пучков, а также различных видов препаратов (наночастицы, протон- и нейтрон-захватные молекулы-мишени, ингибиторы синтеза ДНК и др. радиомодификаторы). Подробно обсуждаются перспективные разработки Лаборатории радиационной биологии ОИЯИ и МРНЦ им. А.Ф. Цыба по исследованиям механизмов действия и применения радиомодификаторов для повышения эффективности лучевой терапии меланомы [2].

1. Durante M., Patera V., Prezado Y., eds. *Applied Nuclear Physics at Accelerators*. – Lausanne: Frontiers Media SA, 2021.
2. VIII Съезд по радиационным исследованиям: Тезисы докладов. – Дубна: ОИЯИ, 2021.

Таргетные агенты на основе аптамеров для доставки изотопа ^{10}B при БНЗТ

Дымова М.А.¹, Новопашина Д.С.¹, Таскаев С.Ю.², Кулигина Е.В.¹, Рихтер В.А.,
Воробьева М.А.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

² Институт ядерной физики имени Г.И. Будкера СО РАН

Одной из самых агрессивных опухолей мозга является глиобластома, характеризующаяся высокой химио- и радиорезистентностью, низкой эффективностью хирургического лечения, и вследствие этого низкой продолжительностью жизни пациента с данным диагнозом [1]. Поэтому разработка новых диагностических и терапевтических подходов для ее лечения представляется актуальной задачей. В качестве перспективного терапевтического подхода рассматривается бинарная лучевая терапия, бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ), в физической основе которой лежит распад изотопа бора ^{10}B внутри опухолевых клетки при облучении потоком эпитепловых нейтронов [2]. В Институте ядерной физики СО РАН создан уникальный ускорительный источник нейтронов нового типа, оптимально подходящий для БНЗТ. Однако до сих пор не решена проблема адресной доставки соединений бора.

Решением данной проблемы могут быть аптамеры, короткие структурированные ДНК и РНК, способные селективно связываться с молекулами-мишенями. Показано, что определенные аптамеры могут связываться с клетками опухоли и проникать в них. Их можно химически модифицировать, в том числе борсодержащими агентами, что делает их привлекательными для использования в качестве доставщиков бора при БНЗТ. В данной работе впервые использованы бормодифицированные $2'$ -фтор-РНК-аптамеры для доставки бора при БНЗТ.

Материалы и методы: в работе использованы клеточные культуры глиобластомы человека U-87 MG и нормальные фибробласты человека hFF8. Для оценки ингибирования пролиферации и жизнеспособности клеток, инкубированных с борсодержащими $2'$ -фтор-РНК-аптамерами и облученных эпитепловыми нейтронами (2 МэВ, 1.4 мАч), использовали анализ RTCA xCelligence и клоногенный тест. Для оценки проникновения аптамеров в клетки глиобластомы человека U-87 MG использовали ОТ-ПЦР и флуоресцентную микроскопию.

Результаты: Показано, что $2'$ -F-РНК-аптамеры способны к специфичной интернализации в клетки U-87 MG. Культивирование клеток U-87 MG с конъюгатами аптамеров с борными кластерами с последующим облучением эпитепловыми нейтронами статистически достоверно снижало их жизнеспособность по сравнению с контролями [3].

Заключение: Впервые показана принципиальная возможность использования модифицированных аптамеров для таргетной доставки соединений бора для БНЗТ. Эффективность их действия может быть дополнительно увеличена за счет выбора оптимального варианта конструкции и режима облучения.

Работа поддержана проектом РНФ 19-74-20127, <https://www.rscf.ru/project/19-74-20127/>

1. Dymova MA, Kuligina E V., Richter VA. Molecular mechanisms of drug resistance in glioblastoma. *Int J Mol Sci* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/ijms22126385>.
2. Dymova MA, Taskaev SY, Richter VA, Kuligina EV. Boron neutron capture therapy: Current status and future perspectives. *Cancer Commun* 2020;40:406–21. <https://doi.org/10.1002/cac2.12089>.
3. Vorobyeva MA, Dymova MA, Novopashina DS, Kuligina E V., Timoshenko V V., Kolesnikov IA, et al. Tumor cell-specific $2'$ -fluoro RNA aptamer conjugated with closo-dodecaborate as a potential agent for boron neutron capture therapy. *Int J Mol Sci* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/ijms22147326>.

Перспективы применения низкотемпературной плазмы атмосферного давления в противоопухолевой терапии

Коваль О.А.^{1,2}, Бирюков М.М.^{1,2}, Патракова Е.А.^{1,2}, Рябчикова Е.И.^{1,2}, Полетаева Ю.Е.², Милахина Е.А.^{3,4}, Закревский Д.Э.^{3,4}, Lin K.-M.⁵, Jen C.-P.⁵, Швейгерт И.В.⁶

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский государственный технический университет, Новосибирск, Россия

⁴ Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН, Новосибирск, Россия

⁵ National Chung Cheng University, Chia-Yi, Taiwan

⁶ Институт теоретической и прикладной механики им. С.А. Христиановича СО РАН, Новосибирск, Россия

Холодная плазма – ионизированный газ, состоящий из заряженных частиц, активных незаряженных частиц, электрического поля и УФ-излучения. Привлекательной особенностью холодной плазменной струи (ХПС) для применения в онкологии является её низкая температура в области непосредственного контакта плазмы с биологическим объектом. Основные эффекты ХПС при облучении биоматериалов обусловлены активными формами азота и кислорода, генерируемыми в плазменной струе.

В ходе работы для генерации ХПС использовали газоразрядное устройство, разработанное сотрудниками ИФП СО РАН. Одной из задач исследования был подбор параметров облучения, при которых возможна селективность цитотоксического воздействия струи по отношению к опухолевым клеткам. При облучении ХПС с оптимизированными параметрами системы, мы продемонстрировали различие в регуляции экспрессии генов белков аквапориновых каналов (AQP-1 и AQP-8) в ответ на облучение раковых и нормальных клеток, а также различия в изменении концентраций внутриклеточных активных форм кислорода и азота. Электронная микроскопия облученных клеток показала, что облучение изменяет структуру цистерн ЭПР и ведет к увеличению размеров ядрышек. Вестерн блот анализ образцов облученных клеток выявил различия в белках ЭПР, участвующих в ответе каталазы на окислительный стресс – глутатион пероксидаз 7 (GrX7) и 4 (GrX4).

Проведены пилотные эксперименты по исследованию изменения проникновения наночастиц золота (AuNPs) в опухолевые и здоровые клетки человека в результате облучения ХПС для разработки новых противоопухолевых подходов.

В экспериментах *in vivo* мы продемонстрировали, что облучение ХПС подкожно растущих опухолей рабдомиосаркомы мыши МХ-7, карциномы кишечника мыши СТ26 и глиобластомы человека U87MG приводит к торможению роста опухолей. Увеличение раундов облучения, использование заземленной подложки и увлажнение воздуха усиливают противоопухолевый эффект. Обнаружено, что комбинированное воздействие на опухоль – непосредственное облучение и внутривенное введение предварительно облученного ХПС раствора Рингера, усиливает противоопухолевое действие указанных методов в сравнении с их применением по отдельности.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 22-49-08003.

Применение препаратов бора для повышения эффективности протонной терапии злокачественных новообразований: настоящее и перспективы

Штам Т.А.^{1,2}, Гарина А.В.¹, Бурдаков В.С.^{1,2}, Гараева Л.А.^{1,2}, Волницкий А.В.^{1,2}, Верлов Н.А.^{1,2}, Амерканов Д.А.^{1,2}, Пак Ф.А.^{1,2}, Лебедев Д.В.^{1,2}, Коневера А.Л.^{1,2}

¹ НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ, Гатчина, Россия

² НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

Протонная терапия используется для лечения многих видов злокачественных опухолей. Протоны быстро теряют энергию в течение последних нескольких миллиметров проникновения в ткани, что приводит к резко локализованному пику поглощённой дозы, называемому пиком Брэгга. Данное свойство протонного пучка используется для облучения труднодоступных для хирургического вмешательства опухолей. Значительно увеличить эффективность лучевой терапии может применение бинарных технологий, при которых поражающий эффект протонного излучения дополнительно усиливается предварительным накоплением радиосенсибилизатора в ткани-мишени. Некоторые препараты, содержащие ¹⁰B, используются в бор-нейтрон-захватной терапии. Было предложено использовать аналогичные препараты в протонной терапии за счет реакции захвата протонов на изотопе ¹¹B с образованием трёх α-частиц для увеличения поглощенной дозы в опухолевой мишени. Содержание изотопа бора-11 в природной изотопной смеси составляет примерно 80%, что позволяет использовать препараты, содержащие природный бор, избегая этапа изотопного обогащения.

Учитывая незначительное число экспериментальных исследований в этой области, целью данной работы было выявление сенсibiliзирующего потенциала соединений ¹¹B ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$; $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$) при облучении протонами на пике Брэгга культивируемых злокачественных клеток. Три клеточные линии A172, Gl-Tr, DU145 предварительно инкубировали с соединением ¹¹B и облучали дозами 0-6 Гр протонами на пике Брэгга. Для экспериментальной проверки вклада ядерной реакции в увеличение чувствительности злокачественных клеток к облучению протонами клеточные культуры также облучались гамма-лучами. Для тетрабората натрия ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) показана радиосенсибилизующая активность, однако коррелирующая с биологическими эффектом, оказываемым препаратом и, по всей вероятности, связанным с наблюдаемым влиянием тетрабората натрия на распределение клеток по фазам клеточного цикла. Для боркаптата натрия ($\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$) наблюдалось отсутствие радиосенсибилизующего эффекта и при облучении протонами на пике Брэгга, и при гамма-облучении. Полученные данные находятся в согласии с расчетами, показывающими недостаточную эффективность захвата протонов ядрами ¹¹B по механизму ядерной реакции для объяснения возможных радиосенсибилизующих эффектов ¹¹B бора при облучении злокачественных клеток человека протонами на пике Брэгга. Таким образом перспективы использования бор протон захватной терапии в клинической практике требуют дальнейших исследований для установления применимости метода.

Работа поддержана НИЦ «Курчатовский институт» (приказ № 2757).

Человеческий сывороточный альбумин – универсальная платформа для создания тераностиков для БНЗТ

Сильников В.Н.¹, Аврамчук Т.В.^{1,2}, Ван М.², Абрамова Т.В.¹, Расколупова В.И.¹, Таскаев С.Ю.³, Дымова М.А.¹, Захарова О.Д.¹, Годовикова Т.С.^{1,2}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия.

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Институт ядерной физики СО РАН, Новосибирск, Россия

В данной работе развита методология получения на основе модифицированных форм человеческого сывороточного альбумина мультифункциональных наноконструкций для тераностики злокачественных опухолей, перемещение которых можно отслеживать в режиме реального времени, и которые «обучены» выслеживать злокачественные опухоли, помечая их флуоресцентной и магнитно-резонансной меткой для МРТ на ядрах ¹⁹F.

Терапевтический эффект достигается посредством бинарного воздействия на опухолевые клетки как посредством воздействия эпитепловых нейтронов на атомы ¹⁰B с последующим распадом на высокоэнергетические альфа частицы и ядра лития (БНЗТ), так и посредством запрограммированного высвобождения химиотерапевтического препарата (гемцитабин-5'-монофосфата или другого противоопухолевого агента) в опухолевых клетках.

В основе методологии лежит постсинтетическая селективная модификация остатка Cys-34 и трех остатков лизина (Lys-525, Lys137 и Lys-205) человеческого сывороточного альбумина путем присоединения к ним репортерных групп, обеспечивающих визуализацию наноконструкции в организме, многоядерных кластеров бора, обеспечивающих БНЗТ и обратимо присоединенной фармацевтической субстанции, отвечающей за противоопухолевый эффект.

Принципиальным отличием предлагаемой методологии от подходов модификации ЧСА различными противоопухолевыми агентами, описанными в литературе, является модификация ЧСА посредством модифицированного тиолактона гомоцистеина [1]. Данная модификация обеспечивает длительную циркуляцию модифицированного ЧСА в крови пациента, что, в свою очередь, позволяет добиться высокой концентрации терапевтического агента в опухоли. С другой стороны, данная методология является не только универсальной в плане возможности введения терапевтических агентов, но и позволяет проводить модификацию ЧСА непосредственно в плазме крови пациента [2].

Результаты проведенных исследований *in vitro* и *in vivo* указывают на то, что мультифункциональная наноконструкция превосходит по противоопухолевой активности как низкомолекулярные противоопухолевые аналоги науклеотидов, так и терапевтический борфенилаланин в условиях БНЗТ.

1. Годовикова Т.С. и др. RU 2644280 (12.12.2016)

2. Годовикова Т.С. и др. RU 2629844 (04.09.2017)

Исследование было поддержано грантам РНФ 19-74-20123. Авторы выражают благодарность Завьялову Е.Л. (SPF-виварий ИЦиГ СО РАН) за организацию работы с лабораторными животными, Коптюгу И.В. (МТЦ СО РАН) за организацию томографических исследований.

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ

Protocol optimization for myeloid-derived suppressor cells generation *ex vivo*

Awad M.S.¹, Markov O.V.¹, Zenkova M.A.¹

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

Among several mechanisms of tumor-associated immunosuppression, a special place is occupied by myeloid derived suppressor cells (MDSC). It has been shown that tumor development is associated with an increase of MDSC number in the peripheral blood and lymphoid organs of cancer patients and tumor-bearing animals by 10 times compared with the level of a healthy organism. MDSC have immunosuppressive functions including suppression of the proliferation and functional activity of both T lymphocytes and antigen-presenting cells as well as activation of different immunosuppressive cells. A comprehensive study of the mechanisms of MDSCs-derived immunosuppression and subsequent development of the approaches of their inhibition depend on the availability of the source of MDSCs for laboratory work. Unfortunately, until today there is no standard method to generate mouse and human MDSCs *ex vivo*, which makes the development of protocols to generate MDSC *ex vivo* a priority.

Murine MDSCs were generated from bone marrow progenitors. In the human model, mononuclear cells from the peripheral blood of healthy donors or CD34⁺ hematopoietic cells from the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia (AML) were used. MDSC progenitors were incubated for 4-9 days with various combinations of growth factors (GM-CSF, G-CSF), cytokines (IL-6, IL-4) and tumor conditioned medium.

To characterize the obtained cells, the phenotype of MDSCs was analyzed by flow cytometric analysis of extracellular markers (human MDSCs – CD11b, HLA-DR, CD14, and CD15; mouse MDSCs – CD11b, MHCII, Ly6-C, and Ly6-G; maturation – CD80, CD86, and F4/80; differentiation – CD11c, CD68) and intracellular markers (TGF- β , MMP-9, and IL-6) as well as an assessment of the expression levels of immunosuppressive (TGF- β 1, IL-10, ARG1, iNOS, IDO, PDL1, VEGF, and MMP-9) and pro-inflammatory (IL-6 and TNF- α) genes was performed with qPCR. Functional activity of the obtained MDSCs was assessed by measuring the levels of immunosuppressive cytokines/growth factors and reactive oxygen species produced by the cells, as well as the inhibitory effect of MDSCs on the proliferation of T-lymphocytes *ex vivo*.

It was demonstrated that the optimal protocol of generation of murine MDSCs involved incubation of bone marrow cells in the presence of 50 ng/ml IL-6, 10 ng/ml or 50 ng/ml GM-CSF and 30% conditioned tumor medium for 4 days that allowed to obtain MDSC with the most optimal phenotype, immunoinhibitory mRNA profile and immunosuppressive functional characteristics. For generation of human MDSC the most optimal protocol included the incubation of bone marrow cells of AML patients in the presence of 50 ng/ml IL-6 and 50 ng/ml GM-CSF for 4 days.

This work was supported by grant RSF №19-74-30011.

Activation of innate immunity by isRNA complexed with different cationic liposomes

Bishani A.^{1,2}, Shmendel E.V.³, Maslov M.A.³, Zenkova M.A.¹, Chernolovskaya E.L.¹

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA, Russian Technological University, Moscow, Russia

Immunostimulatory 19-bp dsRNA (isRNA) with 3'-nucleotide overhangs, which stimulates IFN- α synthesis, suppresses the growth and metastasis of tumors and influenza virus infection in mice was developed in our laboratory.

The efficacy of isRNA depends on the efficiency of its penetration into cells, therefore, various cationic lipids used as delivery system were tested with Human Peripheral Blood Mononuclear Cells *in vitro* and in different mice strains *in vivo* to promote isRNA activity. We used previously developed liposomal nucleic acid delivery system based on polycationic amphiphile 1,26-bis (cholest-5-en-3-yloxy-carbonylamino) -7,11,16,20-tetraazagexacosane tetrahydrochloride and lipid-helper dioleoylphosphatidylethanolamine, supplemented with 2 or 4% of different PEG-containing mono- and di-lipoconjugates that differed in the molecular weight of PEG (800, 1500 and 2000 kDa).

Our data demonstrated that increasing the length of PEG amplified the effectiveness of the interferonogenic activity. Liposomes P2000 and diP2000 in complex with isRNA were the most effective in inducing the secretion of IFNs, cytokines and chemokine MCP-I in CBA mice.

The biological activity of isRNA complexes with P2000 and 2X3 liposomes was tested by the effect on the blood formula in healthy CAB mice after *i.v.* administration of the complexes and by the assessment of their immunostimulating effect in mice with RLS40 tumor implantation. It has been shown that the *i.v.* injection of the complexes increases the number of monocytes in the blood of animals and has an immunostimulating effect on the spleen and tumors of tumor-bearing mice.

This research was supported by the Russian Science Foundation (grant #19-74-30011).

Assessment of oncolytic polioviruses in difference cell models *in vitro* and *in vivo*

Hamad A.^{1,2}, Mahmoud M.¹, Lipatova A.V.²

¹ Moscow Institute for Physics and Technology (MIPT)

² Enghardt Institute of Molecular Biology (IMB)

Treatment of cancer remains one of the most challenging tasks for biomedicine, as it still a main factor of mortalities [1]. Traditional approaches including surgery, chemotherapy, radiotherapy, targeted therapy and new immunotherapies approaches seek to eliminate malignant cancerous cells [2]. Implementation of novel treatment based on the oncolytic viruses (OVs) gave new instruments for treatment of resistant cases [3]. Oncolytic viruses use a bi-lateral mechanism which consist of direct lysis of cancer cells and immunogenic effect that leads to the exposure of tumor antigens and results in the reinforcement of the immune response against cancer cells [4]. *In vitro* cell models are commonly used for assessment of tumor cells sensitivity, but cultivation of cells on artificial media changes cell metabolism and efficacy of viral replication. To assess the overall process of the oncolytic effect on different cell models, we tested different types of RNA-viruses to evaluate their replication effectiveness on cells, cultivating on Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and Human Plasma-Like Medium (HPLM) *in vitro*. We tested vaccine poliovirus type 1 (Sabin), poliovirus type 2, Newcastle Disease virus (NDV H2 strain), recombinant poliovirus type 3 (Russo). Cell cultures were HeLa and Vero, which are sensitive to all of listed strains. Our results show significant difference in the cytopathic effect on both mediums, which means that the oncolytic activity of these viruses was less on HPLM than on DMEM. NDV virus exhibited lower cytopathic effect on HPLM, which shows the importance of using such mediums to assess the effectiveness of oncolytic viruses in the organism in general. This study highlights the importance of developing 3D models for primary cancer cell lines in order to mimic the real effect *in vivo*, which we will further investigate in our research.

1. J. Zeng, X. Li, M. Sander, H. Zhang, G. Yan, and Y. Lin, "Oncolytic Viro-Immunotherapy: An Emerging Option in the Treatment of Gliomas," *Frontiers in Immunology*, vol. 12, p. 4108, Oct. 2021, doi: 10.3389/FIMMU.2021.721830/BIBTEX.
2. Y. Lin et al., "Oncolytic activity of a coxsackievirus B3 strain in human endometrial cancer cell lines," *Virology Journal*, vol. 15, no. 1, pp. 1–12, Apr. 2018, doi: 10.1186/S12985-018-0975-X/TABLES/2.
3. O. Hamid, R. Ismail, and I. Puzanov, "Intratumoral Immunotherapy-Update 2019," *The oncologist*, vol. 25, no. 3, pp. e423–e438, Mar. 2020, doi: 10.1634/THEONCOLOGIST.2019-0438.
4. M. C. Brown and M. Gromeier, "Cytotoxic and immunogenic mechanisms of recombinant oncolytic poliovirus," *Current Opinion in Virology*, vol. 13, pp. 81–85, Aug. 2015, doi: 10.1016/J.COVIRO.2015.05.007.

Antenna-equipped deoxyribozyme-based DNA machine for ultra -sensitivity detection of SARS-CoV-2 RNA

Hussein Z.¹, ElDeeb A.¹, Kolpashchikov D.M.^{2,3,4}

¹ *Laboratory of Molecular Robotics and Biosensor Materials, SCAMT Institute, ITMO University, Saint-Petersburg, Russia*

² *Chemistry Department, University of Central Florida, Florida, USA*

³ *Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida, Florida, USA*

⁴ *National Center for Forensic Science, University of Central Florida, Florida, USA*

Deoxyribozymes are synthetic single-stranded DNA enzymes identified by *in vitro* selection, and they are being developed to be applied in different fields of chemistry, biology and other disciplines, due to their ability to adapt a tertiary structure and catalyze a chemical reaction, such as ligation and cleaving.

For example, RNA-cleaving deoxyribozymes and especially binary deoxyribozyme probes are considered to be promising, highly specific, biocompatible, stable, and easy to synthesize and modify molecular sensors, as they are composed of single strands of DNA molecules forming sensors of two main parts, the catalytic core part cleaving a reporter substrate, and the flanking analyte-binding part that recognizes and binds the target by two arms via Watson-Crick base-pairing, which leads to a signal that can be catalytically amplified by itself.

Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) is one of the most common tests to detect SARS-CoV-2 in samples, but it showed imperfection during the pandemic due to its cost and wait time to get test results, and that has opened the door for deoxyribozyme sensors for the development of a new, inexpensive, and accessible diagnostic.

However, binary deoxyribozyme sensors are limited by their limit of detection (LOD) values compared to RT-qPCR, which are not low enough to replace it in diagnostics, and this calls to find a new way to modify these deoxyribozyme-based sensors to become capable of detecting the wanted analyte with reduced LOD as fast as possible.

Our group has designed and developed a new deoxyribozyme-based DNA machine that can bind the SARS-CoV-2 with two extra arms and is equipped with substrate delivery system in the form of two hooks.

Our nanosystem allows the efficient unfolding and specific identification of the target, the facilitated delivery of the reporter substrate to the sensor's active site and the signal amplification by catalysis, and it showed a drastic decrease in LOD comparing with its ancestors.

Tumor growth factors increase cancer cell sensitivity to Vaccinia Virus

Mahmoud M.¹, Hamad A.^{1,2}, Nefedorova S.I.², Lipatova A.V.²

¹ Moscow Institute for Physics and Technology (MIPT)

E-mail: mahmud.ma@phystech.edu, azzam.hamad@phystech.edu

² Engelhardt Institute of Molecular Biology (IMB)

E-mail: sofianefedorova@yandex.ru, lipatovaav@gmail.com

Malignant neoplasia is one of the most common causes of death, and its incidence is increasing every year. The number of cases of resistance to chemo and radiotherapy is also growing which merits the development of new therapeutic approaches [1]. Virotherapy is a promising method for treatment of solid tumors, and for now FDA has approved the strain for virotherapy of melanoma and glioma- T-VEC (HSV-1 derived oncolytic virus expressing GM-CSF) [2].

Vaccinia Virus (VV) is a non-pathogenic double-stranded DNA virus with natural tropism to tumor cells [3]. This virus has many unique features, making it a cross-functional agent for anti-tumor therapy. First, VV has a large genome, convenient for genetic manipulations and insertion of extensive multicentric DNA cassettes, without severe reduction of the virus replication efficacy[5]. Previously, VV was used as a live vaccine in the smallpox eradication program of the World Health Organization and vaccination of 2 billion people, which made it very safe for parenteral administration [4].

We have developed a recombinant strain of VV (on the base of Lister strain LIVP), expressing Firefly Luciferase and tagRFP reporter gene. This recombinant strain was used for accurate quantitative assessment of replication efficacy using bioluminescence assay using microplate reader. Preliminary treatment of cancer or normal cells with tumor growth factors leads to changes in replication rates. We have determined enhancement of replication after treatment of tumor cell lines (model lines DBTRG, U251-MG, HeLa, as well as a primary glioma cell line) with Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) and Epidermal Growth factor (EGF). On the other hand, transforming growth factor beta1 (TGF β 1), Platelet-derived growth factor (PDGF) and anti-EGFR therapy (Gefitinib) decreased the replication efficacy of VV in human embryonic fibroblasts. We are planning to examine impact of EGF and FGF2 expression into VV replication efficacy on in vivo model of immunocompetent mice to propose design of improved therapeutic strain with enhanced oncoselectivity.

1. “Arita N., Taneda M., Hayakawa T. Leptomeningeal dissemination of malignant gliomas. Incidence, diagnosis and outcome //Acta neurochirurgica. – 1994. – T. 126. – №. 2. – C. 84-92.”.
2. “Pol J, Kroemer G, Galluzzi L. First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy //Oncoimmunology. – 2015. – T. 5. – №1”.
3. “Guo ZS, Lu B, Guo Z, Giehl E, Feist M, Dai E, et al. Vaccinia Virus-Mediated Cancer Immunotherapy: Cancer Vaccines and Oncolytics. *J Immunother Cancer* (2019) 7(1):6. doi: 10.1186/s40425-018-0495-7”.
4. “F. Fenner, Risks and benefits of vaccinia vaccine use in the worldwide smallpox eradication campaign. *Res Virol* 140, 465-466; discussion 487-491 (1989).”.
5. “S. H. Thorne, D. L. Bartlett, D. H. Kirn, The use of oncolytic vaccinia viruses in the treatment of cancer: a new role for an old ally? *Curr Gene Ther* 5, 429-443 (2005).”.
6. S. Chaurasiya, Y. Fong, and S. G. Warner, “Oncolytic virotherapy for cancer: Clinical experience,” *Biomedicines*, vol. 9, no. 4. MDPI AG, Apr. 01, 2021. doi: 10.3390/biomedicines9040419.

The work was supported by the Russian Science Foundation (grant no. 20-75-10157)

Identification of tumor-associated neutrophil phenotype

Sounbuli Kh.¹, Mironova N.L.¹, Alekseeva L.A.¹

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

Neutrophils are considered as homogeneous population with anti-microbial functions. Recently, several studies shed the light on their heterogeneity and multifunction in different physiological and pathological conditions, including cancer. Tumor-associated neutrophils are supposed to have an anti-tumorigenic phenotype (N1), explained by their ability to eliminate tumor cells, or pro-tumorigenic phenotype (N2), supporting tumor growth and metastasis. Their different effects in cancer and their ability to gain one or another phenotype are not fully understood, however, these phenotypes are discovered in tumor environment. Spleen is an important organ of hematopoiesis, a depot for recruiting naive neutrophils and to provide an immune response. At the same time spleen is a place for secondary migration of neutrophils after visiting a tumor node. Thus, studying neutrophil profile from spleen of laboratory animals with different cancer types is an urgent mission potentially revealing consequences of the tumor-neutrophil interplay.

Neutrophils were isolated from spleen of mice bearing Lewis lung carcinoma LLC, lymphosarcoma RLS40, melanoma B16-F10 or healthy controls. Gene expression of different anti-tumorigenic (IFNA1, SIRT1, ICAM1) and pro-tumorigenic (ARG1, CCL17, MMP9, NOS2, VEGFA, STAT3) neutrophil markers were studied using qPCR.

In the spleen samples isolated from LLC-bearing mice with large tumor nodes, neutrophils with pro-tumorigenic phenotype characterized by increased expression of ARG1, CCL17, MMP9 and VEGFA were found. For splenic neutrophils taken from other tumor-bearing mice, gene expression profile seems to be corresponding to mixed N1/N2 phenotype; an increased expression of such markers of N2 phenotype as MMP9, VEGFA, STAT3 and medium expression of CCL17 was found, accompanied with high expression levels of SIRT1 and IFNA1, which indicates their strong anti-tumorigenic function. For neutrophils taken from mice with spontaneously reduced RLS40 primary tumor nodes, N1-like phenotype was detected with high expression levels of ICAM1, IFNA1 and SIRT1, and with high expression levels of MMP9 and VEGFA. Considering that a high expression level of VEGFA and MMP9 in the absence of other N2 markers was detected in neutrophils involved in wound healing, the latter N1-like phenotype may serve as a new, regenerative neutrophil phenotype.

In summary, we showed that splenic tumor-associated neutrophils can express anti-tumorigenic and pro-tumorigenic markers at the same time, which raise the necessity of reconsideration of the traditional N1/N2 classification.

*The authors are grateful to Markov O.V. for valuable contributions to the results analysis.
This work was supported by RSF grant 22-14-00289.*

Dornase alfa reduces the number of metastases in the B16 melanoma model and alters the pattern of cfDNA in the blood serum

Alekseeva L.A.¹, Sen'kova A.V.¹, Zenkova M.A.¹, Mironova N.L.¹

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia*

Many studies have reported an increase in the level of circulating cell-free DNA (cfDNA) in the blood of patients with cancer. cfDNA mainly comes from tumor cells and, therefore, carries features of its genomic profile. Moreover, tumor-derived cfDNA can act like oncoviruses, entering the cells of vulnerable organs, inducing formation of pre-metastatic niche. Another source of cfDNA is immune cells, including neutrophils that generate neutrophil extracellular traps (NETs). Despite the potential eliminative effect of NETs on tumors, in some cases, their excessive generation provokes tumor growth as well as invasion. Considering both possible pathological contributions of cfDNA, as an agent of oncotransformation and the main component of NETs, the study of deoxyribonucleases (DNases) as anticancer and antimetastatic agents is important and promising.

Recombinant human DNase I (commercial name Pulmozyme), which is used for treatment of cystic fibrosis, was repurposed for the inhibition of lung metastases in the B16 melanoma model in mice. We found that Pulmozyme strongly reduced migration and induced apoptosis of B16 cells *in vitro* and effectively inhibited metastases development in lungs and liver *in vivo*. Pulmozyme was shown to be more effective when administered intranasally (i.n.) compared to intramuscular (i.m.) administration. Pulmozyme administered to mice either i.m. or i.n. enhanced the DNase activity of blood serum to the level of healthy animals, significantly decreased cfDNA concentrations, efficiently degraded SINE and LINE repeats and C-MYC fragments in the bloodstream and induced apoptosis in metastatic foci; leading to the inhibition of metastases spread. Thus, Pulmozyme, already an approved drug, can be recommended to prevent lung metastases development.

*The authors are grateful to Savin I.A. for help in the experimental procedures.
This work was supported by RSF grant 19-74-30011.*

Оптимизация ферментативного состава реакции изотермической амплификации NASBA для повышения эффективности детекции вирусных РНК

Антропов Д.Н.¹, Журавлев Е.С.¹, Комиссаров А.Б.², Степанов Г.А.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

² НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург

В настоящее время в связи с тяжелой эпидемиологической ситуацией и появляющимися вирусными инфекциями есть необходимость в быстрой и специфической детекции вирусных агентов в биологических образцах. На замену классическим методам ПЦР и ПЦР в режиме реального времени приходят методы изотермической амплификации, позволяющие детектировать вирусные нуклеиновые кислоты в клинических образцах без использования специализированного оборудования при постоянной температуре.

Так как более 90% вирусных агентов являются носителями РНК-генома, целесообразно использовать методы изотермической амплификации РНК. Самым известным методом амплификации генетического материала РНК-вирусов является метод NASBA (от англ. Nucleic Acid Sequence-Based Amplification), позволяющий за короткое время увеличить концентрацию выявляемого РНК-фрагмента в 10^8 раз. Смесь ферментов в стандартном протоколе NASBA содержит ревертазу AMV, РНКазу H и РНК-полимеразу фага T7 [1]. Мы модифицировали состав ферментов путем добавления в реакционную смесь фрагмента Клёнова ДНК-полимеразы I *E. Coli* и замены ревертазы AMV на «более доступную» ревертазу M-MuLV. Данные замены позволили значительно ускорить время детекции вирусных фрагментов с 2 часов до 15 минут при использовании зондов, специфичных к фрагментам РНК гриппа А и коронавируса SARS-CoV-2. Также, в ходе работы была произведена оптимизация условий детекции амплификации в режиме реального времени.

Предложенный в данной работе протокол детекции вирусных РНК может в дальнейшем стать основой для разработки клинического метода диагностики вирусных заболеваний человека.

1. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* – 1991 – V. 350(6313) – P. 91-92.

Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 122022100238-7.

Митохондриальный фактор инициации трансляции 2 не является обязательным участником трансляции в митохондриях млекопитающих

Балева М.В., Чичерин И.В., Левицкий С.А., Каменский П.А.

*Московский Государственный Университет имени М.В.Ломоносова,
биологический факультет, Москва, Россия*

Митохондрии эукариотической клетки – это не только поставщики энергии для обеспечения всех внутриклеточных процессов, но и один из основных регуляторных пунктов всей клетки. Митохондрии – единственные органеллы не растительной клетки, которые сохранили собственный геном и трансляционный аппарат для его экспрессии. В основном в митохондриях синтезируются небольшое число высокогидрофобных белков – компонентов цепи окислительного фосфорилирования, которая не только участвует в создании энергии в виде АТФ, но дополнительно производит активные формы кислорода (АФК), важнейшие сигнальные агенты клетки. Одним из основных факторов трансляции в митохондриях является белок mtIF2, основной функцией которого является формирование инициаторного комплекса на матрице мРНК. Делеция такого фактора должна приводить либо к остановке митохондриальной трансляции, либо к существенному снижению ее эффективности. Для установления этого факта мы использовали метод редактирования генома с использованием CRISPR-Cas9 системы для внесения в геном делеции, приводящих к возникновению нефункционального белка mtIF2. Анализ продуктов митохондриальной трансляции в клетках полученной линии HeLa показал, что делеция гена mtIF2 не приводит не только к остановке трансляции, но и к сколько-нибудь значимому ее снижению. Также отсутствие mtIF2 не вызывает разбалансировки митохондриальной трансляции, как это происходит при делеции третьего фактора митохондриальной трансляции mtIF3. Тем не менее, биохимический анализ функции митохондрий в клетках с делецией в гене mtIF2 свидетельствует о дисфункции пятого комплекса цепи окислительного фосфорилирования в силу сниженного уровня дыхания, связанного с производством АТФ. Все это указывает на то, что mtIF2 не является обязательным фактором митохондриальной трансляции и может выполнять ряд альтернативных функций, связанных со сборкой и функционированием комплексов цепи окислительного фосфорилирования.

Исследование поддержано грантом Российского Научного Фонда № 21-34-70026 мол_а_мос

Сайт-специфический гидролиз ДНК белком Cas9 системы CRISPR/Cas, как потенциал программированного редактирования генома

Баранова С.В.¹, Черносонов А.А.¹, Коваль В.В.^{1,2}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины, 630090, Россия, Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, д. 8,*

² *Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 630090, Россия, Новосибирск, ул. Пирогова, д. 1.*

Система направленного редактирования генома CRISPR/Cas состоит из двух функциональных элементов: направляющей РНК и белка Cas. Наиболее распространенным и наиболее изученным белком является Cas9. Эндонуклеаза Cas9 представляет собой мультидоменный белок, обладающий ДНК-связывающей и гидролизующей активностями, управляемый при помощи РНК-гидов. Одна часть РНК отвечает за связывание с белком, а другая образует дуплекс с комплементарной ДНК.

Эндонуклеаза Cas9 выполняет проверку последовательности, раскручивая ДНК для определения её комплементарности с двадцатью основаниями спейсера управляющей РНК. Как только целевая ДНК становится связана с управляющей РНК, Cas9 вносит в последовательность-мишень двунитевой разрыв. Разрыв происходит на цепи ДНК между третьим и четвертым нуклеотидами от последовательности, прилегающий к протоспейсеру (PAM). Как правило, для Cas9 это NGG-мотив.

В данной работе изучено влияние положения некомплементарной пары оснований в ДНК-субстрате на эффективность работы фермента. Замены нуклеотидов в положениях около последовательности PAM приводят к снижению скорости реакции расщепления олигонуклеотидов эндонуклеазой Cas9. Показано что ферментативная активность Cas9 может проявляться с не полностью комплементарным ДНК-субстратом.

Полученные данные свидетельствуют о высокой специфичности к ДНК белка Cas9 для РНК-программируемого редактирования генома.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 20-14-00214.

Разработка эффективных методов получения новых производных олигонуклеотидов с гетероциклическими модификациями по межнуклеотидному фосфату

Барановская Е.Е., Васильева С.В., Ломзов А.А., Пышный Д.В.

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

На сегодняшний день олигонуклеотиды являются перспективной базой для разработки терапевтических и диагностических систем, а также для фундаментальных исследований. В последние десятилетия особое внимание уделяется введению модификаций по фосфатным группам олигонуклеотидов, поскольку они отвечают основным требованиям, предъявляемым к терапевтическим олигонуклеотидам, и проявляют устойчивость к действию нуклеаз. Примером таких соединений являются разработанные в ИХБФМ СО РАН фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды [1].

Целью данной работы является развитие эффективных методов синтеза новых видов олигонуклеотидных производных, содержащих межнуклеотидные фосфатные остатки, модифицированные гетероциклическими группами.

В рамках работы были впервые получены производные олигодезоксирибонуклеотидов, содержащие межнуклеотидные *N*-бензимидазольные или -бензокса/(тиа)зольные фосфорамидные группы. Отработана схема введения модификаций по реакции Штаудингера в рамках автоматического твердофазного фосфитамидного метода синтеза. С высоким выходом получены частично и полностью модифицированные как гомонуклеотидные модельные олиготимидилаты, так и различные 10-тизвенные гетеронуклеотидные последовательности ДНК.

Исследована устойчивость полученных олигонуклеотидных производных в кислой среде и показано, что при pH=1 и 37 °С они практически не подвержены кислотному гидролизу. Методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала проведено исследование возможности формирования комплексов модифицированных олигонуклеотидов с ДНК. Полученные данные свидетельствуют о том, что введение данных модификаций снижает термическую стабильность комплементарных комплексов в стандартных условиях (1 М NaCl, pH 7.2), а величина снижения зависит как от типа модификации, так и от ее положения. Показано, что введение модификаций в структуру олигонуклеотидов несколько снижает термостабильность их комплексов при различной ионной силе раствора. Кроме того, установлено, что введение модификаций бензокса(и-тиа)золов приводит к появлению слабо детектируемой флуоресценции олигомеров, тогда как сами модифицирующие азиды такой способностью не обладают.

1. *Bazhenov M., Shernyukoc A., Kupryushkin M., Pyshnyi D. Study of the Staudinger reaction and reveal of key factors affecting the efficacy of automatic synthesis of phosphoryl guanidinic oligonucleotide analogs // Rus. J. of Bioorg. Chem. - 2019. - V. 45. № 6. P. 699-708.*

Исследование частично поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1.

Сывороточный альбумин человека как основа адресных систем доставки противоопухолевых препаратов

Бауэр И.А.^{1,2}, Седельникова А.Ю.^{1,2}, Дмитриенко Е.В.^{1,2}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины,
Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

В области лечения онкологических заболеваний существует острая потребность в разработке новых систем адресной доставки, которые дадут возможность преодолеть трудности, связанные с использованием традиционной химиотерапии. Перспективной основой для таких систем, характеризующихся повышенной специфичностью и контролируемым высвобождением, является человеческий сывороточный альбумин (HSA) вследствие его нетоксичности, биосовместимости, биоразлагаемости и универсальной связывающей способности. Кроме того, HSA способен накапливаться в опухоли либо за счет эффекта повышенной проницаемости и удерживания, либо посредством рецепторопосредованного трансцитоза. Для повышения адресности конструкций на основе альбумина возможно использование направляющих на опухоль лигандов, введение которых может быть осуществлено как путем нековалентного, так и ковалентного присоединения.

Цель данного исследования заключалась в изучении нековалентных взаимодействий сывороточного альбумина человека с противоопухолевым препаратом доксорубицином, направляющим агентом фолиевой кислотой, а также модельными олигонуклеотидами различной природы, которые обладают потенциалом как терапевтических, так и направляющих молекул. В ходе работы на примере доксорубицина и фолиевой кислоты нами было установлено, что изменение таких параметров, как pH или температура регулирует сродство этих соединений к HSA. Влияние природы взаимодействующего лиганда наиболее отчетливо продемонстрировано при изучении комплексов альбумина с модельными последовательностями: нативной и содержащей фосфорилгуанидиновую модификацию в межнуклеотидном фосфате. В процессе исследований показано, что при связывании HSA обнаруживает конформационные изменения во вторичной структуре, влияющие на взаимодействие с выбранными биологически активными соединениями. Нами были успешно проведены исследования по определению эффективности ингибирования роста опухолевых клеток доксорубицином в комплексе с исследуемым белком *in vitro*.

Результаты, полученные в данной работе, могут быть использованы при разработке и конструировании систем направленной доставки лекарственных средств с использованием сывороточного альбумина человека.

Авторы выражают благодарность Бушуевой Т.Ю. и Дюдеевой Е.С. за синтез олигонуклеотидов, Ломзову А.А. за помощь в проведении экспериментов по изотермической титрационной калориметрии, Коваль О.А. и Нуштаевой А.А. за предоставление клеточной линии A549, а также Ковригиной Е.Н. за помощь в проведении МТТ-теста.

Исследование было поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН №121031300042-1.

Воздействие холодной плазмы на 3D клеточные культуры

Бирюков М.М.^{1,2}, Патракова Е.А.^{1,2}, Милахина Е.В.³, Закревский Д.Э.³,
Швейгерт И.В.⁴, Коваль О.А.^{1,2}

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

³ Институт физики полупроводников СО РАН, Новосибирск, Россия

⁴ Институт теоретической и прикладной механики СО РАН, Новосибирск, Россия

Одним из многообещающих противоопухолевых подходов может стать воздействие на опухоль струей холодной плазмы (ХПС), которая представляет собой частично ионизированный газ с температурой, близкой к нормальной температуре тела человека. В многочисленных исследованиях показан цитотоксический эффект генерируемых плазмой активных форм кислорода и азота в отношении адгезивных культур опухолевых клеток, которые являются упрощенной опухолевой моделью. Исследование эффектов ХПС на более сложной трехмерной клеточной модели, так называемых сфероидах, позволит более полно понять цитотоксические возможности ХПС и оптимизировать параметры облучения для дальнейшего применения в экспериментах на животных.

Целью работы было исследование влияния холодной плазмы на опухолевые клетки в составе сфероидов.

В работе использовали газоразрядную установку, разработанную коллективом исследователей ИФП и ИТПМ СО РАН. Установка генерирует холодную плазменную струю (ХПС). Биологические эффекты ХПС изучали на сфероидах, сформированных модифицированными клетками аденокарциномы молочной железы человека MCF7 с гиперэкспрессией рецептора фактора роста EGFR.

В ходе исследования были оптимизированы параметры и условия обработки сфероидов холодной плазмой. Показан цитотоксический эффект ХПС в отношении клеток в составе сфероидов. Облучение плазмой стимулировало выход клеток из сфероидов, уменьшению их размеров и количества сфероидов. Методом проточной цитометрии было показано увеличение количества внутриклеточных активных форм кислорода и азота в клетках сфероидов после облучения. Обработанные ХПС клетки более эффективно захватывались макрофагами, чем контрольные, необработанные клетки.

Проведено сравнения прямого облучения клеток плазменной струей и добавления к клеткам облученной предварительно культуральной среды. Сравнение прямого и опосредованного воздействия ХПС на сфероиды MCF7-EGFR обнаружило большее накопление активных форм кислорода и азота в клетках сфероидов при непрямом воздействии, что далее ведет к большему цитотоксическому эффекту, чем при прямом облучении.

Полученные результаты позволяют лучше понять особенности воздействия плазмы на трехмерные модели опухолей для формирования режимов облучения опухолей *in vivo*, что позволит активно использовать в будущих исследованиях сфероиды, более точно отражающие характеристики опухоли.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 19-19-00255-П.

Возможности прижизненного имиджинга эксплантов эпителия кишечника для персонализированной диагностики и подбора терапии при ВЗК

Болдырева Л.В.^{1,2}, Огиенко А.А.², Сайдакова С.С.^{1,2},
Ачасова К.М.^{1,2}, Кожевникова Е.Н.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия

² Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

Несмотря на большое количество исследований, клинике доступен ограниченный набор средств для лечения воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК): в большинстве случаев удается временно смягчить симптомы заболевания, а полному излечению поддается лишь небольшой процент пациентов. Молекулярно-генетические исследования демонстрируют высокую гетерогенность и индивидуальность механизмов протекания ВЗК, поэтому актуален персонализированный поиск подходов в терапии, в частности – к восстановлению барьерной функции эпителия кишечника.

Наш проект направлен на разработку и стандартизацию моделей *ex vivo* для диагностики и подбора модуляторов синдрома «дырявого кишечника». Целевые параметры моделей: 1. возможность адаптации для работы с образцами кишечника человека; 2. сохранение клеточных и тканевых структур; 3. сохранение фенотипа «дырявого кишечника», возникшего в результате ВЗК. В качестве модели ВЗК используются мыши с мутацией гена *Muc2*, ранее для них мы показали повышенную проницаемость кишечного барьера и нарушение структуры цитоскелета и плотных контактов в энтероцитах. Для получения эксплантов и органоидов использованы культуральные среды DMEM-F12(Sigma), Intesticult(StemCell) и матрикс Matrigel(Corning). Структуры плотных контактов детектированы при помощи антител: α Claudin-3(ab15102, Abcam) и α Claudin-7(QL221418, Invitrogen). Для прижизненного анализа динамики актинового цитоскелета использованы лентивирусная система LifeAct-tdTomato(AddGene) и краситель SiRActin(Spirochrome).

Получены экспланты и органоиды кишечного эпителия и выполнен сравнительный прижизненный анализ динамики цитоскелета с использованием метода FRAP. Органоиды, полученные от *Muc2*^{-/-}, длительно сохраняют увеличенную пролиферацию и морфологию, отличную от дикого типа, но утрачивают характерное для ВЗК нарушение плотных контактов и цитоскелета уже через 48 ч. Время сохранения нативной структуры цитоскелета и межклеточных контактов энтероцитов в эксплантах фрагментов кишечника и изолированных криптах толстого кишечника контрольных животных ограничивается 5 и 3 часами, соответственно. Отработан метод сравнительного анализа с использованием прижизненного имиджинга динамики цитоскелета энтероцитов, позволяющий выполнять прижизненный анализ образцов в пределах 3-5 ч., и метод иммунофлуоресцентного сравнительного анализа структуры плотных контактов в образцах эксплантов с использованием PFA фиксации в нескольких временных точках.

Авторы благодарны Центру коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН за предоставленное оборудование.

Исследование было поддержано грантом РНФ № № 20-74-10022.

Фосфорилгуанидиновые производные олигонуклеотидов как инструменты молекулярной диагностики

Булгакова А.Е.¹, Чубаров А.С.^{1,2}, Дмитриенко Е.В.^{1,2}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет

Нуклеиновые кислоты, их аналоги и производные являются молекулярными инструментами для научных биологических исследований, а также используются для решения практических задач биомедицины, биотехнологии и молекулярной диагностики. Введение химических модификаций в состав олигонуклеотидов позволяет направленно изменять их структуру, свойства, взаимодействие с биологически активными соединениями. Синтетические аналоги нуклеиновых кислот часто обладают улучшенными физико-химическими и биологическими свойствами.

В 2014 г. в ИХБФМ СО РАН были разработаны новые электронейтральные фосфорилгуанидиновые производные олигонуклеотидов (ФГО). В настоящее время непрерывно исследуют их свойства и возможность применения для решения широкого спектра фундаментальных и практических задач. За последние три года в научной литературе не приведено новых данных о синтезе производных нуклеиновых кислот с введением модификаций по рибозо-фосфатному остову сравнимых по свойствам с ФГО.

Наиболее широкое применение в клинической практике получили методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Структура ПЦР-праймеров и дополнительных зондов, таких как TaqMan® probe, в значительной степени определяет эффективность протекания реакции. Продемонстрировано, что ФГ-модифицированные праймеры и TaqMan-зонды являются передовыми инструментами для методов ПЦР. Включение ФГ-модификаций в праймеры для ПЦР приводит к идентификации одиночных несоответствий с помощью аллель-специфичной ПЦР с хорошей специфичностью без значительных потерь чувствительности на обильном фоне ДНК дикого типа. Кроме того, ФГ-модификация может служить универсальным дополнительным нарушением, подобным несоответствию, приводящим к повышению специфичности праймеров.

Полностью модифицированные незаряженные фосфорилгуанидиновые олигомеры связываются с комплементарными последовательностями в низкосолевых и бессолевых условиях. Использование подобных олигонуклеотидов в качестве специфичных зондов дает новые возможности для создания селективных и суперчувствительных НК-биосенсоров. Продемонстрирована возможность образования специфичного гибридизационного комплекса на поверхности кремний на изоляторе (КНИ) биосенсора. Показана высокая чувствительность разработанного подхода, которая составила ~20 молекул анализа в образце, что демонстрирует перспективы КНИ-биосенсора в экспресс-диагностике.

Исследование было поддержано проектом РНФ 22-24-00996.

Создание животной модели абскопального эффекта протонной терапии для экспериментов *in vivo*

Бурдаков В.С.^{1,2}, Куус Е.А.³, Верлов Н.А.^{1,4}

¹ ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина

² НИЦ «Курчатовский институт», Москва

³ Медицинский институт Березина Сергея, Санкт-Петербург

⁴ ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр
специализированных видов медицинской помощи (онкологический)»,
Санкт-Петербург, Россия

Впервые абскопальный эффект (АЭ) был описан в 1953 году Р.Х. Моулом как радиационно-индуцированный эффект, в настоящее время концепция «абскопального эффекта» включает в себя совокупность системных эффектов облучения, имеющих влияние на опухолевых образования «вне поля облучения». Как правило АЭ опосредуется формированием иммунного ответа на ткани опухоли, разрушившиеся под влиянием лучевой терапии.

Одной из задач при исследовании АЭ является создание адекватной экспериментальной модели *in vivo* для оценки эффективности режимов лучевой терапии в части формирования системного ответа на ткань опухоли. В эксперименте использовались самки мышей линии BALB/c, для моделирования опухолевого процесса использовались клетки линии СТ26 (аденокарцинома толстой кишки) вводимые подкожно в количестве 1×10^6 на животное. Животным в экспериментальной группе ($n=10$), за неделю до перевивки опухоли, была введена суспензия клеток линии СТ26, подвергшихся однократному воздействию летальной дозы (30Гр) протонного излучения (медицинская установка VarianProBeam). В качестве контроля, в эксперименте выступали две группы: группа контроль 1 ($n=10$) животным вводили, суспензию облученных ксеногенных клеток линии А172(глиобластома человека), группа контроль 2 ($n=10$) животным вводили суспензию мортализированных циклом последовательных заморозок/разморозок клеток линии СТ26. Также для сопоставления перевиваемости опухоли и скорости роста опухолевого узла была взята группа патогенез ($n=10$), животным проводилась перевивка опухоли без предварительных манипуляций.

Частота перевивки опухолевого узла в группах патогенез и контрольных группах составляла 100%, в экспериментальной группе частота перевивки составила 70%. Медиана выживаемости в группе патогенез составила 24 дня, в группе контроль 1 – 26 суток, в группе контроль 2 – 24 дня. В экспериментальной группе медиана выживаемости составила 32 дня, при этом 3 мыши остались живы до окончания периода наблюдений (60 суток). В экспериментальной группе наблюдалось торможение роста опухолевого узла на 34% и достоверное увеличение длительности жизни и уменьшение риска гибели ($HR = 0.22$ по отношению к группе патогенез) животных в экспериментальной группе (с перевившейся опухолью).

Полученная модель позволяет изучать системные, в т.ч. иммунологические, эффекты индуцированные пострадиационной гибелью клеток в организме животного исключив влияние ионизирующего излучения на него.

Разработка метода синтеза и получение модифицированных по альфа-положению нуклеозидтрифосфатов с использованием реакции Штаудингера

Васильева С.В., Барановская Е.Е., Ломзов А.А., Пышный Д.В.

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

Модифицированные нуклеозидтрифосфатные соединения, имеющие по крайней мере одну модификацию в α -положении трифосфата, имеют большое значение, особенно потому, что после отщепления пиродифосфата они включаются как модифицированные монофосфатные субстраты в протяженные нуклеиновые кислоты с помощью ДНК- или РНК-полимераз. Ферментативным методом синтеза могут быть получены, диастереомерно-чистые ДНК и РНК. Это важно для различных исследований и применений таких как получение аптамеров или терапевтических олигонуклеотидов (в том числе антисмысловых). Нуклеотиды с альфа-фосфатными модификациями оказались важны в секвенировании и ПЦР.

В данном исследовании мы предлагаем осуществление синтеза для получения нового класса нуклеотидов- α -иминофосфатов.

Такие производные можно получить с использованием реакции Штаудингера. Это реакция трехвалентного атома фосфора и азида с электронно-акцепторной группой. В результате образуется пентавалентный фосфор, который через атом азота ковалентно связан с сильной электроноакцепторной группой. Такая структура в отличие от фосфорамидатов резонанс-стабилизирована и модифицирующая группа практически не подвержена кислотному или щелочному гидролизу.

В рамках данной работы впервые разработаны эффективные протоколы синтеза новых соединений - нуклеозидных 5'- α -иминофосфатов по реакции Штаудингера. Эти вещества представляют собой альфа-фосфатные миметики нуклеотидов, в которых атом кислорода заменен соответствующей имино (=N-R)-группой. Были получены различные 5'-иминомонофосфаты нуклеозидов. Разработан химический метод синтеза трифосфатных производных на основе иминомонофосфатов нуклеозидов. Синтезирован тимидин 5'-(1,3-диметилимидазолидин-2-илиден)-трифосфат (ppp(DMI)T). Впервые изучена его гидролитическая стабильность и субстратные свойства по отношению к некоторым ДНК-полимеразам. Было показано, что ppp(DMI)T может служить субстратом для матрично-независимого синтеза ДНК, катализируемого ферментом терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазой (TdT), для получения модифицированных цепей.

Исследование частично поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1. Часть работы, связанная с ферментативным анализом, была профинансирована Российским научным фондом грант № 21-64-00017.

Динамика содержания олигомерных форм уромодулина в моче при моделировании уролитиаза индуцированного внутривенным введением NaOH в эксперименте *in vivo*

Верлов Н.А.^{1,2}, Ланда С.Б.^{1,3}, Гулина Л.С.¹, Бурдаков В.С.^{1,2}, Эмануэль В.Л.³

¹ НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ, Гатчина, Россия

² ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)», Санкт-Петербург, Россия

³ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Уромодулин является доминантным белком мочи, специфически экспрессируемым в эпителии, выстилающем просвет нефрона в толстом восходящем сегменте петли Генле. Одним из механизмов ингибирования кристаллогенеза в моче является способность уромодулина полимеризоваться с образованием олигомеров массой до 28 МДа в растворах с высокой концентрацией одновалентных катионов. Мы предполагаем, что концентрация и олигомерный состав уромодулина в моче может использоваться в качестве маркера диагностики уролитиаза. В исследовании формировались две группы животных по 6 самцов крыс массой 256 ± 8 гр. ($M \pm SD$), в день 0 проводили взятие мочи и внутривенное введение натрия оксалата (7 мг на 100 гр массы, NaOH), ежедневно у животных проводили взятие мочи для биохимического анализа (креатинин, общий белок мочи, натрий, калий, хлор мочи), анализа осадка и исследования фракционного состава коллоида мочи (NTA, NanoSight LM10). Взятие крови (сыворотка) производили в день начала эксперимента и при окончании эксперимента. Через 72 часа после индукции патологии животных выводили из эксперимента, проводили посмертную аутопсию со взятием гистологического материала почек. В день 0 в осадке мочи животных экспериментальной группы кристаллы не обнаруживались, через 48 часов наблюдали единичные кристаллы моногидрата и дигидрата оксалата кальция, через 72 часа число кристаллов в осадке >100 ед. в исследуемом поле (EVOS FL Auto, 40x). Кристаллы в моче животных контрольной группы не обнаруживались в течение эксперимента. Измерение концентрации олигомеров уромодулина в образце мочи проводили ежедневно, в день начала эксперимента концентрация олигомеров уромодулина в моче составила $6,0 \pm 0,32$ E12 частиц в мл (D10: $93 \pm 2,8$ нм, D50: $158 \pm 4,9$ нм, D90: $261 \pm 5,1$ нм), через 24 часа после введения NaOH концентрация снизилась до $2,1 \pm 0,12$ E11 частиц в мл (D10: $75 \pm 1,1$ нм, D50: $120 \pm 4,7$ нм, D90: $205 \pm 7,8$ нм). Изменение концентрации через 48 и 72 часа не показало существенной динамики в изменении концентрации в сравнении с интервалом 24 часа ($2,2 \pm 0,31$ E11 и $2,0 \pm 0,23$ E11, соответственно). Гистологический анализ не выявил изменений в ткани почек животных контрольной группы, в экспериментальной группе у всех животных был подтверждён уролитиаз. Уменьшение концентрации олигомеров уромодулина и изменение фракционного состава мочи регистрировались через 24 часа, тогда как кристаллы в моче обнаруживались спустя 48 часов.

Активация ретротранспозиции LINE1 комбинациями эпигенетически активных соединений с дестабилизаторами хроматина в клетках ОМЛ

Власова О.А.¹, Магомедова Х.М.², Чернова И.А.¹, Борунова А.А.¹, Заботина Т.Н.¹, Кирсанов К.И.^{1,3}, Якубовская М.Г.¹

¹ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина», Москва, Россия

² ФГБУ «ИТХТ им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Выявление нарушений эпигенетической регуляции транскрипции при ОМЛ в последние два десятилетия обосновали перспективность применения эпигенетически активных препаратов в терапии ОМЛ, а новые данные о функционировании генома позволяют полагать, что соединения, влияющие на организацию хроматина, могут модулировать терапевтический эффект таких лекарственных препаратов, способствуя увеличению доступных для транскрипции участков ДНК. Однако чрезмерное воздействие на структуру хроматина может привести к ряду нежелательных эффектов, таких как увеличение генетической нестабильности в результате активации ретротранспозонов. Для адекватной оценки целесообразности использования комбинаций эпигенетически активных препаратов с различным механизмом действия необходимо учитывать не только их воздействие на экспрессию генов супрессоров опухолевого роста, но и их влияние на ретротранспозицию LINE1.

Для препаратов амсакрин и CBL0137 и для полифенола кверцетин на линиях клеток ОМЛ методом Вестерн Блоттинг было показано значительное вытеснение из хроматина линкерного гистона H1.2, что подтверждает механизм их действия путем дестабилизации хроматина. На клетках линий THP1 и KG1 с использованием резазуринового теста оценено влияние данных соединений на цитотоксическое действие эпигенетически активных препаратов: 5-азацитидина, децитабина и вориностата. Выявлен синергизм в действии амсакрина и 5-азацитидина, для других изучаемых комбинаций препаратов тип взаимодействия различался в зависимости от используемых концентраций.

Влияние ремодуляторов хроматина на индуцированную 5-азацитидином, децитабином и вориностатом активацию ретротранспозиции LINE1 оценивали методом иммунофлюоресцентного окрашивания клеток (антителами к белкам ORF1 LINE1 и H2Ax-γ) с последующим анализом распределений популяций клеток по интенсивности флюоресценции с помощью проточной цитометрии. Показательные результаты были получены для комбинаций вориностата (10 μM) с амсакрином (0,26 μM) и с кверцетином (0,54 μM): наблюдалось статистически значимое увеличение средней интенсивности флюоресценции клеток, обработанных комбинацией препаратов, по отношению к контролю в отличие от клеток, обработанных только вориностатом. Количество белка ORF1 LINE1 увеличилось в 2,16 и 1,84 раз для двух комбинаций соответственно, а количество белка H2Ax-γ в 4,89 и 3,18.

Таким образом, было показано, что ремодуляторы хроматина обладают цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток ОМЛ и могут увеличивать экспрессию ретротранспозонов LINE1, индуцированную эпигенетически активными противоопухолевыми препаратами.

New generation of hairpin miRNases with two catalytic peptides: “Fork”-conjugates for efficient cleavage of oncogenic miRNA in tumor cells

Gaponova S.K.^{1,2}, Patutina O.A.¹, Heyman T.², Chiglintseva D.A.¹, Bichenkova E.V.²,
Zenkova M.A.¹

¹ Institute of chemical biology and fundamental medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Manchester Pharmacy School, University of Manchester, Manchester, UK

Design and investigation of oligonucleotide agents for selective inhibition/cleavage of disease-associated RNAs, in particular, microRNAs (miRNAs), represent an extremely perspective research trend nowadays. Remarkably high efficiency and specificity of miRNA-based therapeutics is proved by several medications developed for cancer treatment that are currently undergoing clinical studies.

In our previous works, we have designed absolutely new miRNA-targeted agents – miRNases, that bind with certain oncogenic miRNAs via oligonucleotide part and lead to degradation of the substrate by means of a catalytic peptide. Such oligonucleotide-peptide conjugates provide quantitative cleavage of miRNAs in tumor cells, work synergistically with RNase H and ensure complex inhibition of carcinogenesis processes. Based on these promising data, we suggested that introduction of an additional peptide into the structure of such miRNases might provide reinforcement of their catalytic activity. So, here we created a series of conjugates with hairpin oligonucleotide component and two catalytic peptides [(ArgLeu)₂Gly]₂ in different conformation (α or β), named “Fork”-conjugates. The conjugates were targeted to highly-oncogenic miR-21 and miR-155 which expression is closely associated with the development of a wide variety of oncological diseases.

Designed “Fork”-conjugates quantitatively bind with miRNA-targets, provide complete degradation of miRNAs in 72 h, cleave the substrate in the catalytic mode and work synergistically with RNase H, that provides up to 10-fold increase in the miRNA cleavage efficiency. In addition, “Fork”-conjugates promote up to 3-fold drop in miRNA level in tumor cells that has a direct impact on their ability to proliferate: treatment of various tumor cells including human breast cancer cells MCF7, human epidermoid carcinoma KB-8-5 and murine melanoma B16 cells with “Fork”-conjugates even in a low concentration (200 nM) promote up to 7-fold decrease in proliferation. This new conjugate, if proven successful in preclinical studies, could open a new line of thought in the treatment of not only miRNA- but also other RNA-associated diseases.

This work was supported by RSF grant #19-14-00250.

Influence of liposomal composition of delivery agents on biodistribution, accumulation and biological effects of therapeutic nucleic acids *in vitro* and *in vivo*

Gladkikh D.V.¹, Chernikov I.V.¹, Smendel E.V.², Maslov M.A.², Zenkova M.A.¹, Chernolovskaya E.L.¹

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia*

² *Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA, Moscow Technological University, Moscow, Russia*

Application of nucleic acids (NA) as new pharmaceuticals intended for the treatment of complex multifactorial diseases is limited by the problem of their delivery to target cells in a bioavailable form. The use of cationic liposomes for NA delivery is one of the possible ways to solve this problem.

We prepared a series of liposomes based on polycationic lipid 1,26-bis(cholest-5-en-3 β -yloxy-carbonylamino)-7,11,16,20-tetraazahexacosan tetrahydrochloride (2X3), lipid helper dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) containing targeted and protective components. The target part was represented by folate-containing lipoconjugate, lipoconjugates with PEG chains of different lengths (P800, P1500, P2000) and structure (diP800, diP1500, diP2000) were used as a shield.

In vitro assessment of the cellular accumulation and biological activity of liposomes/siRNAs complexes formed at various N/P ratios (1/4, 1/6, 1/8), showed that lipoplexes with P800/diP800 show the best, and P2000 the worst results in KB-3-1 cells the serum-free medium. In the presence of serum, the highest efficiency was detected for complexes with P1500, and the worst for its “loop-like” analog diP1500, as well as for P800.

The dynamics of siRNA concentration after iv administration of its complexes with liposomes to CBA mice indicates a rapid elimination from the bloodstream. It was shown that the concentration of siRNA in complex with P2000, P1500, and P800 circulates for a longer time compared to the same siRNA administered in complex with liposomes containing PEG lipoconjugates of similar length, but accepting “loop-like” structure as a shield.

The biodistribution of lipoplexes in the body of healthy mice and organs and mice with xenograft tumor RLS40, grafted sc, after iv administration showed that all complexes accumulate in the main internal organs (lungs, liver, kidneys, spleen), but the presence of a tumor alters the biodistribution by increasing accumulation in the kidneys, and reducing it in the liver. Complexes with diP800 are accumulated most effectively directly in the tumor, lung, and kidneys of mice with RLS40; with diP1500 accumulate more efficiently than other complexes in the liver and spleen. Despite the fact that siRNA-P2000 and siRNA-diP1500 accumulates better in the liver and lungs of healthy mice than its complexes with other liposomes, it has a more pronounced silencing effect when administered in complex with 2X3-DOPE, which indicates higher bioavailability.

This research was supported by the Russian Science Foundation (grant #19-74-30011).

Исследование физико-химических свойств дуплексов фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов с комплементарными ДНК

Гольшев В.М.^{1,2}, Пышный Д.В.¹, Ломзов А.А.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины,
Новосибирск, Россия

² Новосибирский Государственный Университет, Новосибирск, Россия

Короткие фрагменты нуклеиновых кислот (НК) – олигонуклеотиды, их производные и аналоги, имеющие в своей структуре различные модификации, широко используются в качестве молекулярных инструментов как в различных областях фундаментальных исследований, так для решения широкого спектра прикладных задач. Для создания агентов, способных высокоэффективно работать в данных областях необходимо, чтобы олигонуклеотиды обладали рядом свойств, одним из главных среди которых является возможность формировать специфические комплексы с комплементарными последовательностями ДНК и/или РНК.

В 2014г. в ИХБФМ СО РАН разработаны новые незаряженные аналоги НК -фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО). В данных соединениях один из немостиковых атомов кислорода в остатке фосфорной кислоты нуклеотида замещен на гуанидиновое производное, в данной работе на 1,3-диметилимидазолидин-2-имин.

Детально изучены структура и гибридизационные свойства модельных комплексов длиной 8, 10 и 12 пар оснований (ДНК/ДНК и ДНК/ФГО). Для этого проведены исследования методами термической денатурации и остановленной струи с оптической регистрацией сигнала, спектроскопии кругового дихроизма, а так же компьютерного моделирования методом молекулярной динамики. Было показано, что формирование комплексов ДНК/ФГО может быть описано в рамках приближения модели двух состояний. Термостабильность ФГО комплексов с незначительно увеличивается при уменьшении ионной силы раствора и сопоставима с термической стабильностью немодифицированных ДНК/ДНК дуплексов при 100 мМ NaCl. Было показано, что введение ФГ-модификаций не изменяет форму двойной спирали, повышает подвижность модифицированной цепи, а изменение сольватации является наиболее вероятной причиной изменения термостабильности комплексов, что показано как экспериментально, так и при помощи МД моделирования. Изменение активности воды приводит к близким изменениям термостабильности ДНК/ФГО и аналогичным им ДНК/ДНК дуплексам. Дестабилизация ФГ-содержащих ДНК дуплексов происходит в результате значимого увеличения константы скорости диссоциации дуплекса, в то время, как скорости ассоциации отличаются не более чем на порядок.

Полученные данные послужат базисом для дальнейшего использования ФГО в различных приложениях, и позволят создать модели прогностического расчета их гибридизационных свойств с комплементарными ДНК.

1. Kupryushkin M. S., Pyshnyi D. V., Stetsenko D. A. *Phosphoryl guanidines: a new type of nucleic acid analogues //Acta Naturae (англоязычная версия)*. – 2014. – V. 6. – №. 4 (23). – P. 116-118.

Исследование было поддержано грантами РФФИ № 19-34-90127, РНФ № 18-14-00357.

Anti-tumor immunotherapy using combination of oncolytic vaccinia virus and dendritic cell vaccine

Goncharova E.P.¹, Gamburg T.A.²

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS;
630090, Novosibirsk, Russian Federation*

² *Novosibirsk State University*

Dendritic cells (DCs) as professional antigen-presenting cells activate antitumor adaptive immune responses by efficient processing and cross-presentation of tumour antigens to CD8+ T cells followed by activation of tumour-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs). However, DC-based antitumor vaccines have failed to generate significant clinical benefits. A combined immunotherapeutic approach based on DC-based cancer vaccines and oncolytic viruses (OVs) is supposed to exhibit increased effectiveness due to the synergistic action of DCs and OV.

The emergence of multidrug-resistant (MDR) tumor cell populations resulting from different defensive mechanisms in cancer is one of the major obstacles of clinical treatment. Both tumor- antigens and “danger signals”, resulting from oncolysis, may activate DCs upon OV administration in the combined therapy of MDR-positive tumors and increase the effectiveness of treatment. DCs were activated by incubation with lysate of RLS-40 tumor cells infected with vaccinia virus LIVP/GFP. Two schemes of treatment were used in experiments with lymphosarcoma RLS-40(MDR-positive)/CBA mice tumor model: 1) administration of DCs on the 8th day, and the LIVP/GFP virus on 9th day after tumor implantation, and 2) administration of DCs on the 8th day and administration of LIVP/GFP virus twice on the 7th and 9th days after tumor implantation. We showed that single injection of the virus and DCs led to the suppression of tumor growth only in 20% of mice, while double injection of the virus in combination with DCs led to a significant inhibition of tumor growth in 66% of mice. In addition, we found a decrease of liver metastases in mice received both combined therapy and monotherapy with LIVP/GFP virus.

In conclusion, an increase of the frequency of virus administration during the combined therapy of lymphosarcoma RLS-40 led to an increase of therapy effectiveness and a decrease of the liver metastases area, but no synergistic effect of DCs and the virus was observed. These studies should be extended to investigate the different schemes of administration of DCs and oncolytic virus.

This work was supported by Russian Science Foundation RSF # 19-74-30011.

Исследование адсорбции ДНК-дуплексов, содержащих комплементарные несоответствия, на наночастицах золота

Горбунова Е.А.¹, Епанчинцева А.В.¹, Пышный Д.В.¹, Пышная И.А.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

Наночастицы золота (НЧЗ) – одна из ключевых платформ для разработки систем внутриклеточной доставки терапевтических нуклеиновых кислот и колориметрических сенсоров. Ранее в лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН была изучена нековалентная адсорбция одноцепочечных (оц) ДНК на НЧЗ в условиях низкой ионной силы [1]. При этом процесс адсорбции двухцепочечных (дц) ДНК на НЧЗ в литературе описан скупо.

Цель работы – исследование закономерностей нековалентного взаимодействия сферических НЧЗ и ДНК-дуплексов, в том числе содержащих оц-«нависания» с разной нуклеотидной последовательностью, в условиях низкой ионной силы. «Нависания», содержащие разное количество гексануклеотидных высокоаффинных к НЧЗ мотивов [2], располагались на 3'-конце ДНК-цепей.

Установлено, что высокоаффинный мотив служит «якорем» адсорбции олигонуклеотида и способствует эффективной загрузке поверхности НЧЗ его молекулами (до 98±2 молекул на одну наночастицу). Однако при увеличении длины «якоря» эффективность загрузки оцДНК на НЧЗ падает.

Неожиданно включение высокоаффинного мотива в состав олигонуклеотида не повлияло на адсорбцию комплементарного ему олигонуклеотида в составе ДНК-дуплекса. Показано, что и при последовательной, и при одновременной адсорбции олигонуклеотидов, составляющих дуплекс, на НЧЗ, идет конкуренция процесса ассоциации комплементарных ДНК с их адсорбцией на НЧЗ в виде отдельных цепей.

Показано, что при адсорбции оцДНК на НЧЗ подвижность в агарозном геле полученных компактных ассоциатов полностью определяется величиной их отрицательного заряда, который зависит от ёмкости оцДНК на НЧЗ. Как оказалось, подвижность в агарозном геле ассоциатов НЧЗ со смесью комплементарных олигонуклеотидов определяется не только зарядом ассоциата, но и его диаметром. Соотношения ёмкости и подвижности ассоциатов НЧЗ со смесью комплементарных олигонуклеотидов косвенно могут подтверждать возможность формирования ДНК-дуплексов на поверхности одной НЧЗ или между соседними НЧЗ.

1. Epanchintseva A., Vorobjev P., Pyshnyi D., Pyshnaya I. *Fast and Strong Adsorption of Native Oligonucleotides on Citrate-Coated Gold Nanoparticles // Langmuir*. – 2018. – V. 34. – № 1. – P. 164-172.
2. Vorobjev P., Epanchintseva A., Lomzov A., Tupikin A., Kabilov M., др., всего 7 человек. *DNA Binding to Gold Nanoparticles through the Prism of Molecular Selection: Sequence-Affinity Relation // Langmuir*. – 2019. – V. 35. – P. 7916–7928.

Исследование было поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН №121031300042-1.

Фоточувствительные олигонуклеотиды как инструмент регуляции активности системы геномного редактирования CRISPR/Cas9

Горленко Е.С.^{1,2}, Саковина Л.В.^{1,2}, Новопашина Д.С.^{1,2}

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Актуальной задачей молекулярной и синтетической биологии является создание молекулярно-биологических систем с регулируемой активностью. Введение фоточувствительных компонентов в состав конструкций на основе нуклеиновых кислот (НК) позволяет эффективно контролировать их функционирование путем облучения светом в УФ-диапазоне. С одной стороны, НК-конструкцию можно активировать под воздействием света за счет удаления фотоблокирующей группы или расщепления фотолинкера. С другой стороны, с помощью облучения можно разрушить модифицированный биополимер и таким образом добиться подавления его функциональной активности.

Целью данной работы является синтез линейных и циклических блокирующих олигонуклеотидов, содержащих различное количество фоточувствительных линкеров в разных положениях олигонуклеотидной цепи, и исследование их физико-химических свойств, а также возможности активации или дезактивации системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 путем облучения светом.

Для введения фоточувствительного линкера синтезирован фосфитаמיד на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола. С его использованием в ходе автоматического твердофазного фосфитаמידного синтеза получены фоторасщепляемые олигонуклеотиды. Циклические фотомодифицированные олигонуклеотиды получены методом «клик»-химии. Методом задержки в геле показано уменьшение термодинамической стабильности комплекса ДНК-мишени с линейным фоторасщепляемым олигонуклеотидом по сравнению с комплексом, содержащим немодифицированный олигонуклеотид той же последовательности. Изучена кинетика расщепления олигонуклеотида с фотолинкерами под действием УФ-облучения, а также показана возможность деградации блокирующего олигонуклеотида и активации системы CRISPR/Cas9. Показана возможность линеаризации циклического блокирующего олигонуклеотида под действием света и изучена возможность блокировки системы редактирования генома CRISPR/Cas9.

Полученные результаты подтверждают перспективность использования фоторасщепляемых олигонуклеотидов для создания регулируемых систем редактирования генома.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-14-00294.

Наночастицы альбумина для биомедицинских применений

Григорьева Е.В.^{1,2}, Дмитриенко Е.В.^{1,2}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Среди современных наноматериалов для биомедицины стоит выделить наночастицы на основе сывороточных белков, таких как сывороточные белки, которые сочетают в себе высокую эффективность и биосовместимость (нетоксичность, биоразлагаемость) и являются основой для усиления доставки токсичных и/или гидрофобных лекарственных препаратов. Наночастицы данного типа обладают рядом преимуществ: использование препарата путем активного или пассивного нацеливания, пролонгированное действие в опухолевой клетке, контролируемые профили высвобождения лекарственного препарата при введении *in vivo*.

В данной работе разработаны способы получения и стабилизации наночастиц (НЧ) на основе сывороточного альбумина человека для дальнейших биомедицинских применений. Способ синтеза является решающим фактором для контроля размера и морфологии наночастиц. Наиболее популярным и простым методом синтеза является десольватация. Данный метод включает в себя 2 этапа: агрегация белковой молекулы органическими растворителями, а затем фиксация молекул сшивающим агентом – глутаровым альдегидом. Получены НЧ из альбумина ($d = 100.3 \pm 0.3$ нм). Осуществлены варианты функционализации поверхности остатками фолиевой кислоты, которая может выступать в качестве направляющего лиганда при конструировании систем доставки ($d = 180 \pm 4$ нм). Впервые предложен способ получения белковых наночастиц размерами 50 ± 0.2 нм под действием ультрафиолетового излучения. Исследована эффективность загрузки полученных НЧ противораковым препаратом – доксорубицином в двух вариантах: постсинтетическая сорбция доксорубицина на поверхность НЧ и при совместном синтезе в присутствии доксорубицина ($d=150 \pm 4$ нм). Емкость НЧ по лекарственному препарату составила 80 ± 1 мкг/мг и 85 ± 10 мкг/мг. Показан рН-зависимый характер высвобождения препарата. Продемонстрировано отсутствие токсичности наночастиц из альбумина *in vitro*. Изучена эффективность воздействия на клетки линии А549 конструкций наночастица-доксорубицин по сравнению со свободным доксорубицином. Продемонстрировано, что эффективность подавления жизнеспособности клеток наночастицами из альбумина с постсинтетической загрузкой доксорубицина сопоставима со свободным препаратом при инкубации 48 ч и выше при кратковременном контакте (2 ч). В случае локализации доксорубицина внутри белкового коацерватного ядра показано высвобождение препарата под действием протеолитических ферментов.

Исследование выполнено в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 12103130042-1.

Флуоресцентно меченные расщепляемые линкеры для терапевтических конъюгатов антител

Гуляк Е.Л.¹, Сапожникова К.А.¹, Брылёв В.А.¹, Мисюрин В.А.², Коршун В.А.¹

¹ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

² ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

Конъюгат антитело-препарат (antibody-drug conjugate, ADC) представляет собой антитело, ковалентно связанное с низкомолекулярным терапевтическим агентом. Главная область применения таких конъюгатов – терапия онкологических заболеваний путём избирательной доставки противоопухолевых препаратов в злокачественные клетки. Эффективность действия ADC зависит от множества параметров, в том числе от природы линкера, ковалентно соединяющего компоненты конъюгата, сайт-специфичности модификации антитела и числа молекул препарата, связанных с антителом (drug-antibody ratio, DAR).

Линкеры, соединяющие терапевтический агент с антителом, подразделяются на два типа: нерасщепляемые и расщепляемые. Последние представляют особый интерес, так как при попадании ADC в лизосому они подвергаются распаду с высвобождением препарата в исходной форме. В зависимости от конструкции линкера, его расщепление может происходить под действием низкого pH, глутатиона или различных лизосомальных ферментов [1].

Для определения стехиометрии конъюгата антитело-препарат, как правило, используются методы ВЭЖХ и масс-спектрометрии в различных сочетаниях. Значительно более простой подход – измерение DAR по спектру оптического поглощения конъюгата в УФ и видимой области, – на практике сложен в реализации из-за низких коэффициентов молярного поглощения препаратов и/или перекрытия спектров поглощения препаратов и антител [2]. В связи с этим целесообразно ввести в структуру линкера молекулярный фрагмент, обладающий высоким коэффициентом молярного поглощения – краситель. Помимо определения DAR, краситель за счёт флуоресценции даёт возможность изучения действия ADC на клетки *in vitro* методом конфокальной микроскопии.

Нами была выполнена модификация доксорубина расщепляемым линкером на основе дипептида валин-цитруллин и *para*-аминобензилового спирта. Полученный продукт посредством клик-химии был соединён с карбоцианиновым красителем, несущим защищённую оксиаминовую функцию, предназначенную для оксимного лигирования с окисленным периодат-ионом антителом. Данный конъюгат был использован для сайт-специфической модификации моноклонального антитела к опухолевому белку PRAME.

1. Bargh J. D., Isidro-Llobet A., Parker J. S., Spring D. R. Cleavable linkers in antibody–drug conjugates // *Chem. Soc. Rev.* - 2019. - V. 48. - P 4361–4374.
2. Matsuda Y., Mendelsohn B. A. Recent advances in drug–antibody ratio determination of antibody–drug conjugates // *Chem. Pharm. Bull.* - 2021. - V. 69. - P 976–983.

Исследование поддержано грантом РНФ № 20-15-00361.

Пептидные конъюгаты ингибирующих РНКазу Р олигонуклеотидов как основа для создания антибактериальных препаратов

Данилин Н.А.,^{1,2} Матвеев А.Л.,¹ Мещанинова М.И.,¹ Новопашина Д.С.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Создание олигонуклеотидных конструкций направленных на ингибирование РНКазы Р является многообещающим подходом для создания принципиально новых антибактериальных препаратов, поскольку РНКазы Р является ключевым ферментом, необходимым для созревания тРНК и ее инактивация должна приводить к гибели бактерий [1]. Доставка таких олигонуклеотидных конструкций в клетки является необходимым условием для появления терапевтически значимого эффекта. В качестве подхода к решению проблемы доставки было предложено использовать конъюгаты олигонуклеотидов с пептидами способными взаимодействовать с бактериальной клеточной мембраной.

Целью данной работы было создание ингибирующих РНКазу Р олигонуклеотидных конструкций, содержащих на 3'-конце пептиды, способствующие эффективному проникновению олигонуклеотидов в клетки, исследование влияния пептидов на ингибирующую активность олигонуклеотидов в модельной системе, а также исследование способности полученных пептидных конъюгатов проникать в клетки бактерий.

Было показано, что эффективность ингибирования РНКазы Р зависит от природы ингибирующего олигонуклеотида и уменьшается в ряду (РНК>2'-О-метилРНК>ДНК). Введение пептида в большинстве случаев ухудшает ингибирующие свойства, и зависит как от природы олигонуклеотида, так и от типа использованного пептида. Так для пептида, содержащего большое количество остатков гистидина, было показано негативное влияние на ингибирующую активность олигодезоксирибонуклеотида, а для РНК и 2'-О-метилРНК влияние пептида было незначительно. При исследовании способности полученных конъюгатов проникать в клетки бактерий наиболее перспективными оказались три пептида из пяти, исследованных в работе. Регистрировали наилучшее проникновение пептидных конъюгатов олигодезоксирибонуклеотидов и 2'-О-метилРНК.

Таким образом, нами синтезированы пептидные конъюгаты олигонуклеотидов, обладающие способностью ингибировать РНКазу Р, проникать в бактериальные клетки, и являющиеся потенциальными антибактериальными препаратами.

1. Novopashina D.S., Vorobyeva M.A., Nazarov A.S., Davydova A.S., Danilin N.A., Korableva L.S., Matveev A.L., Bardasheva A.V., Tikunova N.V., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V., Altman S., Venyaminova A.G. Novel peptide conjugates of modified oligonucleotides for inhibition of bacterial RNase P // *Front. Pharmacology*. - 2019. - V.10. - P.813.

Исследование выполнено поддержке базового бюджетного финансирования в рамках Государственного задания ФГБУН ИХБФМ СО РАН (2021-2023 гг.) № 121031300042-1.

Стратегия направленного подавления экспрессии генов-мишеней, перспективных для регуляции чувствительности клеток глиомы к действию онколитического вируса

Доме А.С.¹, Степанов Г.А.¹, Васильева Н.С.¹, Семёнов Д.В.¹,
Рихтер В.А.¹, Кулигина Е.В.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

Глиобластома – самый частый и наиболее агрессивный тип опухолевых заболеваний головного мозга. Для изучения молекулярных механизмов формирования и течения глиобластомы существуют модельные клеточные линии, например, U87MG, U251MG, U343MG. Нами был выполнен транскриптомный анализ перечисленных линий клеток, включая анализ РНК-данных секвенирования единичных клеток в условиях обработки онколитическим вирусом, разработанным на основе вируса осповакцины [1]. В качестве стратегии подавления активности генов, участвующих в регуляции чувствительности глиобластомы к данному терапевтическому агенту нами планируется использовать систему CRISPR/RfxCas13d (CasRx)[2]. По результатам анализа данных секвенирования нами был выбран ряд генов-мишеней, подобраны направляющие РНК, а также показана принципиальная функциональность выбранной нами системы в модельных клеточных линиях.

1. Vasileva N., Ageenko A., Dmitrieva M., Nushtaeva A., Mishinov S., др. всего 8 человек. *Double Recombinant Vaccinia Virus: A Candidate Drug against Human Glioblastoma //Life*. – 2021. – Т. 11. – №. 10. – С. 1084.
2. Konermann S., Lotfy P., Brideau, N. J., Oki, J., Shokhirev, M. N., др. всего 6 человек. *Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors //Cell*. – 2018. – Т. 173. – №. 3. – С. 665-676. e14.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 21-14-00195.

Особенности дизайна бинарных антисмысловых олигонуклеотидных агентов (БиАСО) для маркер-зависимой активации терапевтической функции

Дрозд В.С.¹, Эльдиб А.А.¹, Недорезова Д.Д.¹, Колпащиков Д.М.^{2,3}

¹ Институт SCAMT, НИУ ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

² Chemistry Department, University of Central Florida, Флорида, США

³ Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida, Флорида, США

В настоящее время РНКаза Н-зависимая антисмысловая технология (АСО) представляет собой одноцепочечный синтетический фрагмент ДНК длиной 18-22 нуклеотида, сконструированный комплементарно целевой молекуле РНК гена вызывающего интерес. При образовании дуплекса АСО ДНК / целевая РНК формируется субстрат, узнаваемый внутриклеточным ферментом РНКазой Н. В дуплексе ДНК/РНК фермент расщепляет фосфодиэфирные связи РНК компонента, таким образом, приводя к деградации РНК и сайленсингу гена. Многочисленные исследования демонстрируют высокую эффективность технологии *in vitro* и *in vivo*, известны одобренные лекарства на основе антисмысловой технологии.

Не смотря на десятилетия усилий, АСО так и не достигли широкого применения в частных случаях онкотерапии. Наиболее успешны варианты нацеливания на гены лекарственной мультирезистентности в комбинации с цитотоксическими малыми химическими молекулами. Однако, классическая стратегия применения АСО заключается в нацеливании мРНК генов и некодирующих РНК, связанных с развитием рака (например, ангиогенные факторы, факторы роста и маркеров рака, таких как мутантный вариант гена KRAS и др.), что не обязательно ведет к клеточной гибели, а только замедляет прогрессию.

В связи с вышесказанным была выдвинута идея подавления жизненно важных генов домашнего хозяйства, существенных для большинства типов клеток, подавление функции которых приведет к клеточной гибели. Однако, эта же стратегия приведет к множественным побочным эффектам в нормальных тканях, что недопустимо. Поэтому нашей научной группой была разработана концепция бинарных антисмысловых олигонуклеотидных агентов (БиАСО), способных активировать терапевтическую функцию (деградацию целевой РНК) только после взаимодействия с активирующей молекулой нуклеотидной природы (маркер заболевания - активатор). Опухолевые клетки отличаются от нормальных клеток продукцией специфических молекул, сигнализирующих о процессе канцерогенеза - онкомаркеров. Маркерами нуклеотидной природы могут выступать микроРНК, длинные некодирующие РНК, мРНК генов с мутациями.

Чтобы добиться маркер-зависимой активации терапевтической функции, мы исследовали несколько дизайнов БиАСО агентов и обнаружили некоторый паттерн к разработке таких систем. В то же время новая концепция может решить проблему низкой эффективности из-за открывающейся возможности нацеливания антисмысловых агентов нового типа на наиболее жизненно важные гены домашнего хозяйства, оставляя нормальные ткани интактными.

Работа выполнена при поддержке программы «Приоритет 2030», а также программы УМНИК договор № 17789ГУ/2022.

Получение нуклеозид-пептидных конъюгатов методом ферментативной транспептидации для направленной химиотерапии

Елецкая Б.З.¹, Берзина М.Я.¹, Миронов А.Ф.^{1,2}, Жаворонкова О.Н.^{1,2}, Гаврилов Л.А.², Константинова И.Д.¹, Мелихова Т.Д.¹

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

² МИРЭА Российский технологический университет, Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Одним из подходов к усовершенствованию традиционной химиотерапии является избирательное нацеливание терапевтических препаратов на патологические ткани. Направленный транспорт уменьшает системную токсичность и увеличивает действующую концентрацию препарата за счёт его локализации в поражённом органе. Как следствие, растёт эффективность применения противоопухолевого препарата. Конъюгация модифицированных нуклеозидов с пептидными векторами, имеющими специфичность к определённому типу клеток, может служить примером такой эффективной доставки. [1]

При создании нуклеозид-пептидных химерных соединений существуют определённые ограничивающие факторы. Классические химические методы не обеспечивают сайт-специфичной конъюгации из-за полинуклеофильной природы молекулы пептида, что приводит к получению неомогенных продуктов. Чувствительность пептидной молекулы ограничивает использование органических растворителей, сужает диапазон применимых температур, также лимитирована возможность использования сильных окислителей и восстановителей, оснований и кислот. [2]

Применение альтернативного биокаталитического способа сайт-специфической конъюгации пептидов позволяет обойти ограничения методов химического синтеза. Селективный перенос пептида возможно осуществить реакцией транспептидации под действием фермента сортазы А из *Staphylococcus aureus*. Необходимым параметром конструкции пептида является наличие на С-конце LPXTG-мотива (X - любая аминокислота), распознаваемого ферментом. Для второго компонента - нуклеозида обязательно наличие первичной аминогруппы.

Синтетическим методом в С6 положение гетероциклического основания пуринового нуклеозида был введён линкер. В результате биокаталитической реакции произошла «сшивка» нуклеозида и пептида посредством пептидной связи. Конверсию реакции оценивали с помощью обращённо-фазовой ВЭЖХ (составила 70%), идентификацию продуктов проводили методом масс-спектрометрии. Ферментативный подход позволил работать в более мягких условиях по сравнению с химическим синтезом.

1. Hawryłkiewicz, A. and N. Ptaszyńska, Gemcitabine Peptide-Based Conjugates and Their Application in Targeted Tumor Therapy. *Molecules*, 2021. 26(2).
2. Sornay, C., et al., An overview of chemo- and site-selectivity aspects in the chemical conjugation of proteins. *R Soc Open Sci*, 2022. 9(1): p. 211563.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-13-00429).

Многоуровневые наноконструкции с липидной оболочкой на основе золотых наночастиц, нековалентно загруженных siРНК: приготовление, очистка и характеристика

Епанчинцева А.В.¹, Полетаева Ю.Е.¹, Пышная И.А.¹, Рябчикова Е.И.¹, Довыденко И.С.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

Разработка систем доставки нуклеиновых кислот – актуальная научная задача для создания эффективных средств генной терапии против различных заболеваний. Частицы с липидным покрытием, служащие носителем siРНК, являются предметом многочисленных исследований. Ранее мы показали возможность эффективной доставки малых интерферирующих РНК (siРНК) с помощью многоуровневых наноконструкций (МУНК) на основе наночастиц золота (НЧЗ) с липидной оболочкой для подавления синтеза целевого белка [1]. Тем не менее, мы не были удовлетворены качеством полученных наноконструкций, и поэтому в рамках настоящей работы мы искали способы улучшения качества приготовления МУНК.

Для достижения этой цели были определены оптимальные условия для многостадийного процесса получения МУНК. Все этапы сборки и очистки МУНК контролировались методами динамического рассеяния света, просвечивающей электронной микроскопии и спектроскопии оптического поглощения. Были установлены факторы, влияющие на эффективность сборки наноконструкций, их коллоидную стабильность и качество очистки. Эти данные позволили оптимизировать процесс изготовления целевых МУНК и существенно улучшить качество конечного продукта за счет увеличения его однородности и уменьшения количества побочных наноконструкций. Было показано, что даже незначительные на первый взгляд модификации этапов изготовления МУНК влияют на качество конечного продукта.

Оптимизировав все этапы изготовления МУНК, установили, что возможно двукратное увеличение доли целевых наноконструкций в итоговом препарате по сравнению с конечным продуктом оригинальной процедуры [1].

Предложенные в данной работе подходы и методы будут полезны исследователям, которые разрабатывают наноконструкции на основе твердых наночастиц, покрытых липидной оболочкой.

1. Epanchintseva A., Poletaeva J., Dovydenko I., Chelobanov B., Pyshnyi D., др., всего 7 человек. A Lipid-Coated Nanoconstruct Composed of Gold Nanoparticles Noncovalently Coated with Small Interfering RNA: Preparation, Purification and Characterization // Nanomaterials. – 2021. – V. 11. – P. 2775.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 22-15-00228 «Разработка метода определения состава белковой короны на липидных наночастицах при инкубации с сывороткой крови».

Получение химерных триазиламидофосфатных- фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов, эффективно проникающих через мембраны клеток

Жарков Т.Д.¹, Марков О.В.¹, Купрюшкин М.С.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

Модифицированные нуклеиновые кислоты (НК) уже длительное время активно применяются в различных областях молекулярной биологии и биотехнологии. Модификации в их составе позволяют значительно повысить их эффективность при использовании в качестве ПЦР-праймеров, молекулярных зондов и т.п. [1]. Отдельно стоит выделить терапевтические олигонуклеотиды – уже более 10 препаратов на их основе одобрено для клинического использования, и более 40 находятся на различных стадиях клинических испытаний [2]. Химические модификации в составе терапевтических НК способны улучшать критически важные для их применения свойства, в частности проникновение через клеточную мембрану. В связи с этим разработка новых подходов для введения модификаций в состав олигонуклеотидов является актуальной задачей.

Ранее в лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН был предложен метод получения нового класса модифицированных триазиламидофосфатных олигонуклеотидов, основанный на реакции Штаудингера между реакционноспособным 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином и фосфит-триэфирным звеном олигонуклеотида. Апробация метода была проведена на модельных олиготимидилатах, в ходе которой показана возможность введения в триазиновый остов функциональных остатков различной природы, например, гидрофобных и катионных групп. После этого метод был применен для получения гетероолигонуклеотида с липофильными додецильными остатками, а также показана эффективность проникновения подобных конструкций через клеточную мембрану.

В ходе данной работы было исследовано влияние введения дополнительных фосфорилгуанидиновых (ФГ) групп на эффективность проникновения триазиламидофосфатных олигонуклеотидов через мембраны клеток. Был синтезирован набор гетероолигонуклеотидов, содержащих остатки додецила со стороны 3'-конца и остатка флуоресцеина и нескольких ФГ-групп со стороны 5'-конца. Продемонстрирована совместимость триазиламидофосфатной модификации с фосфорилгуанидиновой, а также влияние этих групп на эффективность проникновения через клеточную мембрану в зависимости от расположения и количества ФГ-групп. Кроме того, было показано, что количество ФГ-групп в составе данных конструкций влияет на скорость их накопления в клетках.

1. Juskowiak B. *Nucleic acid-based fluorescent probes and their analytical potential // Analytical and Bioanalytical Chemistry.* – 2011. – V. 399. – No. 9. – P. 3157–3176.
2. Al Musaimi O., Al Shaer D., Albericio F., de la Torre B. 2020 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest // *Pharmaceuticals.* – 2021. – V. 14. – No. 2. – P. 1–14.

Исследование было выполнено при финансовой поддержке гранта РФФ № 19-14-00204.
Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1.

Получение фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидных производных с контролируемой гидрофобностью

Жуков С.А.¹, Марков О.В.¹, Купрюшкин М.С.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

Синтетические олигонуклеотиды в настоящее время нашли широкое применение в различных областях молекулярной биологии, биотехнологии и медицины. Для терапевтического применения олигонуклеотидов особое значение имеют такие свойства, как устойчивость в биологических средах и эффективность проникновения в клетки, которые достигаются путем введения различных модификаций. Существует множество путей введения химических модификаций в структуру олигонуклеотидов, при этом реализация большинства из них зачастую является отдельной синтетической задачей. Разработка подходов, позволяющих унифицировать процедуру введения различных модификаций в состав олигонуклеотида без потери совместимости с протоколами твердофазного амидофосфитного синтеза позволит сделать создание различных олигонуклеотидных конструкций рутинной процедурой.

В ИХФБМ СО РАН был предложен метод получения фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидных производных, основанный на реакции Штаудингера с участием реакционноспособных диаминокарбенийазидов. Данный метод является совместимым с протоколами твердофазного амидофосфитного синтеза, и вместе с тем позволяет обеспечить разнообразие вводимых заместителей, что было продемонстрировано на примере алкильных заместителей различной длины [1]. В данный момент терапевтические средства на основе олигонуклеотидов, содержащих различные фосфорилгуанидиновые модификации, находятся на стадии доклинических испытаний [2].

Преимущества метода синтеза фосфорилгуанидиновых производных открывают широкие возможности для функционализации олигонуклеотидов, позволяя, в частности, тонко регулировать гидрофобность вводимых модификаций. В данной работе был получен ряд липофильных фосфорилгуанидиновых производных, а также был предложен подход, позволяющий получать незамещенные фосфорилгуанидиновые производные. Были исследованы физико-химические свойства полученных олигонуклеотидов, а также для липофильных производных изучена эффективность проникновения через клеточную мембрану.

1. Zhukov S. A, Pyshnyi, D. V., Kupryushkin M. S. *Synthesis of Novel Representatives of Phosphoryl Guanidine Oligonucleotides // Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. - 2021. - V. 47. - No. 2. - P 380–389.
2. Kandasamy P. et al. *Impact of guanidine-containing backbone linkages on stereopure antisense oligonucleotides in the CNS // Nucleic Acids Research*. - 2022. Published online.

Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН
№ 121031300042-1 и грантом РНФ № 21-64-0001.

Функциональный анализ малых ядрышковых РНК в клетках аденокарциномы легких человека A549 в условиях заражения вирусом гриппа А

Журавлев Е.С.¹, Сергеева М.В.², Матвеева А.М.¹, Крайникова Л.В.¹,
Комиссаров А.Б.², Степанов Г.А.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

² *НИИ гриппа им. А. А. Смородиной, Санкт-Петербург, Россия*

Данная работа направлена на изучение функций коротких регуляторных РНК, а именно класса малых ядрышковых РНК (мяоРНК), в клетках человека в условиях заражения вирусом гриппа А. На первом этапе, в качестве модельной системы были подготовлены препараты клеток линии аденокарциномы легких человека A549, зараженных вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1). Было проведено транскриптомное исследование изменений в уровне представленности мРНК и нкРНК, а также коротких РНК (<200 н.) в клетках человека в условиях вирусной инфекции. Биоинформатический анализ результатов секвенирования poly-A-фракции подтвердил активацию основных функциональных кластеров, характерных для инфекции клеток вирусом гриппа. Анализ фракции коротких РНК позволил выявить отдельные малые ядрышковые РНК, а также укороченные формы мяоРНК, представляющие собой 5'- и 3'-фрагменты зрелых мяоРНК, со значительно повышенным (SNORD93, SNORD11, SNORD1B, SNORD8) и пониженным (SNORD58A, SNORD42A, SNORD79) содержанием в клетках в условиях вирусной инфекции. Обнаруженные изменения в уровне экспрессии ряда малых ядрышковых РНК были верифицированы методом ОТ-ПЦР, в том числе с использованием stem-loop-обратных праймеров для селективной детекции 5'- и 3'- укороченных форм процессинга мяоРНК. Выявленные изменения в профиле экспрессии малых ядрышковых РНК позволяют предположить наличие неканонических функций этих РНК в регуляции инфекции клеток человека вирусом гриппа.

На втором этапе, для расширения представлений об участии малых ядрышковых РНК в регуляции инфекции клеток человека вирусом гриппа А, с помощью технологии CRISPR/Cas9 были получены клеточные линии на основе клеток человека A549 с подавлением уровня зрелой мяоРНК SNORD93 и уровня 5'- и 3'-форм её процессинга (уровень 5'- и 3'-форм процессинга мяоРНК SNORD93 достоверно повышался в исходных клетках A549 в условиях инфекции вирусом гриппа А). Модифицированные клеточные линии были использованы для изучения чувствительности к заражению вирусом гриппа. В частности, было показано снижение уровня вирусной РНК в клеточных линиях с подавлением SNORD93 относительно исходной клеточной линии через 24 и 48 часов после заражения вирусом гриппа А. Полученный результат указывает на важную роль мяоРНК SNORD93, а также форм её процессинга в развитии инфекции вирусом гриппа А в клетках аденокарциномы легких человека A549.

Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 122022100238-7 (получение модифицированных клеточных линий) и гранта РФФИ № 19-34-90168 (секвенирование и биоинформатический анализ данных).

Новые антибактериальные препараты на основе ципрофлоксацина: синтез и исследование биологической активности

Задворных Д.А.^{1,2}, Бардашева А.В.¹, Рябова Е.С.^{1,2}, Григорьева А.Е.¹, Королева Л.С.¹,
Тикунова Н.В.¹, Сильников В.Н.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

В связи с появлением и распространением штаммов бактерий, устойчивых практически ко всем известным антибиотикам, в настоящее время резко возросла потребность в новых антибактериальных препаратах, способных воздействовать на антибиотикоустойчивые штаммы микроорганизмов.

Ранее в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН были получены поликатионные амфифильные соединения на основе 1,4-дизабидицикло[2.2.2]октана (DABCO), которые показали высокую противомикробную активность путем воздействия на две мишени: расщепление РНК и нарушение целостности бактериальных мембран [1,2]. Широко используемый антибиотик ципрофлоксацин подавляет репликацию ДНК бактерий путем ингибирования каталитической активности ДНК-гиразы и топоизомеразы IV. Для снижения вероятности возникновения резистентности бактерий в рамках данной работы предлагается синтезировать серию конъюгатов поликатионных амфифильных соединений с ципрофлоксацином, способных воздействовать на три принципиально разные мишени одновременно, и исследовать их антибактериальную активность.

Были разработаны методы синтеза и получены целевые соединения, содержащие остатки DABCO и ципрофлоксацина. Соединения отличаются длиной и природой линкерной группы между остатками DABCO и расстоянием между остатками DABCO и остатком антибиотика. Структуры полученных соединений подтверждены методами ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Исследование биологической активности на штаммах грамположительных и грамотрицательных бактерий выявило несколько более активных соединений в сравнении с ципрофлоксацином. Проведен анализ зависимости биологической активности от структуры исследуемых соединений. Изучена кинетика действия наиболее активного препарата на рост штамма *S. aureus*. Исследование механизма действия наиболее активного соединения на штамме *S. aureus* подтвердило мультитаргетный характер воздействия на бактериальную клетку.

1. Yarinich L. et al. *Synthesis and structure-activity relationship of novel 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane derivatives as potent antimicrobial agents // Eur. J. Med. Chem.* 2015. Vol. 95. P. 563–573.
2. Burakova E. et al. *Biological evaluation of tetracationic compounds based on two 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane moieties connected by different linkers // Bioorg. Med. Chem.* 2016. Vol. 24, № 22. P. 6012–6020.

Исследование было поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН 121031300042-1 и выполнено совместно с КЭМТК, поддерживаемой в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН 121031300043-8

Effective *in vivo* inhibition of A/H5N1 and A/H7N9 viruses with oligonucleotides fixed on inorganic nanoparticles

Zarytova V.¹, Levina A.¹, Repkova M.¹, Kupryushkin M.¹, Pavlova A.¹, Mazurkova N.², Pyshnyi D.¹

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB of RAS, Novosibirsk, Russia

² FBRI SRC VB “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

Influenza A virus (IAV) occupies an essential place in the infectious pathology of humans and animals and periodically causes epidemics and epizootics. The rational way to create effective and selective agents against IAV may be the use of nucleic acid fragments, an important advantage of which is their ability to selectively recognize target nucleic acids. However, the use of these drugs is still limited because of their low stability in serum and poor penetration into cells.

Earlier, we developed a new method for the delivery of nucleic acid fragments into eukaryotic cells using TiO₂•PL-ODN (hereinafter TiO₂~ODN) nanocomposites consisting of biocompatible low-toxic titanium dioxide nanoparticles and noncovalently fixed polylysine-containing oligonucleotides.

We have studied antiviral activity of the proposed nanocomposites against highly pathogenic H5N1 and H7N9 influenza A virus (IAV) *in vivo*. We used oligonucleotides with the native (ODN) and partially modified (ODN_m) internucleotide bonds, which were targeted to the conserved 3'-noncoding region of viral (-)RNA. Intraperitoneal injection of the TiO₂~ODN nanocomposite provided 65–70% survival of A/H5N1-infected mice, while intraperitoneal or oral administration of TiO₂~ODN_m was more efficient (~80% survival). The virus titer in the lung was reduced by two-three orders of magnitude. The nanocomposites are nontoxic to mice under the used conditions. The nanocomposite bearing ODN_{scr} showed an insignificant protective effect, which indicates site-specific interaction of the targeted ODN with complementary RNA [1]. The dose-dependent protection (up to 100% at a dose of ODN of 3 mg/kg) of A/H7N9-infected mice was revealed when using the intraperitoneal injection of the TiO₂~ODN nanocomposite [2]. The proposed oligonucleotide delivery system can claim not only to effectively inhibit IAV genes but also to turn off other genes responsible for diseases caused by nucleic acids.

1. Levina A., et al. Pronounced therapeutic potential of oligonucleotides fixed on inorganic nanoparticles against highly pathogenic H5N1 influenza A virus *in vivo*. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* - 2021. - V. 162, - P. 92–98.
2. Repkova M., et al. Effective inhibition of new emerged A/H7N9 virus with oligonucleotides targeted to conserved regions of the virus genome. // *Nucleic Acid Ther.* - 2021. - V. 31(6). - P. 436–442.

The work was supported by State-funded budget projects AAAA-A17-117020210021-7 and 121031300042-1.

Модуляция экспрессии генов в клетках HEK293 при эктопической экспрессии длинной некодирующей РНК GAS5

Зинченко Н.Д.^{1*}, Савиновская Ю.И.¹, Ермаков М.С.¹, Нуштаева А.А.¹,
Кулигина Е.В.¹, Семенов Д.В.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Российская Федерация

Длинные некодирующие РНК являются транскриптами, процессируемыми РНК-полимеразой 2, длиной более 200 нуклеотидов и не кодирующими белок. Длинные некодирующие РНК (днРНК) выполняют функции модулятора экспрессии генов. ДнРНК вовлечены в процессы репликации, транскрипции, трансляции, онкогенез и апоптоз.

Ген GAS5 (growth arrest specific 5) человека является хост-геном 10 малых ядрышковых C/D-боксов РНК, экзоны которого кодируют днРНК GAS5. Для днРНК GAS5 установлена антионкогенная и проапоптотическая функция. Уровень днРНК GAS5 понижен в онкотрансформированных клетках человека. Повышение уровня днРНК GAS5 в раковых клетках приводит к снижению пролиферации, жизнеспособности и активирует проапоптотические процессы. ДнРНК GAS5 является перспективным объектом для поиска новых стратегий диагностики и терапии онкозаболеваний.

Целью данной работы является анализ функций днРНК GAS5 в клетках человека HEK293T в условиях эктопической экспрессии изоформ этой днРНК. Для этого нами созданы ДНК-конструкции, кодирующие изоформы днРНК GAS5. Фибробласты почек эмбриона человека HEK293T трансфицировали полученными ДНК-конструкциями. Проводили полнотранскриптомный анализ полученных трансфектантов на платформе Illumina 1500.

Установлена группа мРНК, уровень которых модулируется эктопической экспрессией днРНК GAS5. Было установлено, что экспрессия этих мРНК контролируется транскрипционными факторами SUZ12 и EZH2. Факторы SUZ12 и EZH2 являются ключевыми компонентами поликомб-PRC2 комплекса, эпигенетического регулятора экспрессии генов. Известно, что днРНК способны взаимодействовать с белками SUZ12 и EZH2. Данное взаимодействие регулирует активность и выбор генов-мишеней поликомб-PRC2 комплекса.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что антионкогенное и проапоптотическое действие днРНК GAS5 в клетках обусловлено модуляцией компактизации/декомпактизации хроматина через взаимодействие этой днРНК с компонентами поликомб-репрессивного комплекса PRC2.

Работа поддержана финансированием по бюджетному проекту ИХБФМ СО РАН № АААА-А17-117020210023-1.

Циклические направляющие РНК как компоненты фоторегулируемой системы геномного редактирования CRISPR/Cas9

Иванская Е.В.^{1,2}, Саковина Л.В.^{1,2}, Горленко Е.С.^{1,2},
Вохтанцев И.П.^{1,2}, Новопашина Д.С.^{1,2}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Разработка подходов к контролируемому редактированию генов с помощью CRISPR/Cas9 системы является актуальной задачей синтетической и клеточной биологии и биоорганической химии. Одним из вариантов регуляции активности системы геномного редактирования является использование фоточувствительных направляющих РНК. Ранее нами были разработаны фотомодифицированные направляющие РНК, содержащие фоторасщепляемые группировки в середине цепи, которые при облучении разрушаются, при этом действие системы CRISPR/Cas9 останавливается [1]. В качестве варианта конструкций, позволяющих осуществлять фотоактивируемое включение системы CRISPR/Cas9 нами были предложены системы, содержащие дополнительный фоторасщепляемый олигонуклеотид, который исходно блокирует направляющую РНК, а при облучении ее высвобождает, при этом система геномного редактирования активируется [2,3].

Основной идеей данной работы является дизайн и получение фотоактивируемых циклических направляющих РНК. Взаимодействие циклических направляющих РНК с белком Cas9 затруднено и система не должна быть активна, а после облучения циклические РНК переходят в линейную форму, узнаются белком Cas9 и система CRISPR/Cas9 активируется.

Целью данной работы является дизайн и разработка подходов к синтезу фотоактивируемых циклических направляющих crРНК для системы CRISPR/Cas9.

Для синтеза фотоблокированных направляющих РНК были использованы фоторасщепляемые линкеры на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола. Для циклизации РНК нами был применен метод азид-алкинового циклоприсоединения. Синтезированные циклические crРНК использованы в качестве компонентов системы CRISPR/Cas9 для расщепления модельной плазмидной ДНК. Продемонстрировано увеличение эффективности расщепления плазмидной ДНК после облучения системы, содержащей циклические фотоблокированные направляющие РНК.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности разрабатываемого подхода к созданию фотоактивируемых систем геномного редактирования.

1. Новопашина Д.С. и др. Модифицированная направляющая РНК, обладающая способностью инактивировать систему редактирования генома CRISPR/Cas9, и способ ее получения. Патент РФ на изобретение № 2765159.
2. Ахметова Е.А. и др. Фотоактивируемая система CRISPR/Cas9 // *Биоорган. химия* - 2021. - Т.47. - С.276-286.
3. Semikolenova O. et al. Photoactivatable nanoCRISPR/Cas9 System Based on crRNA Reversibly Immobilized on Carbon Nanoparticles. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. - V. 22. - P. 10919.

Исследование было поддержано грантом РФФИ № 22-14-00294.

Pharmacological potential of a new indole derivative of soloxolone in relation to human glio- and neuroblastoma cells

Ilyina A.A.¹, Sen'kova A.V.¹, Salomatina O.V.², Okhina A.A.², Rogachev A.D.², Salakhutdinov N.F.², Zenkova M.A.¹, Markov A.V.¹

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia*

² *Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Novosibirsk, Russia*

The main problem related to the development of novel drugs against oncological and degenerative diseases of the brain is their low penetration through blood-brain barrier (BBB). In this study, we developed and evaluated bioactivity of novel amides of semisynthetic triterpenoid soloxolone in respect to brain tumor cells. Using an *in silico* analysis, a range of soloxolone amides probably able to pass the BBB and be accumulated in brain tissue was identified. Further screening of their cytotoxicity in a panel of glio- and neuroblastoma cells revealed their high cytotoxicity ($IC_{50}^{(24\text{ h})} = 1.4 - 7.0\ \mu\text{M}$). Evaluation of mechanism of action of hit compound 12 demonstrated that 12 induced ROS-dependent death of glioblastoma cells by triggering of mitochondrial-dependent apoptosis. Using molecular modeling, we showed that 12 can induce mitochondrial stress with subsequent hyperproduction of ROS by direct interaction with active site of mitochondrial LonP1 protease. Besides, 12 at non-toxic concentrations displayed anti-metastatic potential *in vitro*, decreasing clonogenic potential, motility and vasculogenic mimicry of glioblastoma U87 cells as well as enhancing their adhesiveness. High antitumor potency of 12 was further validated in murine U87 glioblastoma xenografts *in vivo*, where we showed that hit compound was dose-dependently accumulated in the brain of mice and effectively reduced tumor growth. Histological analysis of tumor tissues showed that 12 decreased the stromal collagen distribution and promoted the maturation of blood vessels in tumor nodes.

Additionally, compound 12 at non-toxic concentrations (a) increased viability of U118 glioblastoma cells under oxidative stress conditions via stimulation of the expression of Nrf2-regulated antioxidant genes and (b) reinforced neurite outgrowth in neuroblastoma KELLY and Neuro2a cells. Obtained results clearly demonstrated an expediency of further investigation of 12 as probable pharmacological candidate against neurodegenerative disorders.

This work was funded by the Russian Science Foundation, grant number 17-75-20120.

Комплексы сывороточных альбуминов с додецил-содержащими олигонуклеотидами и их дуплексами

Павлова А.С.¹, Илющенко В.В.^{1,2}, Пышный Д.В.¹, Пышная И.А.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Антисмысловые олигонуклеотиды (АОН) являются в настоящее время одними из основных объектов научных исследований для решения задач персонализированной медицины и тераностики. Высокий потенциал применения АОН *in vivo* сдерживает проблема их доставки к внутриклеточным мишеням [1].

Целью данной работы являлось получение комплекса, состоящего из (1) сывороточного альбумина (СА) – для улучшения фармакокинетики АОН, (2) АОН с остатком бисимидазолсодержащего пептидомиметика (АОН-ПМ) для сайт-направленного расщепления РНК-мишени и, комплементарного ему, (3) додецил-содержащего олигонуклеотида для связывания с СА.

Для повышения устойчивости к действию нуклеаз помимо олигодезоксирибонуклеотида с остатками ПМ (ОДН-ПМ) были синтезированы фосфорилгуанидиновые аналоги с остатками ПМ (ФГО-ПМ). ФГО-ПМ с различной длиной $(-CH_2)_n$ линкера ($n = 4, 5, 10$) между олигонуклеотидом и остатком пептидомиметика были получены впервые с использованием твердофазного варианта реакции CuAAC.

Исследование реакционной способности АОН-ПМ показало, что степень расщепления РНК-мишени сайт-специфически составляет в случае ФГО-ПМ с наиболее коротким линкером между остатком пептидомиметика и АОН: в условиях культуральной среды DMEM за 18 ч до 30%; в условиях 50мМ Трис-Ацетат, pH 7.5, 100мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂ за 4 ч до 70%.

Исследование стехиометрии связывания 1-, 2- и 3-додецил-содержащих олигонуклеотидов (ДСО) с сывороточным альбумином человека показало, что стехиометрия комплексов сывороточного альбумина с 3-ДСО составляет ~ 1:1.5 – 1:2. Более того, связывание с альбумином увеличивает устойчивость 3-ДСО к действию ДНКазы I.

Изучено связывание СА с дуплексами, в состав которых входили 3-ДСО и ОДН-ПМ или ФГО-ПМ, в условиях, близких к физиологическим. Установлено, что стехиометрия связывания альбумина с указанными дуплексами составляет ~ 1:1.

Полученные данные могут быть использованы для рационального дизайна транспортеров АОН к их внутриклеточным мишеням.

1. Crooke S., Baker B., Crooke R., Liang X. Antisense technology: an overview and prospectus. // Nat. Rev. Drug Discov. - 2021. - V. 20. - P 427–453.

Авторы выражают благодарность Огурцовой П.А., к.х.н. Королёвой Л.С., д.х.н. Сильникову В.Н. за синтез пептидомиметиков. Исследование выполнено в рамках Государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1

Исследование самоограниченных комплексов РНК, образованных парой олигонуклеотидов

Канарская М.А.^{1,2}, Ломзов А.А.^{1,2}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Вторичная и третичная структура нуклеиновых кислот во многом определяют их биологические функции. В ИХБФМ СО РАН исследуют разнообразие вторичных и третичных структур комплексов олигонуклеотидов и их свойства. В частности, была показана возможность формирования самоограниченных циклических структур парной олигонуклеотидов. Такие структуры можно получить, если взять две пары комплементарных НК-последовательностей, формирующих два дуплекса и соединить их в один комплекс двумя линкерами [1].

Целью данной работы является исследование физико-химических свойств РНК способных формировать самоограниченные комплексы.

Объектом исследования являлась короткие синтетические последовательности РНК – олигонуклеотиды, состоящие из 10 звеньев, способных формировать дуплексные участки, которые соединены нуклеотидными линкерами различной длины. Проведено исследование влияния размера линкера в цепях олигомеров на тип и физико-химические свойства формируемых ими комплексов.

Методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала исследования термическая стабильность одиночных цепей и межмолекулярных комплементарных комплексов. Для анализа структуры использован метод гелеэлектрофореза в неденатурирующих условиях.

Показано, что комплекс РНК/РНК формируется эффективно, при этом отдельные цепи РНК способны формировать самокомплементарные комплексы. Исследование показало, что выбранные пары олигонуклеотидов способны формировать самоограниченные или конкатамерные комплексы. Установлено, что размер линкеров в олигонуклеотидах влияет на тип формируемых ими структур, а также на размер самоограниченных комплексов: бимолекулярные, тетрамолекулярные, гексамолекулярные и более высокомолекулярные. Полученные результаты для РНК комплексов, сопоставимы с результатами аналогичных исследований для цепей ДНК [1].

1. Zamoskovtseva A. A. et al. Pairing nanoarchitectonics of oligodeoxyribonucleotides with complex diversity: concatemers and self-limited complexes //RSC advances. – 2022. – Т. 12. – №. 11. – С. 6416-6431.

Работа выполнена при поддержке проектов РФФИ 20-04-00719 и Государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121112900217-3.

Анализ влияния биологически активных веществ, выделенных из морских динофлагеллят *Prorocentrum minimum*, на инвазивный потенциал опухолевых клеток

Князев Н.А.^{1,2}, Печковская С.А.², Богданов А.А.¹, Филатова Н.А.²

¹ Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический), Санкт-Петербург, Россия

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Рак является одной из ведущих причин смертности во всем мире. Поиск более эффективных методов и разработка новых терапевтических средств для лечения опухолей необходимы для дальнейшего прогресса в борьбе с этим заболеванием. В настоящее время около 60% лекарств, используемых в гематологии и онкологии, происходят из природных источников. Также растет интерес к выделению новых биологически активных соединений из морских организмов, в том числе одноклеточных водорослей. Особый интерес в этом отношении представляют динофлагелляты - микроводоросли, способные продуцировать множество токсинов и биологически активных соединений, таких как перидинин. Однако биологически активный потенциал перидинина в качестве противоопухолевого средства остается неизученным.

Перидинин экстрагировали из клеток морских динофлагеллят *Prorocentrum minimum* с использованием этанола или ДМСО. Полученные экстракты были охарактеризованы спектрофотометрическим методом. В качестве опухолевых клеток-мишеней использовали культуру аденокарциномы толстой кишки мыши СТ-26. Токсичность экстрагированного перидинина *in vitro* определяли с помощью MTS-теста, а влияние на апоптоз оценивали с использованием проточной цитометрии. Влияние на скорость миграции клеток оценивали с помощью скрэтч-теста.

Под воздействием перидинина, выделенного из биомассы водорослей с использованием ДМСО, число клеток-мишеней снижалось на 40% через 72 часа после эксперимента. В случае обработки препаратами, полученными при экстракционной обработке этанолом, количество клеток-мишеней уменьшалось только на 20%. Количество апоптотических клеток под действием перидинина не изменялось. В целом, препараты, выделенные как с помощью ДМСО, так и этанола, приводили к снижению потенциала подвижности клеток СТ26.

Полученные данные позволяют предположить, что перидинин, выделенный из клеток динофлагеллят *P. minimum*, не только обладает цитостатической активностью, но и способен снижать подвижность опухолевых клеток, что открывает широкие перспективы для изучения действия полученных экстрактов *in vivo*.

Исследование магнитных наночастиц в качестве компонентов системы доставки нуклеиновых кислот

Ковригина Е.Н.¹, Дмитриенко Е.В.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия

Применение магнитных наночастиц (МНЧ) в биомедицинских целях расширяют границы для доставки различных биологических соединений. Использование наночастиц в качестве носителей для терапевтических молекул приводит к улучшению терапевтического эффекта и предотвращения побочных эффектов. Системы адресной доставки нуклеиновых кислот особенно полезны, благодаря уникальным свойствам регулировать экспрессию генов, синтеза белка и других фундаментальные процессов в клетке [1]. Существует необходимость в использовании носителей для генетического материала, поскольку при введении отдельных генов в организм они быстро повреждаются под действием гуморального вещества и эндогенных ферментов, а отрицательно заряженные макромолекулярные нуклеиновые кислоты за счет одноименного заряда клеточной мембраны не способны приблизиться и проникнуть в клетки самостоятельно. Кроме того, системы доставки генов способны предотвращать ферментативную деградацию нуклеиновых кислот и ускорять клеточную интернализацию и направленное высвобождение генов, улучшая эффект лечения.

В ходе работы получены и охарактеризованы несколько вариантов магнитных наночастиц (МНЧ), в том числе стабилизированных поверхностно активными веществами или олеиновой кислотой. Исследовано взаимодействие полученных МНЧ с противоопухолевым препаратом доксорубицином (DOX) и модельными синтетическими олигонуклеотидами. Определены оптимальные условия для сорбции и десорбции доксорубицина и модельных олигонуклеотидов на поверхность МНЧ. Максимальная ёмкость (1757 ± 108 мкг DOX/мг МНЧ) по отношению к доксорубицину наблюдается у композитных МНЧ с покрытием на основе олеиновой кислоты. Максимальная ёмкость равная $(4.8 \pm 0.2) \times 10^{-8}$ моль олигонуклеотида / мг наночастиц показана при взаимодействии МНЧ с модельными синтетическими олигонуклеотидами. Показано, что эффективность сорбции зависит как от pH, так и от состава буферного раствора: максимальные значения ёмкости для доксорубицина достигаются в слабощелочных условиях, а для олигонуклеотидов в закисленных pH в отсутствии фосфатного аниона. Влияние нуклеотидного состава на эффективность сорбции слабо выраженное и возрастает в ряду A26<C26<T26. Полученные результаты демонстрируют потенциал синтезированных МНЧ в качестве высокоёмких наноразмерных носителей противоопухолевого препарата и нуклеиновых кислот, что открывает перспективы для дальнейших исследований.

1. Hammond, S. M., Aartsma-Rus, A., Alves, S., Borgos, S. E., Buijssen, R. A., Collin, R. W., et al. Delivery of oligonucleotide-based therapeutics: challenges and opportunities //EMBO Mol. Med. – 2021. – V. 13. – №. 4. – P. e13243.

Исследование было поддержано в рамках проекта РФФ №21-64-00017.

Способ получения рекомбинантного аналога полипептида из морской анемоны

Комякова А.М.¹, Терешин М.Н.¹, Степаненко В.Н.¹, Шошина Н.С.¹, Лейченко Е.В.²,
Мягких И.В.¹, Козлов С.А.¹

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

² Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
Владивосток, Россия

Для разработки новых антиоксидантных средств большой интерес представляет собой один из компонентов яда морской анемоны *Heteractis crispa* InhVJ – полипептид Кунитц-типа, состоящий из 56 аминокислотных остатков, который эффективно снижает уровень АФК в клетках нейробластомы после обработки 6-OHDA, поглощает свободные радикалы в DPPH тесте, а также оказывает ингибирующее действие на трипсин с определенной константой ингибирования по методу Диксона $7,8 \times 10^{-8}$ М [1].

Целью настоящей работы являлась разработка способа получения рекомбинантного аналога полипептида InhVJ.

Было сконструировано три плазмидных вектора: pSMT3_VJ, pTRX_TEVrs_VJ и pDnaB_VJ, которыми трансформировали клетки *E. coli* BL21(DE3). Продукты экспрессии полученных штаммов-продуцентов представляли собой гибридные белки (ГБ):

SMT3_VJ – целевой пептид, слитый со структурным элементом, распознаваемым Upr1-протеазой (SUMO), содержащим на N-конце гексагистидиновую метку;

TRX_TEVrs_VJ – тиоредоксин-1, содержащий на N-конце гексагистидиновую метку, слитый с целевым пептидом через сайт узнавания TEV-протеазы;

DnaB_VJ – целевой пептид, слитый с элементом, способным к автокаталитическому выщеплению из состава ГБ – интеином SspDnaB, содержащим на N-конце гексагистидиновую метку.

На первом этапе работ осуществили культивирование созданных штаммов-продуцентов в препаративных объемах (до 20 л) и очистку ГБ с использованием аффинной хроматографии.

Дальнейшее исследование ГБ показало, что в случае с SMT3_VJ происходило эффективное отделение целевого продукта посредством Upr1-протеазы, тогда как расщепления TRX_TEVrs_VJ TEV-протеазой не наблюдалось. Для DnaB_VJ показана принципиальная возможность автокаталитического расщепления, однако степень расщепления ГБ не превышала 50%. В связи с чем, дальнейшую разработку технологии решили проводить на основе штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pSMT3_VJ.

Разработанный способ получения рекомбинантного аналога антиоксидантного полипептида включил в себя этап культивирования и разрушение биомассы, экстракцию ГБ из телец включения, ренатурацию, расщепление ГБ белка под действием Upr1-протеазы и двухстадийную очистку целевого продукта при помощи металл-хелатной и катионо-обменной хроматографий. Структура целевого продукта была подтверждена масс-спектрометрическим анализом.

1. Sintsova, O., Gladkikh, I., Monastyrnaya, M., Tabakmakher, V., Yurchenko, E., *др. всего 14 человек. Sea Anemone Kunitz-Type Peptides Demonstrate Neuroprotective Activity in the 6-Hydroxydopamine Induced Neurotoxicity Model // Biomedicines – 2021. – V. 9, №3. – 283.*

Работа была выполнена при поддержке РФФИ грант № 20-54-05006.

Исследование противоопухолевых и гемопротекторных свойств ингибитора тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 на модели опухолей *in vivo*

Корниенко Т.Е.¹, Захаренко А.Л.¹, Николин В.П.², Попова Н.А.²,
Филимонов А.С.³, Лузина О.А.³, Салахутдинов Н.Ф.³, Лаврик О.И.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия

² Институт цитологии и генетики, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова, Новосибирск, Россия

Разработка ингибиторов репарации ДНК является одним из приоритетов медицинской химии, поскольку такие агенты могут повысить эффективность лечения онкозаболеваний. Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (Tdp1) - многообещающая молекулярная мишень, так как участвует в восстановлении различных повреждений ДНК, вызванных противоопухолевыми препаратами [1]. Олапариб является широко применяемым в клинике ингибитором поли(АДФ-рибоза)полимеразы 1 - регулятора репарации ДНК. Его механизм действия основан на предотвращении синтеза поли-АДФ-рибозы (PAR-илирования), что приводит к блокировке реакции на повреждения ДНК. Известно, что PAR-илирование Tdp1 рекрутирует ее к месту повреждения ДНК [2]. Комбинированное применение ингибиторов PARP1 и Tdp1 может повысить эффективность лечения онкозаболеваний.

Усиновая кислота - вторичный метаболит лишайников с широким спектром биоактивности [3]. На ее основе было синтезировано соединение, которое ингибирует Tdp1 и нетоксично [4].

Мышам привили карциному легкого Льюис или асцитную карциному Кребс-2. В отношении опухоли Кребс-2 комбинированное применение олапариба и ингибитора Tdp1 оказалось более эффективным по сравнению с индивидуальным введением препаратов.

В отношении карциномы Льюис ингибитор Tdp1 обладает более выраженным противоопухолевым и антиметастатическим действием по сравнению с олапарибом и их комбинацией.

Ингибитор Tdp1 не оказывал токсического действия и нормализовал кроветворение, нарушенное опухолевым процессом.

Таким образом, производное усиновой кислоты является многообещающим прототипом для разработки противоопухолевых препаратов, т.к. нетоксично, обладает выраженной противоопухолевой, антиметастатической и гемопротекторной активностью.

1. Comeaux E. Q., van Waardenburg R. C. A. M. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I resolves both naturally and chemically induced DNA adducts and its potential as a therapeutic target // *Drug Metab. Rev.* – 2014, 46, 494-507.
2. Das B. B. et al. PARP1-TDP1 coupling for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage // *Nucl. Acids res.* – 2014, 42, 4435-4449.
3. Luzina O. A., Salakhutdinov N. F. Biological activity of usnic acid and its derivatives: Part 2. Effects on higher organisms. Molecular and physicochemical aspects. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* – 2016, 42, 249-268.
4. Zakharenko A. L. et al. Usnic acid derivatives are effective inhibitors of tyrosyl-DNA phosphodiesterase I // *Russ. J. Bioorg. Chem.* – 2017, 43, 84-90.

Исследование поддержано грантом РФФ № 21-14-00105.

Получение минимального репортера на основе люциферазы *Metridia longa* для аналитических приложений

Коротов И.А.¹, Маркова С.В.¹

¹ Институт биофизики СО РАН,
ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН», Красноярск, Россия

Биолюминесцентные репортеры на основе люцифераз стали важными инструментами в различных биомедицинских исследованиях за счет ряда привлекательных свойств, таких как высокая чувствительность, нетоксичность для объекта исследований и возможность наблюдать сигнал в реальном времени.

Полученная из морских копепод *Metridia longa* секретируемая люцифераза, катализирует простую биолюминесцентную реакцию окисления субстрата целентеразина, не требующую кофакторов. Фермент имеет небольшой размер, высокие удельную активность и термостабильность, что выгодно выделяет его для *in vitro* и *in vivo* использования на фоне других репортерных белков [1].

Для люциферазы *Metridia* было идентифицировано 4 типа изоформ различного размера 16,5–22,0 кДа (для зрелых белков). Последовательность люциферазы включает переменный N-конец и консервативный домен из двух tandemных неидентичных повторов.

Целью нашей работы была идентификация наименьшей последовательности люциферазы *Metridia*, обладающей каталитической функцией. Исследование проводилось на основе изоформы MLuc7, которая является наименьшей из природных люцифераз (16,5 кДа), состоящей из 152 аминокислотных остатков.

Олигонуклеотид-направленным метагенезом была получена серия делеционных мутантов с C- и N-конца. Предварительная характеристика была осуществлена на грубых лизатах *E. coli*. Для мутантов, обладающих наибольшей биолюминесцентной активностью, были получены чистые белки в препаративных количествах, определены их основные биолюминесцентные свойства. Установлено, что укорочение на 10 аминокислотных остатков с N-конца не изменяет репортерных свойств MLuc7, что также подтверждено экспрессией в клетках млекопитающих (линия CHO). Показано, что дальнейшее укорочение ведет к постепенному уменьшению биолюминесцентной активности. В результате определены границы минимальной каталитической последовательности, расположенные между аминокислотными остатками 171 и 132A.

Полученные делеционные мутанты могут быть использованы как репортеры, позволяющие снизить метаболическую нагрузку на клетку-хозяина в исследованиях *in vivo*, уменьшить стерические и функциональные интерференции в случае использования в составе гибридных белков.

1. Markova S.V., Larionova M.D., Vysotski E.S. Shining light on the secreted luciferases of marine copepods: current knowledge and applications. // *Photochem Photobiol.*, 2019, 95(3):705-721.

Исследование было поддержано грантом № 20-44-242003\20 РФФИ, Правительством Красноярского края и Краевого фонда науки.

Опосредованное влияние мультифункционального белка NUCB1 на уровень интерлейкина 2

Костарева О.С.¹, Михайлина А.О.¹, Своеглазова А.Е.¹, Тищенко С.В.¹

¹ Институт белка РАН, Пущино, Россия

Развитие терапии с использованием микроРНК (miRNA) активно набирает обороты для онкологических заболеваний, диабета и даже для стимуляции кардиомиоцитов. Разработка подобной терапии для аутоиммунных заболеваний пока невозможна, поскольку отсутствует полная схема действия микроРНК на различные мишени в развитии и прогрессии болезней. В настоящий момент проводится активное составление таких схем, в частности, при изучении развития системной красной волчанки (СКВ).

Мы исследуем мультифункциональный белок нуклеобиндин 1 человека (NUCB1), который ассоциирован со многими социально значимыми заболеваниями человека (онкологическими и аутоиммунными). Изначально NUCB1 был обнаружен как фактор роста и дифференцировки В-клеток при развитии СКВ у мышей. Широко изучаются его функции в клетке, осуществляемые посредством взаимодействия с белковыми партнерами (ATF6, MMP2).

Недавно мы показали, что NUCB1 специфически взаимодействует с некоторыми фрагментами РНК и определили предположительный мотив, который узнаётся белком. Данный мотив содержит многие регуляторные РНК (микро РНК, длинные некодирующие РНК), в том числе микроРНК miR 200a-3p, задействованная в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода и развитии иммуновоспалительных заболеваний. Мы показали, что NUCB1 образует с miR 200a-3p стабильный комплекс и предполагаем функциональное влияние такого взаимодействия на уровень интерлейкина 2 (IL-2). Известно, что повышенный уровень NUCB1 в мононуклеарных клетках крови коррелирует с понижением уровня IL-2, однако, механизм такого явления пока неизвестен.

Регуляция синтеза интерлейкина 2 включает двойную петлю обратной связи с участием как микроРНК miR 200a-3p, так и транскрипционных факторов ZEB1/ZEB2. Эти факторы подавляют синтез IL-2, однако, при взаимодействии miR 200a-3p с ZEB1/ZEB2 экспрессия IL-2 восстанавливается. Мы предполагаем, что связывание NUCB1 с miR 200a-3p нарушает взаимодействие микроРНК с ZEB1/ZEB2, что приводит к снижению уровня экспрессии IL-2. Наши результаты впервые позволили предположить опосредованное влияние мультифункционального белка NUCB1 на регуляцию экспрессии гена IL-2.

Перспективы регуляции биосинтеза гауземицинов

Кравченко Т.В.^{1,2}, Алферова В.А.^{1,2}, Тюрин А.П.¹, Коршун В.А.^{1,2}

¹ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

² ФГБНУ НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, Россия

Антибиотическая устойчивость является серьезной угрозой во всем мире, поэтому открытие и изучение новых антибиотиков является жизненно важной задачей.

Гауземицины, недавно обнаруженные липо(глико)пептидные антибиотики [1], проявляют активность в отношении грамположительных патогенов, таких как метициллин-резистентный золотистый стафилококк. Структура гауземицинов обладает новизной и значительно отличается от встречающихся в природе структур гликопептидов (ванкомицин), липопептидов (даптомицин), и липогликопептидов (рамoplanin, тейкопланин).

Был изучен путь биосинтеза гауземицинов. Анализ полногеномной последовательности штамма-продуцента позволил выявить биосинтетический генный кластер (biosynthetic gene cluster, BGC), содержащий синтетазу нерибосомальных пептидов (non-ribosomal peptide synthase, NRPS), предположительно вовлеченный в биосинтез гауземицина. *In silico* анализ генного кластера позволил нам предположить механизм биосинтеза гауземицинов, включая путь биосинтеза непротеиногенных аминокислот.

Гауземицины продуцируются штаммом *Streptomyces tendae* ВКПМ Ас-1980 в виде смеси близкородственных компонентов и в небольшом количестве. Выделение и очистка индивидуальных компонентов является достаточно трудоемкой задачей. Поэтому интересным является в дальнейшем возможность генетически модифицировать штамм-продуцент для повышения продуктивности, а также для направления пути биосинтеза в производство наиболее активного компонента смеси – гауземицина А.

Традиционно сверхпродуцирующие штаммы получали путем итеративного случайного мутагенеза в сочетании с методами скрининга. В последнее время наблюдается значительный интерес к рациональной инженерии продуцентов антибиотиков. Улучшение продукции антибиотиков может быть достигнуто путем сверхэкспрессии ключевых структурных генов, генов резистентности, генов АТФ-связывающих кассетных транспортеров или амплификации целых BGCs [2]. Так, например, делеция *wblA* приводит к гиперпродукции пикромицина в *S. venezuelae* и даптомицина в *S. roseosporus* [2]. Для достижения максимального уровня продукции антибиотиков требуется систематическое манипулирование удалением репрессоров в сочетании с гиперэкспрессией активаторов. Следовательно, дальнейшей актуальной задачей является рациональная инженерия продуцента гауземицинов с целью повышения качества и количества продуцируемого антибиотика.

1. Tyurin A.P. et al. Gausemycin A, B: Cyclic lipoglycopeptides from *Streptomyces* sp.*// *Angew Chem Int Ed Engl.* – 2021. – V. 60. – P 18694-18703.
2. Wei J. et al. Regulation of antibiotic biosynthesis in actinomycetes: Perspectives and challenges. // *Synth Syst Biotechnol.* – 2018. – V. 3. – P 229-235.

Исследование поддержано грантом РНФ № 20-15-00361.

Биолюминесцентный микроанализ кардиомаркеров на основе ДНК-аптамерной сенсорики

Красицкая В.В.¹, Франк Л.А.¹

¹ Институт биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия

Своевременная и надежная диагностика острого инфаркта миокарда или малых миокардиальных повреждений продолжает оставаться весьма актуальной проблемой. Все существующие на сегодняшний момент диагностические системы по выявлению ранних белковых кардиомаркеров основаны на биоспецифическом взаимодействии антиген-антитело. К недостаткам антител можно отнести их низкую стабильность, относительно высокую стоимость и длительное время инкубации при анализе. В качестве альтернативы антителам в работе предлагается использовать ДНК-аптамеры. Эти синтетические олигонуклеотиды обладают уникальной пространственной структурой и благодаря ей способны специфично связывать молекулы-мишени. По сравнению с антителами аптамеры обладают более высокой стабильностью, легко синтезируются химически, обладают аффинностью, превышающей таковую для антител или сравнимую с ней [1]. В настоящей работе, направленным отбором *in vitro* из комбинаторной библиотеки оц олигонуклеотидов были получены ряд ДНК аптамеров, специфично и высокоаффинно связывающих кардиальные тропонин I (сTnI) [2] и белок, связывающий жирные кислоты (сFABP). Считается, что данные белки являются более чувствительными и значительно более точными биомаркерами для диагноза инфаркта миокарда, чем креатинкиназа, миоглобин или лактатдегидрогеназа [3]. Изучена аффинность и специфичность полученных аптамеров, оптимизированы их размеры, а также подобраны пары аптамеров, связывающие разные эпитопы мишеней. На основе отобранных аптамеров предложен способ твердофазного биолюминесцентного анализа сTnI и сFABP сэндвич-типа и определены оптимальные условия его проведения. В качестве эффективной системы детекции в работе использовали биолюминесцентные репортеры: Ca²⁺-регулируемый фотопротеин обелин или целентеразин-зависимую люциферазу NanoLuc, которые обладают высоким квантовым выходом биолюминесцентного сигнала и низким уровнем шума. Показана возможность использования разработанного анализа для определения содержания сTnI и сFABP в модельных образцах сыворотки крови.

1. Chandola C., et al. Application of aptamers in diagnostics, drug-delivery and imaging // *J. Biosci.* - 2016. - V. 41. - P 535–561.
2. Krasitskaya V.V., et al. The Ca²⁺-regulated photoprotein obelin as a tool for SELEX monitoring and DNA aptamer affinity evaluation // *Photochem. Photobiol.* - 2020. - V. 96. P 1041–1046.
3. Liquori M.E., et al. Cardiac biomarkers in heart failure // *Clin. Biochem.* - 2014. - V. 47. - P 327–337.

Конъюгаты олигонуклеотидов с низкомолекулярными транспортными лигандами, содержащие рН-чувствительную связь

Кропачева Н.О.^{1,2}, Венямина А.Г.¹, Мещанинова М.И.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Синтетические олигонуклеотиды и их конъюгаты широко используются в настоящее время в различных областях молекулярной биологии, нанобиотехнологии и медицины как инструменты для фундаментальных и прикладных исследований, а также как перспективные средства диагностики и терапии вирусных, онкологических, генетических и других заболеваний человека и животных. Одной из задач для терапевтического применения олигонуклеотидов является улучшение их проникновения в клетки [1]. Решение этой задачи, а также разработка подходов к регулированию внутриклеточного трафика синтетических олигонуклеотидов и конструкций на их основе, безусловно, расширит возможности их применения в терапии.

Одним из перспективных подходов к адресной доставке НК в клетки-мишени является создание мультифункциональных конструкций на основе комплексов НК. Компонентами таких конструкций могут служить конъюгаты НК с различными адресующими молекулами, обеспечивающими направленную доставку, например, специфичными к определенным рецепторам или повышающими трансмембранное проникновение. Конъюгирование олигонуклеотидов с адресующими лигандами (например, пептиды и белки, липофильные соединения, малые органические молекулы, наночастицы, аптамеры и др.) посредством биodeградируемых связей [2] позволит улучшить их фармакокинетические свойства и повысить эффективность их биологического действия.

Предложен твердофазный подход к введению транспортных лигандов в олигонуклеотиды различной природы через биodeградируемый линкер, содержащий фосфамидную связь. На последней стадии автоматического фосфитамидного синтеза в олигонуклеотид вводили 5'-фосфат. Полученный полимерсвязанный защищенный 5'-фосфатмодифицированный олигонуклеотид использовали для реакции с прекурсорами - адресующими лигандами, содержащими первичную аминогруппу. С использованием предложенного подхода была получена серия конъюгатов олигонуклеотидов и исследована стабильность фосфамидной связи в их составе при различных рН.

Разработанный метод можно рассматривать в качестве универсального подхода к функционализации синтетических терапевтических нуклеиновых кислот группировками различного типа действия.

1. Juliano, R.L. *The delivery of therapeutic oligonucleotides.* // *Nucl. Acids Res.* - 2016. - V.44. - P. 6518-6548.
2. Leriche, G., Chisholm, L., Wagner, A. *Cleavable linkers in chemical biology.* // *Bioorg. Med. Chem.* - 2011. - V.20. - P.571-582.

Работа была поддержана грантом РФФИ 19-14-00251.

Платформа создания рекомбинантных штаммов БЦЖ, продуцирующих белки-иммуноактиваторы

Кузьмич А.И.^{1,2}, Кондратьева С.А.², Плешкан В.В.^{1,2}, Алексеенко И.В.^{1,2}

¹ *Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, Россия*

² *Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия*

Последние десятилетия характеризуются увеличением частоты возникновения эпидемий инфекционных заболеваний, что даёт основание утверждать, что мы вступили в новую «пандемическую» эру.

Такая ситуация требует развития средств экстренной профилактики новых инфекций. Вакцинирование – одна из самых эффективных мер предотвращения эпидемий. Большинство усилий по профилактике таких заболеваний, как правило, сосредоточивается на разработке специфических вакцин, для чего обычно требуется длительное время.

В условиях быстрого распространения новой вирусной инфекции необходимо проводить срочную профилактику населения. Нами предлагается универсальная стратегия для борьбы с возникающими инфекциями – это «обучение» врожденного иммунитета с помощью неспецифических вакцин.

Феномен «обученного» иммунитета – это усиление врожденных иммунных ответов после первоначального воздействия, в результате чего амплитуда последующих ответов увеличивается. Наиболее яркий пример индукции «обученного» иммунитета – действие на организм вакцины БЦЖ. Помимо формирования специфического иммунитета против микобактерий БЦЖ также способна индуцировать обучение врожденного иммунитета, которое усиливает провоспалительное и противомикробное действие клеток. Показано, что вакцинация БЦЖ снижает смертность человека от различных вирусных инфекций, а также ассоциирована с более низкой частотой неонатального сепсиса и инфекций дыхательных путей.

Современный уровень биологии позволяет получить рекомбинантные вакцины БЦЖ, продуцирующие белки активации клеток врожденного иммунитета (макрофаги, нейтрофилы и NK). Мы полагаем, что такие рекомбинантные формы БЦЖ могут быть более эффективны в качестве средства экстренной профилактики вирусных заболеваний.

Мы развили платформу получения таких рекомбинантных штаммов БЦЖ, продуцирующих подобные белки. В качестве модельной молекулы использовали секретиремый фактор GM-CSF, активность которого в отношении клеток врожденного иммунитета хорошо изучена. Нами был получен плазмидный микобактериальный вектор, несущий ген GM-CSF слитый с лидерным пептидом микобактерий, обеспечивающим секрецию целевых белков из клеток. Трансформация российского штамма БЦЖ созданной плазмидой с последующей селекцией позволила получить микобактерии не только несущие ген-интереса, но и продуцирующие значительный уровень GM-CSF в культуральную жидкость. Мы полагаем, что наша платформа может быть полезна для получения различных рекомбинантных штаммов БЦЖ.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00308, <https://rscf.ru/project/22-14-00308/>.

Стандартизация рекомбинантных препаратов CRISPR рибонуклеазы Cas13a с использованием РНКазы А с известной активностью

Курбатов Л.К., Хмелева С.А., Тимошенко О.С., Радько С.П., Лисица А.В.

Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Предложен подход к характеристике препаратов рекомбинантной Cas13a-рибонуклеазы, полученных путём одностадийной очистки методом металл-хелатной хроматографии после её гетерологичной экспрессии [1], в терминах удельной коллатеральной активности для их стандартизации. Подход основан на измерении начальной скорости расщепления коммерческих наборов молекул РНК, меченых флуорофором и гасителем флуоресценции (FQ-репортеры), препаратами рекомбинантной Cas13a-нуклеазы и коммерческой РНКазы А, активность которой известна. Скорость расщепления FQ-репортеров измеряется как изменение флуоресценции во времени, вызываемое препаратом РНКазы А, и используется для построения калибровочной прямой, с помощью которой определяется неизвестная коллатеральная активность препаратов Cas13a. В качестве предварительного условия необходимо найти оптимальное молярное соотношение для образования комплексов Cas13a с направляющей РНК, а также оптимальное количество РНК-мишени для данного препарата. Показано, что использование синтетической РНК-мишени более предпочтительно в сравнении с препаратами суммарной РНК, содержащими последовательность-мишень. Стандартизация препаратов Cas13a-нуклеазы по удельной активности будет полезна как при разработке тестов, использующих коллатеральную рибонуклеазную активность Cas13a, так и для оптимизации процедур экспрессии, очистки и хранения рибонуклеазы.

1. Kurbatov L.K., Radko S.P., Kravchenko S.V., Kiseleva O.I., Durmanov N.D., Lisitsa A.V. *Single Stage Purification of CRISPR/Cas13a Nuclease via Metal-Chelating Chromatography Following Heterologous Expression with the Preservation of Collateral Ribonuclease Activity // Appl. Biochem. Microbiol.* – 2020. – V. 56. – P. 671–677.

Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019-2027 годы (соглашение №075-15-2021-1345, Уникальный идентификатор проекта RF---193021X0012).

Pharmaceutical approach of the use of piracetam as a protective agent after fractionated gamma irradiation

Lalkovičová M.^{1,2}, Severyukhin Yu.S.^{1,3}, Kolesnikova I.A.^{1,3}, Utina D.M.^{1,3}, Lyakhova K.N.¹, Gaevsky V.N.¹

¹ *Laboratory of Radiation Biology, Joint Institute for Nuclear Research, Joliot-Curie 20, 14198 Dubna, Russia*

² *Institute of Experimental Physics, Slovak Academy of Sciences, Watsonova 47, 040 01 Kosice, Slovakia*

³ *Dubna State University, Universitetskaya 19, 14198 Dubna, Russia*

e-mail: lalkovicova@jinr.ru

Brain can be exposed to various types of ionizing radiation after a nuclear accident or during space flight, and also during medical treatment. Therefore it is important to find drugs that can influence radiation - induced disorders in the CNS. The neurometabolic stimulator piracetam could be used in space or medical radiobiology. This nootropic drug is used in experimental and clinical medical research, and showed a positive effect on the processes of learning and memory [1].

In the presented study, the impact of whole-body fractionated gamma irradiation was studied on the behavioral responses of adult rats.

In the experiment, male rats (15 animals) of Sprague Dawley (SD) strain, at the age of 8 months of 500–600 g were used. The first control group (5 animals) received daily intraperitoneal injections of 0.5 ml NaCl (0.9%) during the 14 days of the experiment. The second group (5 animals) was subjected to ⁶⁰Co gamma-irradiation at a dose of 0.5 Gy/day on 5 days per week over two weeks and also received daily intraperitoneal injections of 0.5 ml NaCl (0.9%). The third group (5 animals) was also subjected to a fractionated gamma irradiation of ⁶⁰Co at a dose of 0.5 Gy/day and then each animal received intraperitoneal injections of 0.5 ml of piracetam. The whole-body fractionated ⁶⁰Co gamma-irradiation at a total dose of 5 Gy was performed at the Rocus M facility (JINR MTC). The dose rate was 0.5 Gy/min at a SSD of 75 cm.

To study the behavioral reactions, the test systems Open Field (OF) and T-Maze were used. The testing time of OF was divided into two periods (0–3 min; 3–6 min), with the aim of dividing the animal's primary response to a new environment and secondary behavioral manifestations. Animals were euthanized by the decapitation method 24 h after behavioral testing. The brain of the animal was placed in a Carnoy's fixative, then enclosed in paraffin and 10 μm thick sections were prepared on a microtome. The staining methods used were cresyl violet according to the Nissl method and Fluoro Jade B. For statistical analysis Mann–Whitney pair analysis and ANOVA (with the significance of $p < 0.05$) was used.

The results showed ambiguous trends in the alternation of the T-Maze arms. The behavioral reactions in the Open Field during the first 3 min of testing showed statistically significant differences in the number of freezing reactions between the control animals and the group of gamma irradiation ($p = 0.009$). Statistically significant differences are also present between the piracetam and gamma group ($p = 0.03$). In the second period from 3 to 6 min, the speed of movement of the animal and the total distance covered were higher in gamma group in comparison with piracetam group ($p = 0.037$).

Piracetam, as a potential supplement, can be used in a treatment of radiation-induced cognitive-behavioral impairment in various cases of radiation damage.

1. *Vostrikov VV (2017) Place of piracetam in the modern practice of medicine. Rev Clin Pharmacol Drug Therapy 15(1):14–25. DOI: <https://doi.org/10.17816/rcf15114-25>*

Разработка сенсоров для биолюминесцентного иммуноанализа на основе люциферазы *Metridia*

Ларионова М.Д.¹, Маркова С.В.¹, Высоцкий Е.С.¹

¹ Институт биофизики СО РАН, ФИЦ «Красноярский Научный Центр СО РАН»,
Красноярск, Россия

Биолюминесцентные белки представляют собой удобные инструменты для разработки репортерных анализов, имеющие высокую чувствительность в *in vitro* и *in vivo* аналитических приложениях. Целентеразин-зависимые люциферазы и фотопротейны – привлекательные репортерные молекулы благодаря кофактор-независимой реакции, широкому линейному диапазону детекции и пределу обнаружения, достигающего аттомоль.

Люцифераза из копеподы *Metridia longa*, MLuc7 – естественно секретируемый фермент, катализирующий окисление целентеразина с испусканием голубого света. MLuc7 является наименьшей (16,5 кДа) люциферазой из всех известных, кроме того, обладает высокой удельной активностью, стабильностью, что делает ее перспективным биолюминесцентным репортером [1]. Небольшой размер люциферазы MLuc7 открывает возможности конструирования химерных молекул, минимизируя стерические препятствия и позволяя сохранить функциональную активность как специфичной, так и репортерной частей гибридного белка.

В настоящей работе мы оценили использование люциферазы MLuc7 при конструировании сенсорных молекул, применимых для биолюминесцентного иммуноанализа. Методами генетического слияния были получены конструкции для синтеза люциферазы, соединенной через гибкие мостики с одноцепочечным миниантителом, специфичным к белку оболочки вируса клещевого энцефалита; с мономерным стрептавидином; с ZZ-белком – элементом В-домена белка А; а также с шиповидным белком вируса SARS-CoV-2. Рекомбинантные гибридные белки, полученные с помощью бакуловирусной экспрессии, а также выделенные путем рефолдинга из бактериальных телец включения, демонстрировали высокую биолюминесцентную активность вне зависимости от N' или C'-терминальной локализации люциферазного домена [2]. Полученные репортерные белки были протестированы в рамках модельных биолюминесцентных твердофазных анализов для детектирования соответствующих мишеней.

Таким образом, нами был продемонстрирован высокий потенциал использования люциферазы MLuc7 как чувствительного сенсора для разработки новых биолюминесцентных иммунологических анализов.

1. Markova, S.V., Larionova, M.D., Burakova, L.P., Vysotski, E.S. *The smallest natural high-active luciferase: Cloning and characterization of novel 16.5-kDa luciferase from copepod Metridia longa* // BBRC. – 2015, 457(1): 77–82.
2. Larionova, M.D., Markova S.V., Tikunova N.V., Vysotski E.S. *The smallest isoform of Metridia longa luciferase as a fusion partner for hybrid proteins* // Int. J. Mol. Sci. – 2020, 21:4971.

Работа выполнена при поддержке совместного гранта №20-44-242003\20, предоставленного РФФИ, Правительством Красноярского края и Краевым фондом науки.

Репортеры внутриклеточных потоков ионов кальция на основе Ca^{2+} -регулируемых фотопротеинов

Маликова Н.П., Высоцкий Е.С.

*Институт биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский центр
«Красноярский научный центр СО РАН», Красноярск, Россия*

Изменения внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} контролируют множество клеточных процессов. Нарушение гомеостаза Ca^{2+} вызывает различные тяжелые заболевания. Чтобы понять механизмы, лежащие в основе Ca^{2+} -регуляции и как её нарушение связано с патологическими состояниями, необходимо измерить концентрацию Ca^{2+} . Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины, ответственные за биолюминесценцию морских кишечнополостных, успешно используются для этой цели на протяжении многих лет.

Показано, что фотопротеины позволяют измерять кальций в диапазоне концентраций 10^{-7} – 10^{-4} М. Однако в отдельных частях клетки концентрация Ca^{2+} выходит за границы диапазона чувствительности фотопротеинов (в ЭПР, в митохондриях, во внеклеточных жидкостях она высока и достигает 10^{-4} - 10^{-3} М, а в цитозоле, наоборот, низкая 10^{-8} - 10^{-7} М). Поэтому для мониторинга клеточного Ca^{2+} необходимы фотопротеины-репортеры с повышенной или пониженной чувствительностью к кальцию. С этой целью получен ряд мутантных фотопротеинов с изменённой чувствительностью к Ca^{2+} и одновременно изменённым спектром излучения. Среди исследованных мутантов отобраны вариант обелина с наибольшей чувствительностью к кальцию – OLI144H и спектром биолюминесценции, смещённым в длинноволновую область ($\lambda_{\text{max}} = 505$ нм) и мутант с наименьшей чувствительностью к кальцию – OLF88Y&F119W, излучающий в синей области спектра ($\lambda_{\text{max}} = 455$ нм). Оба мутанта демонстрировали высокую удельную активность, поэтому предложены в качестве репортеров для измерения внутриклеточного кальция в клеточных компартментах с разным содержанием свободного Ca^{2+} с одновременной регистрацией сигналов на двух длинах волн.

Кроме мутагенеза одним из подходов для изменения свойств фотопротеинов является использование синтетических аналогов субстрата (целентеразина). Характеризация биолюминесцентных свойств нескольких Ca^{2+} -регулируемых фотопротеинов: обелина, акворина и клитина, активированных различными аналогами целентеразина позволила получить полусинтетический фотопроtein обелин-*hcr*, скорость нарастания биолюминесцентного сигнала которого при резком изменении концентрации Ca^{2+} в 3 и 11 раз выше, чем у обелина и акворина, активированных нативным целентеразином, соответственно. В дополнение, обелин-*hcr* продемонстрировал более высокую чувствительность к Ca^{2+} по сравнению с обелином дикого типа и сохранил высокую активность. Сделан вывод, что обелин, заряженный целентеразином-*hcr*, является перспективным репортером для отслеживания быстрых переходов внутриклеточного кальция со временем нарастания биолюминесценции всего в несколько миллисекунд, например, в постсинаптическом отделе возбужденных нейронов или при сопряжении возбуждения и сокращения в сердечной мышце.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 20-04-00085

Разработка протокола для автоматизированного синтеза амидофосфатных олигодезоксирибонуклеотидов

Малова Е.А., Пышная И.А., Баженов М.А., Пышный Д.В.

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

Широкое использование синтетических олигонуклеотидов, тем более содержащих модификации, ограничивается только возможностями стандартного автоматического твердофазного синтеза. Так, электронейтральные амидофосфатные аналоги нуклеиновых кислот (НК) не применяют как объекты и/или инструменты в молекулярной биологии и биомедицине в виду (i) сложностей их синтеза [1] и (ii) ресурсозатратной нетривиальной химии [2]. Получение таких аналогов в рамках стандартного автоматического твердофазного синтеза – актуальная задача, на решение которой было направлено данное исследование.

Цель работы - разработка протокола синтеза амидофосфатных НК с помощью автоматического амидофосфитного метода синтеза олигонуклеотидов (ОН) по реакции Штаудингера.

Проведено сравнение флуоренилметилоксикарбонилизида (FmocN₃) и диметокситриптилазида (DMTrN₃) для реакции Штаудингера. FmocN₃ выбран для альтернативного окисления ОН в рамках стандартного автоматического твердофазного синтеза, поскольку реакция Штаудингера при его использовании протекает с приемлемой для синтетического протокола скоростью – менее чем за 1 час. Выявлено, что промежуточный ОН-продукт, содержащий Fmoc-защитную группу подвержен гидролизу в ходе синтеза олигонуклеотидов. Поэтому в разработанном протоколе введения NH₂-модификации после каждой стадии альтернативного окисления присутствует стадия удаления Fmoc-группы смесью 2% диазабициклоундецена и 5% N,O-бис(триметилсилил)ацетамида в ацетонитриле. Показана возможность синтеза гомо- и гетероолигонуклеотидов, содержащих 1÷3 PNH₂-модификации в разных положениях олигонуклеотидной цепи. Выход амидофосфатных аналогов НК варьировал от 32 до 70%.

Продемонстрировано, что введение одной амидофосфатной модификации в состав олигонуклеотида снижает температуру плавления его комплекса с ДНК-матрицей в среднем на 1,1 °С (1 М NaCl, 100 мМ CaCl₂, pH 7,2). Снижение ионной силы буферного раствора выявило менее выраженное снижение температуры плавления с тенденцией в сторону стабилизации ДНК/ДНК-комплексов.

Таким образом, подобраны предварительные условия для осуществления автоматического твердофазного синтеза ОН NH₂-группой у межнуклеозидного атома фосфора.

1. Peyrottes, S. Oligodeoxynucleoside phosphoramidates (P-NH₂): synthesis and thermal stability of duplexes with DNA and RNA targets // *Nucleic Acids Res.* – 1996. – Vol. 24. – N. 10. – P. 1841–1848.
2. Paul, S., Roy, S., Monfregola, L., Shang, S., Shoemaker, R., Caruthers, M. H. Oxidative Substitution of Boranephosphonate Diesters as a Route to Post-synthetically Modified DNA // *J. Am. Chem. Soc.* – 2015. – Vol. 137. – N. 9. – P. 3253–3264.

Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН №121031300042-1.

Transcriptomic analysis of anti-angiogenic effect of semisynthetic triterpenoid CDDO-Im in HUVECs: key CDDO-Im-susceptible biological processes and probable primary targets

Markov A.V., Odarenko K.V., Ilyina A.A., Zenkova M.A.

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

Pentacyclic triterpenoids are known to display a wide spectrum of pronounced pharmacological activities that demonstrates their suitability as promising platform for the development of novel drugs. Previously, a range of studies showed that cyano-enone-bearing triterpenoid CDDO-Im and its structural analogs effectively suppressed angiogenesis in various cellular and animal models. Despite extensive study of the anti-angiogenic activity of these compounds their molecular mechanism of action has not yet been identified.

In this work, we reconstructed key biological processes and CDDO-Im-susceptible pro-angiogenic genes and primary protein targets underlying the anti-angiogenic effect of this triterpenoid on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), using comprehensive bioinformatics approach. Re-analysis of cDNA microarray data of CDDO-Im-treated HUVECs (GSE71622) with subsequent functional annotation of revealed differentially expressed genes confirmed inhibitory effect of CDDO-Im on various angiogenesis-associated processes, which could be determined by its influence on the expression of key angiogenesis-related transcription factors *JUNB*, *FOXD1*, and *CEBPA*. Additionally, CDDO-Im was found to modulate expression of *FBXO32*, *A2M*, *BCL2L11*, *CD40*, *SPTBN1*, *SPSB1*, *CD55*, *SLC2A13*, and *ETS1*, playing an important role in neovascularization. Finally, combined bio-/chemoinformatics analysis of transcriptomics and proteomics data with subsequent verification by molecular modeling (network pharmacology analysis) revealed that the anti-angiogenic effect of CDDO-Im in respect to HUVECs can be mediated by its primary interaction with EGFR, mTOR, NOS2, HSP90AA1, MDM2, SYK, IRF3, ATR and KIF14.

Thus, obtained data provide valuable insights into the understanding of the mechanism of inhibitory activity of cyano-enone bearing triterpenoids on neovascularization and showed a range of novel promising therapeutic targets to control disorders associated with pathological angiogenesis.

This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant № 17-75-20120).

Возможность применения экзосом мезенхимальных стволовых клеток при воспалении

Матвеева В.А.¹, Артемьева Л.В.¹, Матвеев А.Л.¹, Селедцова Н.В.¹, Морозов В.В.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

Почти в 46% случаев причиной невынашивания беременности является хронический эндометрит (ХЭ). ХЭ, являясь локальным воспалением, вызывает нарушение местного иммунного ответа, ишемию, замещение железистого эпителия на простой, фиброз стромы в эндометрии матки, и приводит к нарушению его нормальной циклической трансформации и рецептивности. Поскольку, успешная имплантация эмбриона и последующая беременность зависят от состояния ткани эндометрия, то для восстановления фертильности при хроническом эндометрите требуется восстановление структуры и функции самого эндометрия.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) проявляют прорегенераторный, иммуномодулирующий и антиапоптотический эффекты. Возможно, терапия, основанная на регенеративном потенциале собственных стволовых клеток эндометрия, биологическими свойствами которых является поддержание беременности, может стать одним из новых подходов к лечению бесплодия.

Изучали эффективность внутриматочного введения экзосом мезенхимальных стволовых клеток функционального слоя эндометрия на фертильность нелинейных мышей ICR, у которых для формирования непродуктивное воспаление эндометрия матки был смоделирован синдром Ашермана [1].

Эзосомы получали [2], выделяя их методом ультрацентрифугирования из бессывороточной среды культивирования мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из образцов пайпель-биопсии функционального слоя эндометрия пациенток с хроническим эндометритом. Их идентифицировали методом проточной цитометрии, используя антитела, специфичные к CD9, CD63 антигенам, и методом электронной микроскопии. Количество экзосом определяли спектрофотометрически.

После внутриматочного введения экзосом (40 мкг/мышь) сроки наступления беременности у самок мышей, с воспаленным эндометрием, и фертильно-здоровых достоверно не отличались. В пометах мышей с синдромом Ашермана, которым вводили экзосомы, среднее количество рожденных и выживших мышат было достоверно больше, чем в пометах мышей, которым вводили бессывороточную среду для культивирования МСК.

Применение экзосом мезенхимальных стволовых клеток функционального слоя эндометрия восстанавливает фертильность мышей с поврежденным эндометрием матки.

1. Alawadhi F., Du, H. Cakmak H., Taylor H. S. Bone Marrow-Derived Stem Cell (BMDSC) Transplantation Improves Fertility in a Murine Model of Asherman's Syndrome. // PLOS ONE. - 2014. - V. 9. - P. e96662
2. Dias M. V. S., Martins V. R., Hajj G. N. M. Stress-Inducible Protein 1 (STI1): Extracellular Vesicle Analysis and Quantification. // Methods Mol Biol. - 2016. - N. 1459. - P. 161-74.

Исследование было поддержано грантом базового бюджетного финансирования № VI.62.2.1

Анализ свойств различных додецилсодержащих олигонуклеотидных производных

Миронова Е.М.^{1,2}, Жарков Т.Д.¹, Марков О.В.¹, Купрюшкин М.С.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Использование олигонуклеотидов и их производных становится все более востребованным в медицине, биотехнологии, молекулярной биологии. Так, одним из существенных достижений фармакологии является применение терапевтических нуклеиновых кислот (НК). Основными характеристиками, определяющими терапевтический потенциал НК-конструкций, являются повышенная нуклеазная устойчивость, улучшенное проникновение через мембрану клетки и высокоспецифическое биораспределение создаваемого препарата [1]. Для улучшения проникновения через мембрану клетки в состав олигонуклеотидов зачастую вводят липофильные группы. Существующее многообразие способов введения липофильных групп в состав олигонуклеотида показывает актуальность сравнительного анализа методов, используемых в химии нуклеиновых кислот.

В ходе данной работы был получен ряд олигонуклеотидных производных с использованием различных синтетических подходов к введению гидрофобных додецильных остатков. Так, был синтезирован амидофосфитный модификатор с использованием додеканола-1 и применён для введения додецильного остатка в олигонуклеотид в автоматическом режиме. Для получения производных, содержащих два или три додецильных остатка, был использован ряд подходов, в том числе и разработанный ранее в ИХБФМ СО РАН метод получения триазиламидофосфатных модификаций [2]. В рамках данной работы были получены последовательности, сочетающие в себе триазиламидофосфатную модификацию с амидофосфитным модификатором. Также были получены олигонуклеотидные производные с комбинацией разветвляющихся коммерчески доступных реагентов с додеканольным модификатором, по методу альтернативного йодного окисления в присутствии додециламина, и с использованием ненуклеотидных мономеров на основе оксамидного остова [3].

Для полученного ряда олигонуклеотидных производных был проведен анализ эффективности проникновения в эукариотические клетки. Была показана зависимость влияния количества и типа модификаций, несущих додецильные остатки на сравнительную эффективность проникновения через мембрану клетки.

1. Chen C., Yang Z., Tang X. *Chemical modifications of nucleic acid drugs and their delivery systems for gene-based therapy* // *Med. Res. Rev.* 2018. Vol. 38, № 3. P. 829–869.
2. Kupryushkin, M.S., Zharkov, T.D., Ilna, E.S. et al. *Triazinylamidophosphate Oligonucleotides: Synthesis and Study of Their Interaction with Cells and DNA-Binding Proteins.* *Russ J Bioorg Chem* 47, 719–733 (2021).
3. Kupryushkin M.S. et al. *Efficient functionalization of oligonucleotides by new achiral nonnucleosidic monomers* // *Org. Lett.* - 2014. - V. 16. - № 11. - P. 2842–2845;

Исследование было выполнено при финансовой поддержке гранта РФФ № 19-14-00204.

Универсальный дизайн фотосенсибилизаторов — ингибиторов проникновения суперкапсидных вирионов в клетку

Михновец И.Э.^{1,2}, Чистов А.А.¹, Мариевская К.А.¹, Красильников М.С.^{1,2}, Мрасов А.М.^{1,2}, Синичич А.А.^{1,2}, Никитин Т.Д.^{1,2}, Рубекина А.А.³, Коршун В.А.¹, Ширшин Е.А.³, Козловская Л.И.⁴, Штро А.А.⁵, Эйер Л.⁶, Алферова В.А.¹, Устинов А.В.¹

¹ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

² Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴ ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия

⁵ НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия

⁶ Биологический центр АН ЧР, Ческе-Будеёвице, Чехия

За последнее столетие эпидемии, вызванные оболочечными вирусами, унесли миллионы жизней. Глобализация и многочисленные контакты между людьми создали благоприятную обстановку для распространения вирусов человека и возникновения новых вирусных эпидемий, что является серьезной проблемой и требует от человечества оперативного реагирования и поиска возможных путей лечения вирусных заболеваний и ограничения распространения вирусов [1]. Продолжающаяся сейчас пандемия COVID-19, вызванная суперкапсидным SARS-CoV-2, показала, что не существует универсального противовирусного препарата, действующего на широкий спектр вирусов, а имеющиеся противовирусные препараты не могут быть быстро перепрофилированы для борьбы с другими вирусами.

Предотвращение проникновения вирусной частицы в клетку является перспективным подходом к борьбе с оболочечными вирусами. Мембрано-направленные соединения, ингибирующие слияние липидной мембраны вириона с клеткой, и тем самым репродукцию вируса, являются многообещающим классом: вирусная генетическая изменчивость не может послужить причиной развития резистентности к такому типу воздействия, поскольку липидный состав вирусной оболочки не кодируется в геноме, а заимствуется у клетки хозяина.

Амфифильные фотосенсибилизирующие молекулы [2] встраиваются в вирусную мембрану и под действием света нарушают целостность и физические свойства оболочки вириона, тем самым препятствуя слиянию вириона и клетки. Примерами таких соединений могут служить фотосенсибилизаторы 2-го типа (генерирующие активные формы кислорода, в частности, синглетный кислород $^1\text{O}_2$) на основе перилена и BODIPY; нами был разработан подход к созданию таких веществ. Хотя прямой корреляции между скоростью генерации $^1\text{O}_2$ в растворе и уровнем противовирусной активности фотосенсибилизаторов *in vitro* обнаружить не удалось, есть основания полагать, что именно генерация $^1\text{O}_2$ вблизи ненасыщенных связей липидов бислоя является важнейшей предпосылкой для высоких показателей вирулицидности и индекса селективности исследуемых соединений.

1. Lu L. et al. Antivirals with common targets against highly pathogenic viruses. *Cell*, 2021, 184, 1604–1620.

2. Mariewskaya K.A. et al. Photosensitizing antivirals. *Molecules*, 2021, 26, 3971.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 20-04-60499.

New insights into antitumor and immunomodulating potential of epoxide-bearing semisynthetic triterpenoids *in vitro* and *in vivo*

Moralev A.D.^{1,3}, Sen'kova A.V.¹, Savin I.A.¹, Salomatina O.V.^{1,2}, Salakhutdinov N.F.², Zenkova M.A.¹, Markov A.V.¹

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

In this study, two novel epoxides of the bioactive semisynthetic triterpenoid soloxolone methyl (SM) (α O-SM and β O-SM) were synthesized. The cytotoxicity of SM and its epoxides was screened on a panel of tumor and non-transformed human and mouse cells (11 lines). α O-SM and β O-SM were found to have pronounced cytotoxicity at low micromolar concentrations (average $IC_{50}^{(24\text{ h})} = 2.25\ \mu\text{M}$), and their level of bioactivity was lower than that of SM (average $IC_{50}^{(24\text{ h})}(\text{SM}) = 1\ \mu\text{M}$). Further studies revealed the ability of α O-SM and β O-SM to induce apoptosis in mouse B16 melanoma cells via mitochondrial caspase-dependent pathway, suppress their motility, adhesive and clonogenic capacities *in vitro*; the antitumor potential of triterpenoids decreased in the following order: SM > β O-SM > α O-SM. Besides, investigated compounds increased doxorubicin uptake by tumor cells. In an *in vivo* experiment, it was found that intraperitoneal injections of α O-SM and β O-SM significantly inhibited metastasis of B16 melanoma cells into the lungs of mice compared with the control.

Additionally, the anti-inflammatory potential of SM and its epoxides was studied. It was found that these triterpenoids effectively suppressed the production of NO by LPS/IFN- γ -activated mouse macrophages J774 and effectively inhibited their motility (bioactivity decreased in order: SM > β O-SM > α O-SM). The revealed anti-inflammatory potential of triterpenoids was further validated in a model of carrageenan-induced peritonitis in mice.

Interestingly, in murine models of B16 melanoma metastasis and carrageenan-driven peritonitis, SM and its epoxides exhibited similar efficiencies. Evaluation of toxicity-associated parameters *in vivo* indicated that α O-SM and β O-SM have somewhat hepato- and nephrotoxicity, and β O-SM showed a more safe profile than its α -counterpart. Considering the comparable antitumor and anti-inflammatory effects of α O-SM and β O-SM *in vivo* with reference drugs dacarbazine and dexamethasone, respectively, these compounds can be considered as novel promising antitumor and anti-inflammatory drug candidates.

This research was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 17-75-20120)

Обезболивающий синтетический пептид МодЭнк2 действует подобно морфину через мю-опиоидные рецепторы

Кропотова Е.С.^{1,2}, Ивлева И.С.³, Карпенко М.Н.³, Мосевичкий М.И.^{1,2}

¹ Петербургский Институт Ядерной Физики им. Б.П.Константинова НИЦ
“Курчатовский Институт”, Гатчина, Россия

² Институт Высокмолекулярных Соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт Экспериментальной Медицины, Санкт-Петербург, Россия

Ранее мы сконструировали и опробовали на экспериментальных животных (крысах) пептид $\beta\text{Ala-Tyr-Gly-Gly-Phe-NH}_2$, названный МодЭнк2, е.к. являлся модификацией эндогенного пептида энкефалина [1]. МодЭнк2 отличается от энкефалина стабильностью в среде мозга и, соответственно, длительным обезболиванием.

В настоящей работе показано, что налоксон и налтрексон, являющиеся сильными антагонистами мю-опиоидных рецепторов, эффективно подавляют обезболивающую способность МодЭнк2. Это означает, что МодЭнк2 является агонистом (лигандом) мю-опиоидных рецепторов. Агонистом этих рецепторов является также морфин, при систематическом приеме которого возникает зависимость. Нами установлено, что при систематическом приеме МодЭнк2 зависимость не возникает. Это означает, что действие МодЭнк2 ограничивается только анестезией. В отличие от морфия, этот пептид не стимулирует выход дофамина, что вело бы к эйфории, и не стимулирует удаление из плазматической мембраны мю-опиоидных рецепторов, что вызвало бы повышенную потребность в препарате (привыкание). Эйфория и привыкание являются основными причинами возникновения зависимости. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности МодЭнк2 как лекарства от боли.

1. Kropotova E., Ivleva I., Karpenko M., Mosevitsky M. Design of enkephalin modifications protected from brain extracellular peptidases providing long-term analgesia. *Bioorg. Med. Chem.* 2020. V. 28 115184. PMID: 31740204 DOI:10.1016/j.bmc.2019.115184

Bovine pancreatic RNase A: An insight into the mechanism of antitumor activity *in vitro* and *in vivo*

Mohamed I.S.^{1,2,3}, Sen'kova A.V.¹, Markov O.V.¹, Markov A.V.¹, Savin I.A.¹, Zenkova M.A.¹, and Mironova N.L.¹

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia*

² *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

³ *Faculty of Science, Al-Azhar University, Assiut, Egypt*

A number of ribonucleases belonging to the RNase A family, such as onconase and BS-RNase, have proven to be highly active antitumor drugs. However, it was shown that bovine pancreatic RNase A, which has the highest activity among the proteins of its family, does not exhibit cytotoxic activity against tumor cells, which was associated with its inactivation by an intracellular ribonuclease inhibitor (RI). Due to conflicting results on the antitumor activity of RNase A, its mechanism of action has not actually been studied to date. In this investigation, we extensively studied the mechanism of antitumor activity of bovine pancreatic RNase A.

Using confocal microscopy, we show that after RNase A penetration into HeLa and B16 cells, a part of the enzyme remains unbound with the ribonuclease inhibitor, resulting in the decrease in the content of cytosolic RNAs in both types of cells and rRNAs in nucleoli of HeLa cells. Molecular docking indicates the ability of RNase A to form a complex with Ku70/Ku80 heterodimer which is considered as intracellular transporter, and microscopy data confirm its localization mostly inside the nucleus, which may underlie the mechanism of RNase A intracellular traffic.

It was shown that RNase A reduced migration and invasion of tumor cells *in vitro*. *In vivo*, in the metastatic model of melanoma B16, RNase A suppressed metastases in the lungs and changed the expression of EMT markers in the tissue adjacent to metastatic foci; disrupting the favorable tumor microenvironment. A similar pattern of expression was observed for Cdh1, Tjp1, and Vim in metastatic foci but not for Fn genes, indicating a decrease in the invasive potential of tumor cells.

Bioinformatic analysis of RNase A-susceptible miRNAs and their regulatory networks showed that the main processes modulated by RNase A in the tumor microenvironment are the regulation of cell adhesion and junction, and pathways associated with EMT and tumor progression.

Keywords: RNase A; miRNAs; antitumour activity; tumour models

This work was supported by RSF grant 19-74-30011.

Функциональное профилирование репертуаров В-клеток вакцинированных аденовирусными и мРНК вакцинами с использованием микрофлюидных технологий

Овчинникова Л.А.¹, Абрикосова В.А.¹, Баранова М.Н.¹, Терехов С.С.¹,
Мокрушина Ю.А.¹, Смирнов И.В.^{1,2}, Ломакин Я.А.¹, Габибов А.Г.^{1,2}

¹ *Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

² *МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Новая коронавирусная инфекция, связанная с тяжелым острым респираторным синдромом (SARS-CoV-2), возникла в конце 2019 года и стала настоящим вызовом для мирового научного сообщества. Новые штаммы SARS-CoV-2 возникают довольно часто и имеют тенденцию вытеснять предыдущие. Терапевтические антитела против COVID-19 показали высокий клинический потенциал. Однако, традиционный поиск нейтрализующих моноклональных антител занимает несколько месяцев. В связи с этим, особый интерес представляет разработка высокопроизводительной и универсальной платформы, позволяющей отбирать нейтрализующие антитела в сжатые сроки.

В данном исследовании при помощи широкомасштабного секвенирования (NGS) мы сравнили репертуар правильно запаренных переменных фрагментов иммуноглобулинов (VH-VL) от пациентов, переболевших COVID-19, и вакцинированных доноров. Были созданы библиотеки антител с правильным сочетанием VH-VL для добровольцев, вакцинированных мРНК вакцинами (Pfizer-BioNTech, Moderna) или аденовирусной вакциной (Sputnik V). Первый этап создания таких библиотек включает изоляцию В-клеток из периферической крови и инкапсуляцию отдельных В-клеток в капли эмульсии с последующей иммобилизацией тотальной РНК из одной клетки на магнитных частицах с олиго(дТ). Далее в реакции ОТ-ПЦР происходит синтез кДНК и амплификация переменных доменов с получением ампликона VH-VL, в котором физически связаны переменные домены цепей иммуноглобулинов, принадлежащих одной В-клетке. Полученные библиотеки подвергаются скринингу с использованием лентивирусного или дрожжевого дисплея для выделения антител, эффективно связывающих основной антиген коронавируса SARS-CoV-2 – рецептор-связывающий домен (RBD). Главным преимуществом нашей системы является возможность быстрой оптимизации – изменение антигена на который производится отбор антител, например, на новый мутантный белок SARS-CoV-2. Мы использовали два варианта дисплея для отбора различных популяций антител, обладающих нейтрализующей активностью – конкурентное связывание (в присутствии ACE2) и связывание с антигеном в низкой концентрации. На основе лучших клонов, полученных в результате нескольких раундов таких отборов, были созданы полноразмерных антитела человека класса IgG1. Для таких антител была измерена вирус-нейтрализующая активность и получены константы диссоциации с RBD (K_D). Наш подход позволяет получить моноклональные нейтрализующие антитела из образцов сыворотки крови всего за 3-4 недели, при этом возможна модификация условий отборов антител под различные нужды.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 22-14-00219.

Molecular aspects of the effects of semisynthetic triterpenoids on LPS-driven acute lung injury and inflammation-associated epithelial mesenchymal transition of tumor cells

Odarenko K.V.^{1,2}, Sen'kova A.V.¹, Savin I.A.¹, Salomatina O.V.^{1,3}, Salakhutdinov N.F.³, Zenkova M.A.¹, Markov A.V.¹

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia*

² *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

³ *N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Novosibirsk, Russia*

Acute lung injury (ALI) is a severe comorbidity in surgically treated patients with lung cancer, causing a significant decline in their survival. Inflammation on the early step of ALI leads to its progression to the fibrotic stage and lung cancer metastasis. This process is associated with the ability of several inflammatory cytokines to induce epithelial-mesenchymal transition (EMT) in both normal and malignant cells, increasing their migratory and invasive properties and production of ECM components. The similar effect was shown for leptin, an adipose tissue hormone, which promotes inflammation and induces EMT in tumor cells.

In this work, we reported that cyano enonecontaining semisynthetic triterpenoid soloxolone methyl (SM) and its derivatives soloxolone (S) and soloxolone amidoxime (SAO), bearing carboxyl and amidoxime substituents at the C-20 position, respectively, blocked LPS-induced ALI in mice by inhibition of macrophage activation and thrombin activity as well as anti-apoptotic effect on pneumocytes. Using the cultivation of human lung adenocarcinoma A549 cells in conditioned medium obtained from LPS-stimulated human macrophages THP1 with addition of LPS, we demonstrated that SM was unable to block inflammation-induced EMT in A549 cells.

Additionally, S, SM and SAO blocked leptin-induced increase in proliferation of murine melanoma B16 and neuroblastoma Neuro2a cells. Besides, SM was found to inhibit leptin-driven decrease in Neuro2a adhesion to ECM, which demonstrates susceptibility of leptin signaling to evaluated compounds, although SM had no influence on leptin-induced migration of Neuro2a cells. Interestingly, simultaneously with increased migration, leptin decreased the expression of the mesenchymal markers vimentin and fibronectin and increased the expression of the epithelial marker ZO1 in Neuro2a cells, i.e., its effect on cell migration was not associated with EMT induction.

Thus, obtained results showed a high potency of S, SM and SAO as the probable inhibitors of ALI. In addition, we demonstrated that (i) SM did not affect inflammation-induced EMT, (ii) leptin did not induce EMT in Neuro2a and (iii) SM effectively inhibit leptin-associated proliferation of tumor cells and increased their adhesiveness.

This research was funded by the Russian Science Foundation (Grant No. 19-74-30011).

Изучение структуры лед-связывающих белков как потенциальных криопротекторов

Олейник Г.А.¹, Баранова С.В.¹, Жданова П.В.¹, Чернонос А.А.¹, Коваль В.В.^{1,2}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины,
630090, Россия, г. Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, д. 8,

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
630090, Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 1.

Вопрос сохранения жизнеспособности, как целых живых объектов, так и их частей при низких температурах является актуальным для многих областей науки и медицины. В природе существуют организмы, способные выживать в холодных условиях, благодаря содержащимся в них лед-связывающим белкам. Лед-связывающие белки обладают способностью понижать температуру замерзания, связываться со льдом и ингибировать его рост. Таким образом, лед-связывающие белки потенциально могут применяться в криохирургии [1] и использоваться в качестве криопротекторов для сохранения различных живых объектов от клеток крови до донорских органов и эмбрионов [2].

Для использования лед-связывающих белков в какой-либо технологии, необходимо досконально изучить и понять механизм их действия. Так как свойства белков в первую очередь зависят от их структуры, требуется изучение конформаций белков, как в свободном состоянии, так и в виде их комплексов. При этом структура большинства лед-связывающих белков не установлена. Поэтому целью данной работы было изучение строения лед-связывающих белков, как экспериментальными методами, так и методом молекулярного моделирования.

1. Bialkowska A., Majewska E., Olczak A et al. *Ice-Binding Proteins: diverse biological roles and applications in different types of industry* // *Biomolecules* – 2020 – 25 p.
2. Sung G. L., Hye Y. K., Jun H. L. *Cryopreservative effects of the recombinant ice-binding protein from the arctic yeast *Leucosporidium* sp. on red blood cells* // *Appl. Biochem. and Biotechnol.* – 2012 – P 824–834

Исследование было поддержано проектом базового бюджетного финансирования ИХБФМ СО РАН № 0245-2021-0002 и грантом Минобрнауки России № 075-15-2022-263.

Белок E SARS-CoV-2 как потенциальная мишень для диагностики COVID-19 и постковидных состояний

Орлова Е.А., Кондратов И.Г., Огарков О.Б., Колесникова Л.И.

Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия

Белки вируса SARS-CoV-2 вызывают иммунный ответ разной интенсивности, а среди постковидных осложнений аутоиммунные реакции играют важную роль. Белок оболочки E способствует сборке и высвобождению вирионов, а также модулирует патогенез вирусной инфекции. Высказываются гипотезы о способности его компонентов вызывать кросс-реактивный иммунитет за счёт структурного сходства с белками других патогенов или в качестве аутоантигена. Несмотря на наличие как минимум трёх В-клеточных эпитопов, имеются противоречивые данные относительно гуморального иммунитета против белка E у пациентов с COVID-19. Цель данной работы – получить растворимый рекомбинантный белок E для изучения его роли при COVID-19 и способности вызывать гуморальный иммунитет.

Последовательность гена E клонировали в вектор рГУВ12 для экспрессии гибридного белка в системе интеин-опосредованного аутосплайсинга. Белок-прекурсор очищали с помощью аффинной хроматографии за счёт хитин-связывающего домена. Элюированный белок E подвергали двухэтапной ультрафильтрации для очистки от интеина и концентрирования.

Для исследования гуморального иммунитета анализировали 118 образцов крови пациентов, разделённых на две группы: здоровые доноры и реконвалесценты COVID-19. Принадлежность к группам подтверждали сбором анамнеза и результатами количественного ИФА на наличие anti-S IgG (Вектор-Бест). Для обнаружения anti-E IgG в образцах крови проводили полуколичественный ИФА с использованием полученного рекомбинантного белка. Результаты оценивали по коэффициенту позитивности (КП), где $KП \geq 0,8$ считали положительным, $KП < 0,4$ – отрицательным, $0,4 \leq KП < 0,8$ – пограничным. Значимость различий между группами оценивали с помощью критерия Манна-Уитни, корреляцию anti-S/anti-E IgG – с помощью коэффициента Спирмена. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

В группе реконвалесцентов COVID-19 были выявлены 5 % носителей антител к белку E, 19 % попали в «серую зону», разброс значений КП составил от 0,1 до 2. Различия с группой здоровых доноров, где КП не превышал 0,3, статистически достоверны ($p = 0,002$). Разброс абсолютных значений anti-S IgG оказался весьма значительным: от 16 до 891 BAU/мл при среднем значении 322 BAU/мл. Анализ корреляции абсолютного уровня anti-S IgG с относительным уровнем anti-E IgG показал слабую положительную связь ($R = 0,29$, $p = 0,03$).

Таким образом, белок E SARS-CoV-2, вероятно, играет роль альтернативного индуктора гуморального иммунитета, что позволяет использовать его в качестве мишени для диагностики COVID-19. Преимущество разработанного подхода – это растворимая форма полученного рекомбинантного белка, пригодная для изучения его биологической активности на клеточном уровне, в первую очередь у больных с аутоиммунными постковидными осложнениями.

Artificial cell-derived nanovesicles as a delivery system for therapeutic nucleic acids

Oshchepkova A.L.¹, Gaponova S.K.¹, Patutina O.A.¹, Markov O.V.¹, Chernikov I.V.¹, Evtushenko E.G.², Chernonosov A.A.¹, Kiseleva E.V.³, Morozova K.N.³, Matveeva V.A.¹, Artemyeva L.V.¹, Chernolovskaya E.L.¹, Vlassov V.V.¹, Zenkova M.A.¹

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Lipid-based drug delivery systems are taking the lead due to their biodegradability, but some of them have undesirable toxicity. Extracellular vesicles (EVs) are cell-derived membrane vesicles, which are considered biocompatible carriers, but their practical use is restrained due to the lack of efficient production and isolation methods. The fabrication of EV mimetics has become more widespread in recent years. We focused our attention on nanovesicles obtained by treating cells with the actin destabilizing agent, cytochalasin B, and showed that these nanovesicles, named CINVs, were internalized by human cells more efficiently than EVs or other EV mimetics that we tested.

First of all, we studied the selectivity of CINV interaction with various human and mouse cell cultures. We found that the internalization of CINVs depends on the receptor-ligand interaction between them and the recipient cells. However, the efficiency of CINV uptake was largely determined by the properties of the cells themselves, and not by the cellular source of CINVs. Furthermore, in some cases, the use of CINVs derived from late apoptotic cells was more appropriate: this finding let us a 10-fold increase in the efficiency of CINV uptake by K562 cells.

Then we examined the effect of CINVs on cell viability and proliferation, because cytochalasin B could be toxic to cells. We assessed its content in several CINV samples using mass spectrometry. The effects of CINVs and an equal amount of free cytochalasin B on cells differed. Surprisingly, the CINVs caused a temporary delay in cell division, which soon restored to a normal value.

Finally, we investigated the delivery of functional therapeutic nucleic acids into cells mediated by CINVs. We found that 2'-O-methyl, and 2'-F fully modified anti-MDR1 siRNAs, delivered by CINVs, exhibited no biological effect in KB-3-1-MDR1-GFP cervical carcinoma cells, while miRNA21 targeted mesyl (methanesulfonyl) phosphoramidate antisense DNA-oligonucleotides (μ -ASOs) also delivered by CINVs caused at least a 35% decrease in miRNA21 level in B16 mouse melanoma cells. Thus, CINVs do deliver functional therapeutic nucleic acids into cells, but the properties of nucleic acids, which affect their efficient intracellular accumulation and execution of biological function, are the subject of our further research.

This work was supported by RSF grant 19-74-30011

Using of binary guide RNAs for the optimization of the CRISPR/AsCas12a system in mitochondria

Pavlova A.¹, Heckel A.-M.², Shebanov N.², Pyshnaya I.¹, Tarassov I.², Entelis N.², Venyaminova A.¹, Meschaninova M.¹

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² UMR7156 - Molecular Genetics, Genomics, Microbiology, University of Strasbourg - CNRS, Strasbourg, France

Mitochondria are mammalian cell organelles involved in many metabolic processes. The operation of these processes is provided by a large number of proteins encoded in both the nuclear and mitochondrial (mtDNA) genomes. Mutations in mitochondrial genes can cause a number of diseases. A feature of most pathogenic mutations is heteroplasmy - the presence of normal and mutant forms of mtDNA in the same cell. Application of CRISPR/Cas system for mitochondrial genome editing can represent a future therapeutic approach.

To design the guide RNAs capable to discriminate pathogenic point mutations in mtDNA genes, an approach involving the separation of the guide RNA into two 20-nucleotides moieties, guide-fragment responsible for annealing to target DNA, and handle-fragment forming a secondary structure for binding to the Cas12a protein [1], was applied. We synthesized RNA guide-fragments bearing modifications and mismatches which were previously proposed to decrease off-target cleavage of nuclear DNA [2].

A comparative study of the annealing between RNA guide-fragments and DNA target oligonucleotides bearing or not the point mutations demonstrated that the T_m of duplexes was depended on the type of modifications and their location relative to the mutation point. We also performed mtDNA *in vitro* cleavage test using the CRISPR/AsCas12a system containing binary guide RNAs and found a correlation between the efficiency of cleavage by the CRISPR/AsCas12a system of native and mutant mtDNA and the data of thermal denaturation of RNA guide-fragment/mtDNA complexes. A number of patterns have been identified allowing to evaluate the possibility of reducing nonspecific DNA cleavage by the CRISPR/AsCas12a complex.

Thus, we proposed an approach to select the modified RNA guide-fragments based on the study of their hybridization properties in combination with the study of the ability of such binary guide RNAs to cleave DNA targets *in vitro*. This approach can accelerate the discovering of optimal variants of modified guide RNAs for efficient and specific cleavage of mutant mtDNA targets *in vivo*.

1. Shebanova et al. Efficient target cleavage by Type V Cas12a effectors programmed with split CRISPR RNA // *Nucl. Acids Res.* - 2022. - V.50. - P. 1162-1173.
2. Kim et al. Enhancement of target specificity of CRISPR-Cas12a by using a chimeric DNA-RNA guide // *Nucl. Acids Res.* - 2020. - V.48. P.8601-8616.

This study is supported by the RFBR/CNRS joint IEA project no. 20-54-15005 and LabEx MitoCross IdEx Unistra ANR-10-IDEX-0002(France).

Самоорганизация комплексов сывороточных альбуминов с нуклеиновыми кислотами

Павлова А.С.¹, Илющенко В.В.^{1,2}, Пышный Д.В.¹, Пышная И.А.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

В настоящее время возрастает количество исследований, направленных на разработку самоорганизующихся систем на основе сывороточного альбумина и нуклеиновых кислот для применения в биомедицине [1-3].

В данной работе в рамках разработки и оптимизации методик получения самоорганизующихся систем, в том числе гидро- и наногелей, продемонстрирована возможность создания высокомолекулярных ассоциатов на основе СА, додецил-содержащих олигонуклеотидов (ДСО) [4] и НК.

При исследовании связывания СА с комплементарными ДСО (кДСО) методом задержки в полиакриламидном геле были получены комплексы с меньшей электрофоретической подвижностью в сравнении с ассоциатами альбумина с некомплементарными ДСО, что свидетельствует о возможной «сцепке» белка в составе данных комплексов за счёт Уотсон-Криковских взаимодействий между кДСО, связанных с разными молекулами СА. Аналогичные результаты были получены при анализе подвижности комплексов СА, додецил-содержащих олиготимидилатов и полиадениловой кислоты в агарозе.

Полученные результаты свидетельствуют о высоком потенциале использования СА и ДСО в качестве платформенных соединений для разработки самоорганизующихся систем, обладающих свойствами биосовместимых нано- и гидрогелей, для тераностики различных видов опухолей, а также для целей регенеративной медицины.

1. Lacroix A., Edwardson T. G. W., Hancock M. A., Dore M. D., Sleiman H. F. *Development of DNA nanostructures for high-affinity binding to human serum albumin.* // *J. Am. Chem. Soc.* - 2017. - V. 139. - P 7355–7362.
2. Wei J., Sun S., Lu Q., Gao P., Wang Y., Li X., Jiang Y. *The formation of fibers via complementary base pairing of DNA-conjugated bovine serum albumin.* // *Chin. Chem. Lett.* - 2018. - V. 29. - P 461–463.
3. Thelu H. V. P., Atchimnaidu S., Perumal D., Harikrishnan K. S., Vijayan S., Varghese P. *Self-assembly of an aptamer-decorated, DNA–protein hybrid nanogel: a biocompatible nanocarrier for targeted cancer therapy.* // *ACS Appl. Bio Mater.* - 2019. - V. 2. - P 5227–5234.
4. Pavlova A. S., Dovydenko I. S., Kupryushkin M. S., Grigor'eva A. E., Pyshnaya I. A., Pyshnyi D. V. *Amphiphilic “like-a-brush” oligonucleotide conjugates with three dodecyl chains: self-assembly features of novel scaffold compounds for nucleic acids delivery.* // *Nanomaterials.* - 2020. - V. 10. - P 1948.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1

Иммуноанализ онкомаркера сурвивина в образцах мочи при раке мочевого пузыря

Панамарев Н.С.^{1,2}, Башмакова Е.Е.², Франк Л.А.^{1,2}

¹ Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

² Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия

На переходно-клеточный рак мочевого пузыря приходится 2,8% случаев заболеваемости раком в России у обоих полов, а у мужчин доходит до 4,6%. Также он занимает седьмое место по встречаемости среди самых распространённых типов рака [1]. Цистоскопия, которая является золотым стандартом для определения данного типа рака и прогнозирования выживаемости после лечения, является инвазивным и дорогим методом. Поэтому необходима разработка нового неинвазивного, чувствительного и высокоспецифичного метода для обнаружения и прогнозирования рака мочевого пузыря.

Сурвивин - наименьший белок в группе белков-ингибиторов апоптоза, который также принимает участие в регуляции деления клеток и способствует ангиогенезу. Нарушение экспрессии сурвивина способствует онкогенезу, его сверхэкспрессия наблюдается практически во всех злокачественных опухолях человека. Сообщается, что мочевой сурвивин является отличным онкомаркером для диагностики рака мочевого пузыря [2]. Однако все коммерчески доступные наборы для выявления сурвивина, в настоящее время представлены импортными производителями и предназначены только для исследовательских целей. В связи с этим, является актуальной разработка отечественной высокочувствительной аналитической системы пригодной для выявления сурвивина в моче.

В рамках данного исследования был разработан биолюминесцентный иммуноанализ сурвивина в конкурентном и сэндвич форматах. В качестве высокочувствительной метки использовали Ca^{2+} -регулируемый фотопротеин обелин, светоизлучающий белок, хорошо зарекомендовавший себя как репортер в молекулярном анализе. Исследован аналитический потенциал предложенных вариантов биолюминесцентного иммуноанализа сурвивина в модельных и клинических образцах мочи. Для сравнения 44 клинических образца мочи, среди которых 32 – от пациентов с диагнозом РМП и 12 – без этого диагноза (контрольные) были проанализированы с помощью коммерческого набора на основе колориметрического иммуноанализа. Показана перспективность выявления сурвивина в моче для неинвазивной диагностики РМП и актуальность разработки отечественной аналитической системы для его выявления.

1. Каприна А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. Злокачественные новообразования в России в 2020 году // М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2021, 252 С.
2. Margulis V., Lotan Y., Shariat SF. Survivin: a promising biomarker for detection and prognosis of bladder cancer // World J Urol – 2008, № 26(1), P.59-65

Исследования поддержаны Красноярским краевым фондом поддержки научной и научно-технической деятельности, проект № 241 от 28.04.2021 г.

Ассоциация полиморфизмов генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы с выраженностью атеросклеротического поражения коронарных артерий у больных острым инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST

Першин В.И.^{1,2}, Максимова Н.С.¹, Кузьмичев К.В.¹, Фролов А.А.¹, Будкина М.Л.¹, Щелчкова Н.А.^{1,2}, Починка И.Г.¹

¹ ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет»
Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

² ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»,
Нижний Новгород, Россия

Цель: определить наличие ассоциаций между полиморфизмом генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и выраженностью атеросклеротического поражения коронарных артерий у больных острым инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST.

Материалы методы: проведено поперечное обсервационное исследование (clinicaltrials.gov, nct05355532), включены 25 больных острым инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST, госпитализированных в пределах 48 часов от начала симптомов и подвергнутых чрескожному коронарному вмешательству. Выраженность атеросклеротического поражения коронарных артерий оценивалась по данным селективной коронарографии с использованием шкалы SYNTAX. Для определения однонуклеотидных полиморфизмов применялся метод полимеразной цепной реакции в реальном времени на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad, США) с использованием набора «КардиоГенетика Гипертония» (ДНК-технология, Россия). Исследовались следующие полиморфизмы генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы: AGT 704T>C, rs699 и 521C>T, rs4762; AGTR1 1166A>C, rs5186; AGTR2 1675G>A, rs1403543 и CYP11B2 -344C>T, rs1799998. ДНК экстрагировали из лейкоцитов фенол-хлороформным методом по Vorreiter et al., 2016 с помощью набора Extract RNA (Евроген, Россия).

Результаты: выявлены следующие частоты наличия исследуемых полиморфизмов у больных ОИМпST: 1166A>C гена AGTR1 - n = 8 (32%); -344C>T гена CYP11B2 - n = 21 (84%); 1675G>A гена AGTR2 - n = 10 (40%); 704T>C гена AGT - n = 11 (44 %); 521C>T гена AGT - n = 8 (32%). Обнаружено, что оценка выраженности коронарного атеросклероза по шкале SYNTAX в группе пациентов с полиморфизмом 1166A>C гена AGTR1 составила 24 [20; 27] баллов vs 13 [9; 23] (p=0,032, Mann-Whitney) в группе гомозигот по нейтральному аллелю. Схожая закономерность наблюдалась при анализе групп с полиморфизмом -344C>T гена CYP11B2: в группе с наличием полиморфизмов 20 [15; 24] баллов vs 6 [4; 9] баллов (p=0,002, Mann-Whitney). В обоих случаях выраженность коронарного атеросклероза среди гетерозигот и гомозигот по минорному аллелю достоверно не различалась. Достоверных ассоциаций полиморфизмов 1675G>A гена AGTR2, а также 704T>C и 521C>T гена AGT с оценкой по шкале SYNTAX обнаружено не было.

Выводы: больные ОИМпST характеризуются высокой распространенностью полиморфизмов генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы. Полиморфизмы rs5186, 1166A>C гена рецептора 1 типа для ангиотензина II и rs1799998, -344C>T гена альдостеронсинтазы ассоциируются с клинически значимой большей выраженностью коронарного атеросклероза.

Работа выполнена в рамках программы «Приоритет 2030».

The application of the stem cell technologies to promote reparative regeneration of the rat nerve

Petrova E.S., Kolos E.A.

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, e-mail: iempes@yandex.ru

In recent decades, new ways to restore peripheral nerves after injury have been actively developed. The relevance of such studies is associated with frequent nerve damage as a result of fractures and bruises or compression during the formation of neoplasms. Neuroplasty, new drugs, electrical stimulation, magnetic field therapy, neurotrophic factors, gene therapy, etc. are used to restore nerve trunks. Conduits from biodegradable materials are being developed to connect the proximal and distal segments of the damaged nerve. The development of cell therapy for a damaged peripheral nerve is being actively carried out in an experiment. Transplantation of different stem cells can have a stimulating effect on reparative processes in the damaged nerve. The molecular and cellular mechanisms of these effects are still unclear. The aim of this work was to study the survival and differentiation of neural stem/progenitor cells (NSPCs) and mesenchymal stem cells (MSCs) after their transplantation into the nerve of an adult rat. The sciatic nerve of recipient rats was lesioned by application of a ligature for 40 s. NSPCs were obtained by dissociation of rat embryonic neocortex and embryonic spinal cord (E14-15). MSCs were derived from bone marrow of Wistar-Kyoto rats (provided by “Trans-Technologies”, D.G.Polyntsev, Head). The suspension of BrdU-labeled cells (5×10^4 in $5 \mu\text{l}$ medium) was infused into sciatic nerve of adult rats. The differentiation of transplanted cells was studied by identifying immunohistochemical markers. NeuN was used to visualize neurons, vimentin was used to visualize MSCs, GFAP was used to detect gliocytes; claudine 1 was used as a marker of perineurium cells. The study found: dissociated cells of the embryonic neocortex and spinal cord survive for 2 months after transplantation into the nerve, while most transplanted MSCs die during the first week after transplantation. NSPCs differentiate into neurons and gliocytes, which are localized in the endoneurium of the nerve trunk. Transplanted MSCs are localized not only in the endoneurium, but also in the outer shells of the recipient’s nerve. Some of them differentiate into adipocytes of epineurium and cells of perineurium. It was found that the use of MSCs, but not of neural progenitor cells, leads to an increasing amount of blood vessels in the nerve. It was shown that the use of MSCs, in contrast to neural progenitors, results in increase of the recipient’s nerve sheaths thickness by more than one and a half times. Two months after surgery, a study of the thickness of peripherin-immunopositive nerve fibers in the distal segment of the injured nerve showed that the percentage of a larger diameter fibers was higher in the group of animals treated with MSCs than in the control group.

Функциональная характеристика митохондриального фактора инициации трансляции 2 пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Пиунова У.Е., Балева М.В., Чичерин И.В., Левицкий С.А., Каменский П.А.

Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва, Россия

Процесс биосинтеза белка в митохондриях напоминает трансляцию у бактерий, однако имеет ряд уникальных черт. Основная регуляция реализации генетической информации в митохондриях происходит именно на уровне трансляции, а стадия инициации трансляции является лимитирующей для всего процесса биосинтеза белка, что обуславливает ее особую важность в регуляции. Данное исследование посвящено функциональной характеристике фактора инициации митохондриальной трансляции 2 (IFM1) пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Согласно результатам исследования эффективности митохондриальной трансляции, в отсутствие IFM1 митохондриальная трансляция дрожжей не прекращается, но наблюдается ее значительная разбалансировка по сравнению со штаммом дикого типа.

Рост штамма с нокаутом IFM1 оказался полностью ингибирован на средах с несбраживаемым источником углерода, что свидетельствует о невозможности осуществления митохондриального дыхания в отсутствие IFM1. Нами было показано, что дрожжи нокаутного штамма не способны поглощать кислород даже в присутствии разобциателя.

Мы исследовали взаимосвязь нарушений трансляции отдельных белков с активностью комплексов и сборкой суперкомплексов митохондрий. Результаты свидетельствуют о значительной разбалансировке сборки суперкомплексов, коррелирующей с разбалансировкой митохондриальной трансляции и данными ростовых и дыхательных экспериментов.

Протекание митохондриальной трансляции в отсутствие IFM1 говорит о том, что IFM1 не является необходимым для позиционирования миторибосомы на стартовом кодоне, несмотря на наличие протяженных 5'-нетранслируемых областей митохондриальных мРНК дрожжей. Для того, чтобы оценить роль IFM1 во внутренней инициации трансляции, мы использовали метод toeprinting, который ранее не применялся для исследования митохондриальных рибосом дрожжей. Анализ мест посадки митохондриальной рибосомы на мРНК *Cox2* в составе инициаторного комплекса показал, что наличие 5'-нетранслируемой области мРНК и инициаторной тРНК не влияет на узнавание рибосомой стартового кодона, однако в присутствии IFM1 снижается эффективность взаимодействия рибосомы с мРНК, что соответствует повышению эффективности трансляции *Cox2* в нокаутном штамме.

Таким образом, IFM1 не является необходимым для осуществления митохондриальной трансляции у *S. cerevisiae*, однако его отсутствие приводит к неспособности клеток осуществлять митохондриальное дыхание ввиду разбалансировки синтеза белка в органелле. IFM1 специфично модулирует синтез отдельных митохондриально- кодируемых белков, в частности снижает эффективность трансляции *Cox2*.

Наночастицы карбоната кальция и диоксида кремния как компоненты терапевтических и диагностических систем

Попова В.К., Ломзов А.А., Дмитриенко Е.В.

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

Благодаря малым размерам наночастиц обеспечивается увеличенная удельная площадь поверхности, и как следствие, высокая ёмкость к гостевым молекулам, что перспективно для современных нужд как диагностики, так и терапии при конструировании систем на основе наноматериалов. Неорганические наночастицы (НЧ), в том числе карбоната кальция (СаНЧ) и диоксида кремния (SiНЧ) могут быть использованы для данных целей. Несмотря на их преимущества, такие как биосовместимость, биоразлагаемость, а также возможность рН-зависимого высвобождения транспортируемых молекул, до сих пор не было предложено универсальной платформы ни для транспорта, ни для детектирования веществ *in vivo* [1].

Данное исследование направлено на разработку перспективных наноносителей, обладающих высокой ёмкостью по отношению к лекарственным молекулам и биологически активным веществам, способным к выделению биомолекул.

Разработаны протоколы синтеза СаНЧ и SiНЧ и получены наночастицы, которые отвечают следующим критериям: наноразмерность, монодисперсность, стабильность суспензии как в водных растворах так, и условиях близких в физиологическом. Показана высокая ёмкость НЧ по отношению к лекарственному препарату – доксорубину (DOX), а также модифицированных стрептавидином НЧ (НЧ-St) к связыванию биотинилированных олигонуклеотидов.

Продемонстрировано рН-зависимое высвобождение DOX для двух типов наноматериалов. Эффективность высвобождения лекарственного средства составляет более 80% при рН < 5 и менее 35% – при рН 7. Изучена цитотоксичность НЧ и НЧ-DOX на двух линиях клеток (A549, НЕК 293). Установлено отсутствие токсичности НЧ вплоть до 50 мкг/мл, а также эффективность ингибирования роста клеток конструкцией НЧ-DOX, сопоставимая с DOX.

Изучена возможность использования модифицированных НЧ для структурно-специфического выделения белков из клеточного лизата. Показано превосходство эффективности выделения белков с помощью полученных НЧ-St в сравнении с коммерчески доступными магнитными частицами. Идентифицирован белок, взаимодействующий с псевдоузлом TW-типа.

В работе показана перспективность использования синтезированных СаНЧ и SiНЧ для систем транспорта и / или выделения биологически активных веществ, направленные на развития методов и подходов персонализированной медицины.

1. Zhao Z. T., Zhou W., Hui D., Xiao C., Qi J., др. всего 8 человек. A review on the properties, reinforcing effects, and commercialization of nanomaterials for cement-based materials // *Nanotechnol. Rev.* - 2020. - V. 9. - P. 303-322.

Исследование было поддержано базовым бюджетным финансированием ПФНИ ГАН №121031300042-1, РФФИ № 20-04-00719.

Реагенты для флуоресцентного поляризационного иммуноанализа и изучения взаимодействия биомолекул

Прохоренко И.А.¹, Глушенко Д.А.¹, Гуляк Е.Л.¹, Мухаметова Л.Э.², Ерёмин С.А.²

¹ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

² Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Иммунохимические методы анализа, которые основаны на высокоспецифическом связывании определяемого соединения, или антигена, с антителами, прочно вошли в аналитическую практику и применяются в различных областях медицины, сельского хозяйства, пищевой промышленности и мониторинге окружающей среды. Поляризационный флуороиммуноанализ (ПФИА) основан на конкуренции определяемого вещества и низкомолекулярного антигена, меченного флуоресцентной меткой (трейсера), за связывание с ограниченным количеством антител и измерении в следствии этого поляризации флуоресценции реакционной смеси. [1] Среди многих иммунохимических методов анализа ПФИА остаётся перспективным в современной диагностике поскольку он позволяет быстро определять концентрацию первого в растворе, а результат может быть получен за считанные минуты. [2]

Мы синтезировали бифункциональный реагент с помощью которого были получены производные флуоресцентных красителей 6-FAM и BDP-FL, содержащие защищённую аминоксигруппу. В условиях мягкого кислотного катализа они вступали в реакцию оксимного лигирования с производными кето-стероидов с образованием флуоресцентных конъюгатов для ПФИА. При получении оксимов из биологически активных кето-стероидов наблюдалось образование геометрических изомеров по оксимной связи. Подобраны условия для их селективного разделения с помощью ОФ-ВЭЖХ и препаративной ТСХ.

Стереоизомеры трейсера прогестерон-6-FAM были протестированы в методе ПФИА и полученные результаты показали высокую эффективность при анализе прогестерона с помощью моноклональных антител в растворе по сравнению с опубликованным ранее трейсером с более жёстким линкером на основе этилендиамина. При этом, один из стереоизомеров, а именно Z-изомер оказался более чувствительным в ПФИА по сравнению с E-изомером.

Флуоресцентные красители, функционализированные защищённой аминоксигруппой на линкере различной длины могут быть использованы для получения новых флуоресцентных зондов для биохимического анализа и исследования межмолекулярных взаимодействий.

1. Dandliker W.B., Feigen G.A. Quantification of the antigen-antibody reaction by the polarization of fluorescence // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1961. - V. 5. - №. 4. - p. 299–304.
2. Zhang H., Yang S., De Ruyck K., Beloglazova N.V., Eremin S.A., et al. Fluorescence polarization assays for chemical contaminants in food and environmental analyses // *Tr. Anal. Chem.* - 2019. - V. 114. - p. 293–313.

Новые мультимодальные конструкции для БНЗТ

Расколупова В.И.¹, Сильников В.Н.¹, Абрамова Т.В.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

БНЗТ – многообещающий метод лечения рака, успешность которого во многом зависит от избирательного накопления борсодержащих агентов в опухолевых клетках. В настоящее время в клинической практике применяют препараты, которые не удовлетворяющие всем критериям, выдвигаемым для агентов БНЗТ, поэтому разработка новых борсодержащих агентов является одной из важнейших задач для развития этого метода.

Ранее в лаборатории органической химии ИХБФМ СО РАН был предложен специфический агент для модификации определенного остатка лизина человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) [1]. Такая модификация не приводит к уменьшению времени циркуляции ЧСА в крови, при этом ЧСА сохраняет способность накапливаться в опухолевых тканях. Модифицированный таким образом ЧСА является перспективным белком для адресной доставки агентов в опухолевые клетки. Более того, ранее была доказана эффективность использования ЧСА для доставки цитостатиков в опухолевые ткани [2]. Планировалось использовать ценные свойства ЧСА в качестве агента доставки лекарств для целей БНЗТ.

Целью данной работы являлась разработка конъюгатов ЧСА, которые помимо борсодержащих молекул, содержали бы в своей структуре другие противоопухолевые агенты, что позволило бы объединить два метода лечения рака: химиотерапию и БНЗТ. Для достижения поставленной цели нами был осуществлен дизайн и синтез молекул, которые помимо борсодержащего фрагмента включают цитостатик и функциональную группу для присоединения к ЧСА. Предложенные структуры включают фрагмент клозо-додекабората, гемцитабин и малеимидную группу для присоединения к альбумину. Строение новых соединений подтверждено широким спектром физико-химических методов.

1. Chubarov, A., Shakirov, M., Koptuyg, I., et al. *Synthesis and characterization of fluorinated homocysteine derivatives as potential molecular probes for ¹⁹F magnetic resonance spectroscopy and imaging.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, – 2011. – V. 21. – P. 4050-4053.
2. Stehle, G., Sinn, H., Wunder, A., Schrenk, HH., et al. *The loading rate determines tumor targeting properties of methotrexate-albumine conjugates in rats.* // *Anti-Cancer Drugs*, – 1997. – V. 8. – P. 677-685.

Исследование было поддержано грантом РФФИ № 19-74-20123.

Получение и исследование свойств мРНК, кодирующей RBD SARS-CoV-2

Рудомётов А.П.¹, Шарабрин С.В.¹, Боргоякова М.Б.¹, Волосникова Е.А.¹,
Пышная И.А.², Карпенко Л.И.¹, Ильичев А.А.¹

¹ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Россия

² Институт Химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

мРНК-вакцины – одна из новых, но наиболее быстро развивающихся вакцинных платформ, на основе которой разработаны несколько вакцин против SARS-CoV-2. Именно мРНК-вакцины оказались одними из первых препаратов, которые получили разрешение для широкомасштабного использования. Это разработки фармацевтических компаний Moderna/NIH и Pfizer/BioNTech. Использование мРНК для создания профилактических вакцин имеет ряд привлекательных особенностей: простота конструирования, низкая стоимость производства, низкая реактогенность, внутриклеточный синтез целевого антигена, способность вызывать эффективный адаптивный иммунитет, включая индукцию антител и CD4 + и CD8 + Т-лимфоцитов. Кроме того, в отличие от ДНК-вакцин, они не способны к интеграции в геном клетки хозяина. Вакцины на основе мРНК представляют собой гибкую, масштабируемую платформу, благодаря которой можно легко проводить замену целевой мРНК, не изменяя технологию производства, что позволяет быстро реагировать на появление новых вирусов с пандемическим потенциалом.

Тем не менее, новая технология мРНК-вакцин все еще требует решения ряда важных вопросов, касающихся повышения стабильности мРНК, достаточного уровня экспрессии целевого гена, а также выбора эффективного, безопасного и технологичного средства доставки мРНК. Способ доставки является наиболее важной и не до конца решенной задачей в разработке мРНК вакцин. В существующих на данный момент мРНК-вакцинах для их доставки используются липосомы, которые имеют определенные недостатки, связанные с реактогенностью, особенностями хранения и транспортировки при низких температурах конечного продукта. В нашей работе для упаковки и доставки мРНК, кодирующей RBD SARS-CoV-2, мы использовали конъюгат полиглюкина со спермидином (PGS).

Таким образом, целью данной работы было исследование антигенных свойств мРНК, кодирующей RBD SARS-CoV-2, при введении ее в комплексе с PGS.

В результате были отработаны условия получения мРНК, кодирующей RBD SARS-CoV-2. Исследован конъюгат полиглюкин:спермидин в качестве средства доставки мРНК-RBD. Были определены размеры и поверхностный заряд комплексов мРНК-RBD-PGS. Было показано, что упаковка мРНК в оболочку PGS приводит к увеличению индукции специфических к RBD антител у мышей BALB/c по сравнению с «голой» мРНК.

Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Получение и характеристика псевдовирюсов SARS-COV-2

Рудометова Н.Б., Щербаков Д.Н., Карпенко Л.И.

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Россия

Технология псевдовирюсов является универсальным и ценным инструментом как для фундаментальных, так и для прикладных вирусологических исследований. Псевдотипированные вирусы обеспечивают тот же механизм проникновения в клетку, что и SARS-CoV-2, и широко используются для исследования механизма проникновения вируса, клеточного тропизма, а также для проведения анализа вирус-нейтрализации.

Цель работы – получить псевдотипированные вирусы SARS-CoV-2 и оценить их трансдуцирующую активность.

С помощью методов генетической инженерии получали генетическую конструкцию, несущую ген гликопротеина S SARS-CoV-2, а также репортерную плазмиду рLenti-Luc-GFP, кодирующую гены зеленого флуоресцентного белка (GFP) и люциферазы светлячка. С помощью трансфекции эукариотических клеток были наработаны псевдовирюсные частицы. Трансдуцирующая активность псевдовирюсных частиц, экспонирующихся на своей поверхности гликопротеин S SARS-CoV-2, была изучена с использованием культур клеток HEK293, HEK293-hACE2 и HEK293-hACE2-TMPRSS2 (t).

На основе лентивирусной платформы второго поколения получены псевдовирюсы, экспонирующие на своей поверхности S гликопротеин SARS-CoV-2. Установлено, что полученные псевдовирюсы более эффективно проникают в клетки HEK293-hACE2-TMPRSS2, чем в HEK293-hACE2. Показано, что псевдовирюсы чувствительны к нейтрализации рекомбинантными моноклональными антителами, которые взаимодействуют с рецептор-связывающим доменом (RBD) гликопротеина S SARS-CoV-2.

Заключение. Полученные псевдовирюсы могут быть использованы как для поиска противовирусных препаратов, которые были бы способны блокировать проникновение SARS-CoV-2 в клетку-мишень, так и для оценки эффективности разрабатываемых моноклональных терапевтических антител и вакцин против SARS-CoV-2.

Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Индивидуальность ответа на фармакологические препараты: подходы к масштабному поиску SNPs в сайтах связывания микроРНК с мРНК

Рыкова Е.Ю.^{1,2,3}, Ершов Н.И.¹, Меркулова Т.И.¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

³ Новосибирский государственный технический университет, Новосибирск, Россия

Введение. Разработка подходов к масштабной идентификации генетических детерминант индивидуальной чувствительности к лекарствам является одной из центральных задач фундаментальной медицины. Многие SNP, расположенные в 3'UTR сайтах связывания микроРНК (миРНК), ассоциированы с заболеваниями, однако их роль в ответе на терапию остается малоизученной. Целью настоящего исследования был поиск ассоциированных с индивидуальной реакцией на фармакологический препарат SNPs в сайтах связывания микроРНК в 3'UTR на основе использования доступных данных eQTL и ASE анализа.

Материалы и методы. Для анализа были взяты 5402 eQTLs, выявленных при обработке интерфероном гамма (ИФН- γ) моноцитов периферической крови человека (PBMC) [1], и 253 аллель-асимметричных событий, возникающих или усиливающих в 5 типах клеток человека (лимфобластоидной клеточной линии (LCL), PBMC, эндотелиальных клетках пупочной вены (HUVEC), гладкомышечных клетках (SMCs) и меланоцитах) в ответ на экзогенные соединения, включающие ряд фармакологических препаратов [2]. Были выбраны SNPs, локализованные в 3'UTR транскриптов, и выполнен поиск потенциальных сайтов связывания микроРНК с использованием базы данных PolyMiRTS.

Результаты. Из 5270 SNPs, проявивших себя как eQTLs, обеспечивающие реакцию PBMC на ИФН- γ , выявлены 307 событий, расположенных в предсказанных сайтах связывания микроРНК, аффинность которых хотя бы к одной микроРНК менялась в результате нуклеотидной замены. Среди 253 событий ASE, 58 совпадали с вариациями, затрагивающими сайты связывания микроРНК в 3'UTR различных мРНК, аллельная асимметрия по этим сайтам в ответ на препараты обнаружена для 14 событий. В большинстве случаев снижение экспрессии варианта соответствовало появлению сайта связывания микроРНК.

Заключение. Как eQTL анализ, так и поиск ASE являются эффективными инструментами выявления SNPs, расположенных в 3'UTR таргетных сайтах микроРНК и связанных с индивидуальным ответом на лекарства.

1. Fairfax, B. P., Humburg, P., Makino, S., Naranbhai, V., Wong, D., *др.*, всего 11 человек. *Innate immune activity conditions the effect of regulatory variants upon monocyte gene expression.* // *Science.* – 2014. – V. 343. – P. 1246949.
2. Moyerbrailean G.A., Richards A.L., Kurtz D., Kalita C.A., Davis G.O., *др.*, всего 14 человек. *High-throughput allele-specific expression across 250 environmental conditions.* // *Genome Res.* – 2016. – V.26. – P.1627-1638.

Исследование поддержано грантом РФФ № 22-25-00255.

Identification of new promising markers of transition from acute inflammation to pulmonary fibrosis on the model of ovalbumin-induced asthma

Savin I.A.¹, Markov A.V.¹, Zenkova M.A.¹, Sen'kova A.V.¹

¹ *Institute of chemical biology and fundamental medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia*

Asthma is a heterogeneous lung disease prone to chronization, which leads to airway remodeling and fibrogenesis. Airway remodeling is characterized by a wealth of cellular and extracellular changes in large and small airways. Despite the extensive research of asthma-driven lung pathology, molecular mechanisms leading from acute inflammation to airway remodeling and lung fibrosis are still mostly unknown.

In this study, key genes forming the asthma-specific regulome and involved in the lung fibrosis formation were revealed using a comprehensive bioinformatics analysis. Then, the obtained data were validated using murine model of ovalbumin-induced asthma and post-asthmatic fibrosis. Expression levels of potential markers of transition from acute inflammation to lung fibrosis were measured in lung tissue using qRT-PCR with TaqMan probes.

Performed bioinformatics analysis revealed a range of well-known pro-fibrotic markers (*Timp1*, *Spp1*, *Muc5ac/Muc5b*, and *Igf1*) and a set of novel genes (*C3*, *Col4a1*, *Col4a2*, *Fn1*, *Thbs1*, *Tyrobp*) influencing the development of fibrotic changes in lungs already at the stage of acute/subacute asthma-driven inflammation. Subsequent validation of genes related to non-allergic bleomycin-induced pulmonary fibrosis in asthmatic lungs allowed to identify new universal genes (*Col4a1* and *Col4a2*) associated with the development of pulmonary fibrosis regardless of its etiology.

Revealed similarities between expression profiles of nodal fibrotic genes in asthma-driven fibrosis in mice and nascent idiopathic fibrosis in humans suggest close association of identified genes with the early stages of airway remodeling and can be considered as a promising predictors and early markers of pulmonary fibrosis.

This research was supported by the Russian Science Foundation (grant № 19-74-30011).

Активация сигнальных каскадов в клетках аденокарциномы легких A549 под действием внеклеточных везикул крови человека

Савиновская Ю.И.¹, Нуштаева А.А.¹, Савельева А.В.¹, Морозов В.В.¹,
Рябчикова Е.И.¹, Кулигина Е.В.¹, Рихтер В.А.¹, Семенов Д.В.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

В крови млекопитающих кроме форменных элементов циркулирует множество внеклеточных везикул: экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца. Известно, что внеклеточные везикулы, доставляя биологически активные молекулы, способны модулировать физиологические и патологические процессы в клетках-реципиентах. Исследование молекулярных механизмов процессов, активируемых или подавляемых в клетках-реципиентах при взаимодействии с внеклеточными везикулами, в настоящее время является важной и актуальной задачей.

Целью данной работы является анализ влияния внеклеточных везикул на изменение экспрессии генов в клетках аденокарциномы легких человека линии A549.

Для выделения и очистки внеклеточных везикул из плазмы крови здоровых доноров мы использовали метод последовательного центрифугирования и ультрацентрифугирования.

С использованием полнотранскриптомного секвенирования проведен анализ изменения экспрессии генов клеток аденокарциномы легких A549 под действием внеклеточных везикул крови.

Полученные данные позволяют заключить, что внеклеточные везикулы крови, взаимодействуя с клетками A549 на ранних этапах (6 ч), активируют NF-κappa-B сигнальный каскад, который в дальнейшем (12 и 24 ч) вызывает масштабные изменения экспрессии генов контроля апоптотических процессов и индуцируют вторичные метаболические и структурные изменения в клетках-реципиентах.

Гены вторичного ответа, экспрессия которых активируется через 24 ч инкубации клеток A549 с внеклеточными везикулами, контролируются не только NF-κappa B, но и такими факторами транскрипции, как HIF1A, SP1, TP53, STAT3, ATF4 и др. Продукты этих генов участвуют в гликолизе, сборке внеклеточного матрикса, клеточном цикле, регуляции клеточной адгезии, регуляции процессов программируемой клеточной гибели и др.

Таким образом, наши данные о том, что внеклеточные везикулы при взаимодействии с клетками A549 активируют в них NF-κappa-B сигнальный каскад, который в дальнейшем вызывают изменения экспрессии генов контроля ангиогенеза, инвазии, метастазирования и роста злокачественных опухолей.

Работа поддержана финансированием по государственному проекту 121030200173–6 ИХБФМ СО РАН

Линкеры на основе *O*-алкилгидроксиламинов для получения диагностических и терапевтических конъюгатов антител

Сапожникова К.А.¹, Гуляк Е.Л.¹, Брылёв В.А.¹, Мисюрин В.А.², Коршун В.А.¹

¹ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

² ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

Одной из важнейших областей применения линкеров является получение диагностических и терапевтических конъюгатов антител (ADC; antibody-drug conjugate). Последние приобретают все большую популярность: на 2021 год FDA одобрено 11 терапевтических конъюгатов. Их последнее поколение отличается повышенными требованиями к гомогенности. Однако используемые методы пришивки к антителу линкера с фармакофором не позволяют полностью контролировать стехиометрию. Кроме того, многие методы конъюгации могут затрагивать центр связывания антигена и нарушать аффинность, как в случае статистической модификации боковых аминогрупп лизина. Гомогенность и сохранение аффинности – самые трудные задачи при разработке конъюгатов антител.

Для строгой сайт-специфической модификации антител в настоящее время уже разработаны методы, однако, они сложны в части наработки исходного антитела. Гораздо более простым способом получения карбонильных групп в антителах является давно известное периодатное окисление углеводных остатков, локализованных в так называемом сайте гликозилирования, в области сочленения тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина. Сайт гликозилирования находится вдали от антиген-связывающего домена и его модификация не влияет на аффинность антитела.

В нашем исследовании стоит задача разработки методологии модификации генерируемых с помощью периодатного окисления карбонильных групп на антителах *O*-алкилгидроксиламинами *in situ* (оксимное лигирование), с последующей оценкой стехиометрии конъюгатов. Новшество метода заключается в том, что оксиаминовый фрагмент высвобождается непосредственно *in situ* при инкубировании с окисленным антителом в кислом буфере. Это позволяет получать ранее недоступные из-за нестабильности в присутствии нуклеофилов флуоресцентные красители для получения диагностических антител. Подобным образом нами получены флуоресцентные антитела к опухолевому белку PRAME [1,2].

Используя эту методологию, мы разработали бифункциональные линкеры на основе флуоресцентных красителей для контроля нагрузки молекул лекарства на антитело и разветвленные линкеры для увеличения этой нагрузки. Последние так же перспективны для получения конъюгатов антител с двумя различными молекулами лекарства.

1. Sapozhnikova K.A. et al. Detection of the PRAME protein on the surface of melanoma cells using a fluorescently labeled monoclonal antibody. *Rus. J. Bioorg. Chem.*, **2021**, 47, 1077–1085.
2. Sapozhnikova K.A. et al. Sensitive immunofluorescent detection of the PRAME antigen using a practical antibody conjugation approach. *Int. J. Mol. Sci.*, **2021**, 22, 12845.

Исследование поддержано грантом РФФ № 20-15-00361, РФФИ № 20-34-90125

Key genes involved in the development of acute lung injury and their association with COVID-19 and lung cancers

Sen'kova A.V.¹, Savin I.A.¹, Zenkova M.A.¹, Markov A.V.¹

¹ *Institute of chemical biology and fundamental medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia*

Acute lung injury (ALI) is a specific form of lung pathology caused by different infectious and non-infectious agents, including SARS-CoV-2. To identify molecular mechanisms and core elements of the regulatory network associated with ALI, key genes involved in the development of the acute lung inflammatory response (*Il6*, *Ccl2*, *Cat*, *Serpine1*, *Eln*, *Timp1*, *Ptx3*, and *Socs3*) were revealed using comprehensive bioinformatics analysis. The bioinformatics data were validated using a murine model of LPS-induced ALI; changes in the gene expression patterns were assessed during ALI progression and prevention by anti-inflammatory therapy with corticosteroid dexamethasone and semisynthetic triterpenoid soloxolone methyl (SM), two agents with different mechanisms of action. Analysis showed that 7 of 8 revealed ALI-related genes were susceptible to LPS induction (up-regulation: *Il6*, *Ccl2*, *Cat*, *Serpine1*, *Eln*, *Timp1*, *Socs3*; down-regulation: *Cat*) and their expression was reversed by the pre-treatment of mice with both anti-inflammatory agents.

Further, ALI-associated nodal genes were analyzed with respect to SARS-CoV-2 infection and lung cancers. Their overlapping with DEGs identified in postmortem lung tissues from COVID-19 patients revealed genes (*Saa1*, *Rsad2*, *Ifi44*, *Rtp4*, *Mmp8*) that (a) showed a high degree centrality in the COVID-19-related regulatory network, (b) were up-regulated in murine lungs after LPS administration, and (c) were susceptible to anti-inflammatory therapy. Analysis of ALI-associated key genes using The Cancer Genome Atlas showed their correlation with poor survival in patients with lung cancers (*Ptx3*, *Timp1*, *Serpine1*, *Plaur*). Taken together, a number of key genes playing a core function in the regulation of lung inflammation were found and can serve both as promising therapeutic targets and molecular markers to control lung pathologies, including COVID-19-associated ALI.

This research was supported by the Russian Science Foundation (grant № 19-74-30011).

**Влияние направленного изменения активности
рибонуклеотидредуктазы на устойчивость к генотоксическому стрессу
штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*
с нарушенным протеолизом**

Спаская Д.С., Гринева Е.Н., Кулагин К.А., Карпов Д.С.

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Рибонуклеотидредуктаза является ключевым ферментом для поддержания внутриклеточных концентраций нуклеотидов, и таким образом, оказывает влияние на процессы репликации и репарации ДНК. Ранее полученные данные указывают на то, что нарушение активности протеасомы в клетках *Saccharomyces cerevisiae* приводит к активации ряда путей репарации и повышению устойчивости к различным ДНК-повреждающим агентам. Согласно данным проведенного нами протеомного анализа штаммов дрожжей под действием 4-нитрохиолин-оксида, ингибирование протеасомы в этих условиях приводит к увеличению концентрации субъединиц рибонуклеотидредуктазы. Отсюда вытекает гипотеза о том, что протеасома вносит вклад в регуляцию рибонуклеотидредуктазы, и что ингибирование протеасомы может приводить к увеличению активности этого фермента. В таком случае связь ингибирования протеасомы и повышенной устойчивости к генотоксическому стрессу может быть частично обусловлена активностью рибонуклеотидредуктазы. Чтобы проверить это предположение, мы получили штаммы с делециями генов, кодирующих белковые регуляторы рибонуклеотидредуктазы Sml1 и Ydj1, в штамме дикого типа и в комбинации с пониженной активностью протеасомы, и проверили их устойчивость к ДНК-повреждающим препаратам. Кроме того, мы исследовали устойчивость штамма с нарушенной активностью протеасомы к генотоксическому стрессу в присутствии ингибитора рибонуклеотидредуктазы.

Исследование было поддержано грантом РНФ №22-24-01065.

Исследование неструктурного белка 1 вируса клещевого энцефалита для использования в качестве антигена для ДНК-вакцин

Кузьменко Ю.В.¹, Латанова А.А.¹, Назаренко Е.А.¹, Чернохаева Л.Л.²,
Карганова Г.Г.², Карпов В.Л.¹, Стародубова Е.С.¹

¹ ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
Москва, Россия

² ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки
иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия

Неструктурный белок 1 (NS1) вируса клещевого энцефалита важен для репликации вируса в клетке, экспонируется на клеточной поверхности и активно секретируется из зараженных клеток уже на ранних этапах инфекции. При профилактической вакцинации повсеместно применяемыми препаратами на основе инактивированного вируса антитела к NS1 не детектируются, тогда как после заражения выявляется значительный титр антител к этому белку. Для ряда флавивирусов показано, что антитела к NS1 способны обеспечить защиту от летальной дозы вируса, но при инфекции с ними ассоциируют некоторые негативные последствия. При этом для NS1 также показан и клеточный компонент иммунного ответа. Поэтому NS1 привлекает внимание исследователей в качестве дополнительного антигена для включения в состав вакцины, но необходимо более детальное изучение его иммуногенных свойств и возможностей для их регуляции.

В нашей работе мы сравнивали ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие варианты NS1 разных субтипов вируса, а также его секретируемый и не секретируемый варианты. Были использованы как вирусные гены, так и кодон-оптимизированные. Полученные плазмиды были протестированы в культурах клеток, оценен ряд эффектов секретируемого белка на другие клетки, а также проведены ДНК-иммунизации мышей. При экспрессии исследованных вариантов обнаружена разница в уровне стресса эндоплазматического ретикулума, окислительного стресса, а также ряда транскрипционных факторов и цитокинов. Также секретируемый трансфицированными клетками белок способен вызывать в спленоцитах наивных мышей выработку про-воспалительных цитокинов, но не интерферона-гамма. Однократное внутримышечное введение плазмидных ДНК мышам стимулирует образование антител и слабый клеточный ответ, которые различаются между исследуемыми вариантами. При этом ДНК-иммунизация ДНК-конструкциями способна лишь частично защитить от развития заболевания. Кроме того, было обнаружено, что введение ДНК-конструкции, кодирующей несекретируемый вариант NS1, как до, так и после заражения, сокращает инкубационный период заболевания.

Полученные данные говорят о перспективности NS1 как ДНК-вакцинного антигена, но при этом необходима тонкая настройка его свойств для получения безопасной вакцины и формирования эффективного иммунного ответа.

Исследование было поддержано грантом РФФИ № 20-04-00766.

Generation of macrophages of various phenotypes and their characterization

Talyshev V.A.¹, Logashenko E.B.¹

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia*

Inflammation underlies many dangerous illnesses. While the main reason for acute inflammation is to defend the host organism from invasion of diverse nature agents, in some cases it may alter into chronic form, resulted in different pathologies, as like: tumor genesis, type 2 diabetes, Alzheimer's disease, arthritis, lung and cardiovascular diseases, etc. Macrophages are immune cells, that play important role in inflammatory process because of their ability to engulf foreign agents, to present antigens, to produce inflammatory/anti-inflammatory cytokines and chemokines and to attract immune cells. Understanding of macrophages metabolic processes in connection with their phenotypes is crucial to deal with some pathological forms of inflammation. To do this kind of studies the adequate *in vitro* model is needed. There are a lot of methods of macrophage acquisition from progenitor cells from different sources, but all of them require optimization. Obtaining of adequate macrophage model will provide us with a base to understand inflammation more properly and to investigate the potential anti-inflammatory drugs.

In this work the human monocyte-like cells (THP-1) and monocytes from donor blood (PBMC) were differentiated into the macrophages, which, together with the mouse macrophage-like cells (RAW 264.7) were polarized into various phenotypes: pro-inflammatory M1, anti-inflammatory M2 and tumor associated (TAM) macrophages. These phenotypes were characterized by flow cytometry, ELISA and behavioral tests, and common features and specific properties were revealed.

The study was supported by a grant RSF № 19-94-30011

Modeling of acute LPS-induced inflammation *in vitro* on various cell cultures

Tatarnikova I.S., Staroselets Ya.Yu., Markov A.V., Chernikov I.V.,
Chernolovskaya E.L., Logashenko E.B.

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

Inflammation is often associated with the development and progression of the cancer [1]. Given the growing incidence of cancer all over the world despite the available modern methods of treatment the search for new therapeutic agents is still relevant. In this regards, the important task is the search for new molecular targets involved in the development and maintenance of inflammation.

Based on previous research and bioinformatics analysis, a number of genes associated with inflammation were selected as potential targets, namely: *C3*, *ZFP281*, *IRF8*, *SERPINA3*, *TREM2*, *DAP12*, *ADAM8*, *TIMP1* [2].

First of all, to evaluate the effectiveness of new therapeutics a cellular model of inflammation has to be established. For this, five mouse cell lines were analyzed: RAW264.7 and J774 (macrophages), L929 (fibroblasts), Hepa1-6 (hepatoma), and B16 (melanoma). To induce an inflammatory response, the cells were incubated in the presence of LPS (1 µg/mL) for 3–24 h. The expression of selected genes was analyzed using RT-PCR. Expression levels of interleukin-6 (*IL-6*) and tumor necrosis factor (*TNF-α*) were evaluated as markers of the inflammatory response.

The strongest response was obtained in the J774 cell culture with an increase in *IL-6* expression by 1300-4700 times with a peak at 6 hours and in the RAW264.7 culture - an increase in *IL-6* expression from 3 to 600 times with a peak at 20 hours.

The most promising therapeutic target turned out to be the *TIMP1* gene, the mRNA level of which increases by 2-130 times in RAW264.7 cells. To confirm the role of *TIMP1* as one of the master regulators of inflammation, we suppressed the expression of *TIMP1* on LPS-treated RAW264.7 (LPS+ group) with anti-*TIMP1* siRNA followed by measuring the level of *TIMP1* mRNA, as well as *IL-6* as an inflammatory marker response. A 20-fold increase in *TIMP1* mRNA (LPS+) has been shown to be restored to normal levels (LPS-) by anti-*TIMP1* siRNA. The level of *IL-6* mRNA, increased by 90-130 times (LPS+), under the action of anti-*TIMP1* siRNA is reduced to a 20-fold level relative to the control group (LPS-).

1. Coussens, L., Werb, Z. // *Inflammation and cancer*. - *Nature* - 2002. - 420, P. - 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature01322>
2. Sen'kova A.V., Savin I. A., Brenner E. V., Zenkova M.A., Markov A. V. *Core genes involved in the regulation of acute lung injury and their association with COVID-19 and tumor progression: A bioinformatics and experimental study* // *PLoS One* – 2021 - 16. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0260450>

The work was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 19-74-30011.

Биокаталитический способ получения аффинного сорбента для выделения иммуноглобулинов класса G

Терешин М.Н.^{1,2}, Елецкая Б.З.¹, Макаров Д.А.¹, Павленко Д.М.¹, Степаненко В.Н.¹, Мягких И.В.¹, Мелихова Т.Д.¹

¹ *Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

² *МИРЭА Российский технологический университет, Москва, Россия*

В настоящее время интерес к производству моноклональных антител неуклонно растет. Эффективным способом очистки антител является аффинная хроматография на специфических сорбентах с конъюгированными белками бактериальной природы. Так, консервативный для большинства иммуноглобулинов класса G Fc-регион (от англ. fragment crystallizable region - кристаллизирующийся фрагмент) взаимодействует с бактериальными белками A и G. Исторически эти белки наиболее часто используют в качестве аффинных лигандов для очистки моноклональных антител.

К недостаткам использования аффинных сорбентов на основе бактериальных белков можно отнести их относительно высокую стоимость в производстве. Существует и другая проблема: в случае низкой связывающей способности лиганда эффективность выделения иммуноглобулинов снижается. Также распространённым недостатком сорбентов подобного типа является «утечка» аффинного лиганда с матрицы сорбента. Все эти ограничения учитываются при разработке новых аффинных сорбентов с бактериальными белками A или G в качестве лигандов.

Основываясь на литературных данных, мы осуществили дизайн генетической конструкции, кодирующей белок BsrtA - мутантный аналог домена B белка A. Внесенные нами мутации направлены на повышение устойчивости лиганда к санации слабощелочными растворами, увеличение связывающей способности по отношению к иммуноглобулинам класса G, а также на повышение значений pH элюирующих растворов.

Ключевой особенностью конструкции BsrtA является наличие на C-конце сайта распознавания транспептидазы Сортазы A. В качестве донора аминокетильной группы Сортаза A распознает олигоглициновые последовательности, а в результате ферментативной реакции между «сшиваемыми» молекулами образуется пептидная связь. Это позволяет провести сайт-специфичную иммобилизацию лиганда BsrtA на поверхности полимерной матрицы, модифицированной тетраглицинами. При таком подходе исключается вероятность неспецифичного присоединения лиганда к матрице. Это является преимуществом технологии, поскольку в случае неспецифичного присоединения белка A или его фрагментов возможны стерические затруднения при взаимодействии между иммуноглобулинами и лигандом.

Полученный аффинный сорбент показал высокую эффективность. Так, максимальная ёмкость составляет около 50 мг IgG на 1 мл сорбента. При этом сорбент сохраняет ёмкость после 50 циклов использования и устойчив к санации 0,1 М NaOH. Процесс получения был масштабирован, и получены установочные серии объемом до 2 л.

Сравнение ДНК-гидролизующей активности антител при ВИЧ-инфекции и COVID-19

Тимофеева А.М., Седых С.Е., Невинский Г.А.

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

Активация В-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных пациентов приводит к выработке антител к вирусным компонентам и аутоантител к различным компонентам клеток человека, в том числе и ДНК. Антитела, против ДНК и гидролизующие ДНК, обнаружены в крови пациентов с некоторыми аутоиммунными заболеваниями. Ряд публикаций указывает на наличие аутоиммунных процессов в результате инфицирования SARS-CoV-2. Целью данной работы было сравнение каталитической активности антител ВИЧ-инфицированных пациентов и доноров после перенесенного COVID-19.

Сформировано 3 группы доноров: 1 группа – 26 ВИЧ-инфицированных доноров, из которых 22 донора находились на третьей стадии заболевания, все пациенты не принимали антиретровирусную терапию. Преобладающий суб-субтип вируса – А6, вирусная нагрузка от 20 до 120000 копий/мл. 2 группа – 25 доноров, перенесших COVID-19, в которую отобрали доноры высоким титром антител к вирусу SARS-CoV-2. Среднее время, прошедшее между появлением первых симптомов и забором крови – 12 ± 6 недель. 3 группа – 25 доноров, не болевших COVID-19, не имеющих антитела к белкам коронавируса.

Анализ содержания подклассов IgG у доноров исследуемых групп показал, что в группе 1 у 58% пациентов преобладают IgG1, у 42% доноров – IgG2. В группе 2 у 71% доноров преобладают IgG1, у 29% доноров – IgG2. В группе 3 у 86% пациентов преобладают IgG1, у 14% доноров – IgG2. У всех доноров содержание IgG3 превышало IgG4 и соответствовало литературным данным.

Проведен анализ плазм крови доноров групп 2 и 3 методом ИФА на наличие антител к двуцепочечной ДНК. Ни один из доноров не заявил о каких-либо симптомах аутоиммунных патологий, однако титры IgG к двуцепочечной ДНК у нескольких доноров (16%) оказались не отрицательными.

ДНКазная активность антител доноров группы 1 отличалась на шесть порядков: от 10^{-19} до 10^{-13} ЕД/мг (в пересчете на активность ДНКазы I) в зависимости от пациента. Активность в гидролизе ДНК для доноров групп 2 и 3 была на два порядка ниже, чем в группе 1: от 10^{-19} до 10^{-15} ЕД/мг.

Таким образом, ВИЧ-инфицированные пациенты содержат больше IgG подкласса 2. IgG подкласса 1 преобладают у доноров не болевших COVID-19. Не выявлены статистически значимые отличия по количеству доноров с повышенным титром антител к двуцепочечной ДНК в группе болевших COVID-19 и не болевших доноров. Активность в гидролизе ДНК антител ВИЧ-инфицированных доноров на два порядка выше, чем у доноров переболевших COVID-19 и не болевших доноров. Полученные результаты указывают на то, что в проявление таких симптомов аутоиммунных патологий, как анти-ДНК-антитела и ДНК-гидролизующие антитела, не является характерным для COVID-19.

Исследование было поддержано грантом РНФ 21-75-10105 (рук. Тимофеева А.М.).

Изучение ассоциаций полиморфных вариантов гена *CAT(rs1001179)* у жителей Кемеровской области больных раком молочной железы

Торгунакова А.В.^{1,2}, Минина В.И.^{1,2}, Титов Р.А.^{1,2}, Соболева О.А.^{1,2}, Глушков А.Н.¹, Яковлева А.А.²

¹ Институт экологии человека Федерального исследовательского центра угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук, Кемерово, Россия

² Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия

Рак молочной железы (РМЖ) наиболее распространенная онкопатология среди женщин во всем мире.

Как известно, антиоксидантная система – важный компонент противоопухолевой защиты. Активные формы кислорода могут вызывать повреждения ДНК, тем самым принимать участие в этиологии различных онкологических заболеваний. Одним из основных ферментов участвующих в клеточной детоксикации является каталаза.

В связи с этим целью нашего исследования является анализ полиморфизма гена антиоксидантной системы *CAT(rs1001179)* у больных РМЖ.

Было обследовано 480 женщин с диагнозом РМЖ (средний возраст 60 лет) и 276 условно здоровых женщин (средний возраст 58 лет). Все обследованные подписывали протокол информированного согласия. ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование проводили методом мультиплексной ПЦР с флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени. Статистическая обработка материала проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica 10.0». Силу ассоциаций анализируемых признаков определяли с помощью величины отношения шансов (OR), которую высчитывали по модифицированной формуле для малых выборок.

Установлено, что в изученных выборках распределения частот аллелей и генотипов изученных полиморфных маркеров не имели отклонений от равновесия Харди-Вайнберга.

Выявлена значимая положительная ассоциация РМЖ с генотипом С/С гена *CAT-262 C>T(rs1001179)* (OR=0,85; CI 95%: 0,77 - 0,98; $\chi^2 = 4,50$; $p=0,0339$), частота встречаемости у здоровых женщин выше, чем у пациенток с РМЖ 65,2% против 57% соответственно. Основываясь на полученном результате можно говорить о том, что генотип С/С гена *CAT-262 C>T* является протективным. В литературе есть данные о том, что носители генотипа С/С гена *CAT -262 C>T* имеют снижение риска РМЖ на 17% по сравнению с носителями аллеля Т [1].

Учитывая важную роль *CAT* в нейтрализации активных форм кислорода, полиморфизмы, приводящие к снижению активности ферментов, могут изменить способность организма противостоять перекисному окислению липидов и окислению ДНК, тем самым влияя на риск возникновения онкологии. Полученные результаты можно рассматривать как статистически значимые и свидетельствующие о перспективности продолжения поиска ассоциации в данном направлении.

1. Ahn J., Nowell S., McCann S.E. Associations between catalase phenotype and genotype: modification by epidemiologic factors // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2006. – V. 15. – P. 1217-1222.

Исследование выполнено по государственному заданию (Проект 0286-2022-0008).

Ex vivo анализ экспрессии контрольных точек иммунного ответа PD-1, PD-L1 и других иммунотаргетных маркеров в клетках карцином легких и других органов пациентов

Уфимцева Е.Г.¹, Гилева М.С.², Гуляева Л.Ф.^{2,3}

¹ НИИ биохимии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия

² ИМПЗ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ НИИМББ ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия

Повышение эффективности терапии злокачественных солидных опухолей человека и снижение вероятности их рецидива требует подбора оптимальных индивидуальных для каждого пациента схем лечения с использованием комбинированных подходов, направленных как на уничтожение опухолевых клеток, так и на противоопухолевое программирование клеток микроокружения. Блокирование контрольных точек иммунного ответа рецептора PD-1 и его лиганда PD-L1 позволяет, не воздействуя напрямую на опухолевые клетки, отключать ингибирующий сигнал в иммунологическом надзоре карцином и реактивировать иммунный ответ с элиминацией/остановкой пролиферации злокачественных клеток [1].

По разработанной ранее методике *ex vivo* [2] нами были изолированы злокачественные и иммунокомпетентные клетки из образцов опухолей, полученных после оперативного вмешательства от пациентов с диагнозом плоскоклеточный рак и аденокарцинома легкого, рак яичников, почки, прямой кишки. С использованием методов гистохимического, иммунохимического и иммунофлуоресцентного окрашивания охарактеризован состав и относительное количество опухолинфильтрующих макрофагов, лимфоцитов и нейтрофилов в мазках и первичных культурах клеток карцином, оценена экспрессия PD-1 и PD-L1, рецептора макрофагов CD14, провоспалительных (IFN γ , TNF α , IL-1 β и IL-12) и противовоспалительных (IL-4 и IL-10) цитокинов, ферментов iNOS и COX-2 в клетках опухолей. Результаты показали высокую степень гетерогенности экспрессии исследованных маркеров, что указывает на важность персонализированного подхода в назначении иммунотаргетных препаратов для лечения пациентов. Кроме того, *ex vivo* метод анализа опухолевых клеток и их микроокружения у прооперированных пациентов может стать дополнением к стандартному гистологическому анализу карцином с возможностью характеристики клеток и их маркеров из общего объема ткани исследуемых образцов.

1. Артамонова Е.В. Иммунотерапия НМРЛ — правильное лечение правильному пациенту // *Вопр. онкологии*. - 2019. - Т. 65. - № 1. - С 27–41.
2. Уфимцева Е.Г., Еремеева Н.И., Кравченко М.А., Скорняков С.Н. Способ получения *ex vivo* культур альвеолярных макрофагов из операционного материала больных туберкулезом легких и способ оценки вирулентности *Mycobacterium tuberculosis* с использованием полученных *ex vivo* культур альвеолярных макрофагов // *Патент РФ на изобретение № 2593725 (от 14 июля 2016 г.)*. - 2016. - Бюл. № 22. - С 1–30.

Авторы выражают благодарность хирургам за предоставленный операционный материал и Антиповой Е.Н. за техническое содействие. Исследование было поддержано грантом РФФ № 22-15-00065.

Tumor-generated cfDNA alters the phenotype of recipient cells

Filatova A.A.¹, Alekseeva L.A.¹, Zenkova M.A.¹, Mironova N.L.¹

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

Nowadays a lot of data were accumulated, which proves that concentration and profile of cell-free DNA (cfDNA) in the blood of cancer patients and healthy donors significantly differs. The profile of tumor-associated cfDNA is enriched with retrotransposon, mutant and over-expressed oncogene and proto-oncogene fragments, hypermethylated sequences and others. Some researchers suggest that cfDNA may change phenotype of healthy cells, form tumor microenvironment and pre-metastatic niche, and even cause cell transformation. The point about the ability of tumor-derived cfDNA to enhance the invasive potential of cells is still a debatable issue.

To investigate the possibility cfDNA to affect the invasive potential of tumor cells, we treated murine melanoma B16 cells with cfDNA isolated from blood serum of healthy mice (h-cfDNA) and mice with metastatic B16 melanoma (B16-cfDNA). B16-cfDNA caused significant increase of *N-RAS* expression along with slight increase of expression of some other oncogenes (*FOS*, *JUN*, *C-MYC*). Moreover, an increase of expression of endogenous DNases (*DFFB*, *ENDOG*), together with significant decrease of secretory *DNASE1L3* expression were observed. Surprisingly, it was found that treatment of B16 cells with h-cfDNA 10-fold increases the expression level of all tested oncogenes. Unlike B16-cfDNA, treatment with h-cfDNA stimulates the expression of secretory *DNASE1L3*, and does not change the expression of endogenous DNases. We may conclude that B16 cells display resistance to cfDNA of the same origin (predominantly derived from migrated B16 cells and B16 metastatic foci in mice), and seem to be more susceptible to cfDNA derived from normal cells. Interestingly, that treatment of B16 cells with h-cfDNA but not with B16-cfDNA increased its migration activity.

To evaluate the influence of tumor-derived cfDNA on non-transformed cells we treated human fibroblasts HFF-3 with cfDNA isolated from conditioned medium of B16 cells (CdB16-cfDNA). CdB16-cfDNA significantly increased the expression level of DNases (*DFFB*, *DNASE1L1*, *DNASE1L3*, *ENDOG*) and some oncogenes (*JUN*, *K-RAS*, *N-RAS*). However, CdB16-cfDNA decreased expression level of oncogene *FOS*. Moreover, we detected 2-fold increase in expression level of LINE-element (*L1TD1*). However no effects of CdB16-cfDNA on the migration and viability of HFF-3 cells were found. The effect of CdB16-cfDNA on HFF-3 cells was expired when exogenous DNase I was added to the medium.

To summarize, tumor-associated cfDNA can change phenotype of normal cells to tumor-specific one, whereas cfDNA from normal cells can activate tumor cells and increase their malignant properties. To understand the mechanisms underlying these affects further study is required.

This work was supported by RSF grant 22-14-00289.

Новый эпитоп белка р35, участвующий в нейтрализации вируса осповакцины и его деиммунизации

Хлусевич Я.А.¹, Матвеев А.Л.¹, Емельянова Л.А.¹, Гончарова Е.П.¹, Голосова Н.Н.,
Переверзев И.В.¹, Тикунова Н.В.¹

¹ *Институт Химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

Вирус осповакцины (ВОВ) является многообещающим онколитическим агентом, поскольку он обладает многими характерными чертами онколитического вируса. Однако его эффективность ограничена сильным противовирусным иммунным ответом, индуцируемым этим вирусом. Если человек уже был вакцинирован ВОВ в детстве или получил эту вакцину для предотвращения заражения вирусом оспы обезьян, даже первое введение онколитического ВОВ, вероятно, будет бесполезным из-за ранее существовавшего иммунитета. Одним из возможных подходов к преодолению этого ограничения является разработка деиммунизированного рекомбинантного ВОВ, маскируя или устранения наиболее эффективные нейтрализующие вирусные эпитопы.

Среди нескольких десятков белков ВОВ, выявляемых сыворотками вакцинированных доноров, белок р35, кодируемый открытой рамкой трансляции Н3L, является одним из основных иммуногенных белков. Белок р35 индуцирует В- и Т-клеточные иммунные реакции, и экспонирует по меньшей мере два подтвержденных эпитопа Т-клеток. Несмотря на актуальность р35, его эпитопная структура все еще недостаточно изучена. Для определения нейтрализующих эпитопов была сконструирована, экспрессирована и использована для иммунизации мышей панель рекомбинантных вариантов р35. Исследование нейтрализующих свойств показало, что ВОВ нейтрализуется только сыворотками мышей, которые были иммунизированы вариантами, содержащими как N-, так и C-концевые области р35. Этот результат был подтвержден истощением анти-р35 мышечных сывороток рекомбинантными вариантами р35. Было идентифицировано по меньшей мере девять аминокислотных остатков, влияющих на иммуногенный профиль р35. Замены семи остатков приводили к разрушению эпитопов В-клеток, тогда как замены двух остатков приводили к распознаванию мутантного р35 только ненейтрализующими антителами. Идентифицированные аминокислотные остатки могут быть полезны для разработки низкоиммуногенного рекомбинантного ВОВ.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 20-74-00135.

Ингибиторы Tdp1 на основе производных усниновой кислоты, как прототипы лекарственных препаратов

Чепанова А.А.¹, Захаренко А.Л.¹, Захарова О.Д.¹, Филимонов А.С.², Лузина О.А.²,
Салахутдинов Н.Ф.², Лаврик О.И.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

² Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН,
Новосибирск, Россия

Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (Tdp1) – фермент репарации ДНК, способный удалять различные аддукты с 3'-конца ДНК, в том числе вызванные действием клинически используемых ингибиторов топоизомеразы 1 (Top1) топотеканом и иринотеканом, снижая их терапевтическую эффективность. Поэтому подавление активности TDP1 может усилить эффект топотекана [1].

Усниновая кислота (УК) вторичный метаболит лишайников, обладающий широким спектром биологической активности (противовирусная, противоопухолевая и т.д.). Однако, исследования показали высокую токсичность УК, в связи с чем исходное соединение было модифицировано [2]

Многие производные УК продемонстрировали высокую ингибирующую активность в отношении Tdp1 (значения полуингибирующей концентрации начинаются в наномолярном диапазоне) [3].

Поскольку ингибиторы Tdp1 предполагается использовать в терапевтических коктейлях, они должны обладать низкой собственной токсичностью, чтобы не усугублять уже имеющиеся побочные эффекты терапии. Поэтому цитотоксичность полученных соединений была изучена в отношении различных перевиваемых опухолевых клеток. Основываясь на полученных данных, были выбраны нетоксичные концентрации производных УК для изучения их способности сенсibilизировать опухолевые клетки к действию топотекана. Среди нескольких классов производных УК обнаружены соединения, усиливающие цитотоксический эффект топотекана [3].

Для исследования сенсibilизирующего эффекта наиболее эффективных производных УК *in vivo* были использованы опухоли мышей карцинома Кребс-2 и карцинома легкого Льюис (LLC). Противоопухолевое действие оценивали либо по весу опухоли и числу клеток в асцитической жидкости (Кребс-2), либо по влиянию ингибиторов на число метастазов (Льюис).

Исследования *in vivo* показали, что производные УК увеличивают цитотоксический эффект топотекана и усиливают воздействие препарата как на скорость роста опухоли, так и на число метастазов, что указывает на перспективность производных УК для дальнейшей разработки комбинированных противоопухолевых препаратов.

1. Interthal H., Pouliot J., Champoux J. The tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1 is a member of the phospholipase D superfamily. // *Proc.Natl.Acad. Sci.*-2001.-V.98.-P 12009–12014.
2. Luzina O., Salakhutdinov N., Biological activity of usnic acid and its derivatives: Activity against unicellular organisms.Part 1// *Russ.J.Bioorg.Chem.*-2016.-V.42.-P 115–132.
3. Zakharenko A. et al., Novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors enhance the therapeutic impact of topotecan on *in vivo* tumor models. // *Eur.J.Med.Chem.*-2019.-V.161.-P 581-593.

Исследование было поддержано грантом РФФ 21-14-00105

Использование экзосом молока для доставки противоопухолевых препаратов в культуры клеток

Черенко В.А.^{1,2}, Парамоник А.П.^{1,2}, Седых С.Е.^{1,2}, Невинский Г.А.^{1,2}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Экзосомы – природные нановезикулы диаметром 40–100 нм, которые секретируются клетками человека и обнаружены в крови, лимфе, моче, молоке и других биологических жидкостях. Экзосомы имеют эндосомальное происхождение, покрыты мембраной и переносить различные биологически активные молекулы, например, микроРНК. Экзосомы считают перспективными средствами доставки в культуры клеток и организмы лабораторных животных, так как они могут легко проникать через клеточную мембрану и доставлять содержимое в цитоплазму клетки-реципиента.

Целью данного исследования является разработка методики доставки различных биологически активных веществ в культуры клеток. В качестве исследуемых веществ были выбраны известные цитостатические препараты: доксорубин, тамоксифен, доцетаксел и паклитаксел. Для доставки использовали опухолевую клеточную линию MCF-7 (аденокарциномы молочной железы человека). После определения IC₅₀ для каждого вещества для линии клеток MCF-7, данную концентрацию к клеткам добавляли в сочетании с препаратом экзосом в различных разведениях (1000; 500; 100; 50 раз).

Полученные результаты свидетельствуют о увеличении цитотоксичности препаратов, добавляемых к культуре клеток в сочетании с экзосомами. Экзосомы снижают жизнеспособность клеточной культуры от 20% до 50% по сравнению с добавлением индивидуального цитостатического препарата. В дальнейшем планируется исследование на культурах клеток U-87 (глиобластома мозга человека), A549 (карцинома легкого человека), SK-N-SH (нейробластома мозга человека). Проведен анализ изменения экспрессии генов BAX, p53, и bcl-2 после добавления препаратов цитостатиков с экзосомами и без экзосом, показано различное изменение характера экспрессии.

Известно, что экзосомы содержат короткие РНК, которые могут оказывать влияние на культуру клеток. Изучено содержание микроРНК 146b-5p, 148a-3p, 200c-3p, 378a-3p в препаратах экзосом молока до и после гель-фильтрации. Показано, что гель-фильтрация снижает содержание микроРНК в препарате экзосом в 4–17 раз.

Таким образом, экзосомы молока являются перспективными средствами для доставки противоопухолевых препаратов в культуры клеток.

Исследование поддержано проектом РНФ № 18-74-10055 (рук. Седых С. Е.).

Impact of chemical modifications and structure of small interfering RNAs on their accumulation and biological activity

Chernikov I.V., Karelina U.A., Gladkikh D.V., Meschaninova M.I., Zenkova M.A., Vlassov V.V. and Chernolovskaya E.L.

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

The development of therapeutic drugs based on small interfering RNA (siRNA) is a promising approach in the field of gene therapy. In this work, we investigated the effect of patterns of chemical modifications and siRNA structure on their properties *in vitro* and *in vivo*. Overexpression of *MDR1* gene causes multiple drug resistance syndrome (MDR) complicating cancer treatment, since that it is considered an important therapeutic target and therefore was used in this work as a target for siRNAs.

The effect of the pattern of chemical modifications of cholesterol-modified siRNA on accumulation in cells and the efficiency target gene silencing was studied *in vitro*. It was shown that the cholesterol conjugate of fully modified siRNA (Ch-siD_FM) containing 2'F and 2'O-Me modifications accumulates in KB-8-5-MDR1-GFP cells 1.4 times better than cholesterol conjugate of selectively modified siRNA (Ch-siDm) containing 2'O-Me modifications in nuclease-sensitive sites. Silencing activity of Ch-siDm_FM in a carrier-free mode exceeded 2 times the activity of Ch-siDm.

The accumulation efficiency of Ch-siD_FM and Ch-siDm *in vivo* was studied in KB-8-5 xenograft tumor-bearing SCID mice (1.7 ug/g, i.v. administration). It was demonstrated that Ch-siD_FM accumulates in the tumor by an order of magnitude more efficiently than Ch-siDm. Despite this difference in accumulation, the efficiency of *MDR1* target gene silencing in tumor after 8.5 ug/g i.v. administration was only 10% higher (68% and 78% for Ch-siDm and Ch-siD_FM, respectively).

At the next stage, cholesterol conjugates of supramolecular siRNAs (Ch-SsiRNAs) with different molecular weights were designed based on total modification pattern and their properties were studied. It was shown that an increase in the molecular weight of the duplex reduces the efficiency of cellular accumulation and silencing activity *in vitro*. A different situation was observed *in vivo*: a duplex consisting of three molecules of the antisense strand and two one-and-a-half sense strands (Ch-S3siDm_FM) accumulated in liver two order of magnitude more efficiently than Ch-siD_FM, however, it accumulates 1.5 times less effectively in the tumor than Ch-siD_FM.

Thus, varying the structure and molecular weight of RNA interference inducers may allow the drug to be redirected to the target organ to provide a more effective therapeutic action.

The study was supported by a grant from the RSF № 19-14-00251

Иммунные механизмы бустирования гуморального иммунного ответа против *P. mirabilis* литическими бактериофагами

Чечушков А.В.¹, Al Allaf L.², Козлова Ю.Н.¹, Морозова В.В.¹, Тикунова Н.В.¹

¹ ИХБФМ СО РАН, Новосибирск

² Новосибирский Государственный Университет

В настоящее время фаготерапия является бурно развиваемым направлением терапии антибиотикоустойчивых бактериальных инфекций. В то же время, данные о безопасности иммуногенности бактериофагов разнятся. Потенциально, формирование противофагового иммунного ответа может снизить эффективность фаготерапии за счет вируснейтрализующих антител, так и повысить ее эффективность благодаря способности бактериофагов стимулировать неспецифические механизмы иммунного ответа. В том числе, предполагается, что использование бактериофагов может стимулировать долговременный адаптивный иммунитет к бактерии-мишени [1].

Мы исследовали влияние литического бактериофага PM16 на состояние иммунного ответа к *P. mirabilis*, после инфицирования в нелетальном режиме и моделирования фаготерапии на мышах. У животных обнаруживаются предсуществующие антитела к бактериофагу, а именно к капсидному белку, но после введения бактериофага или инфицирование с модельной фаготерапией, происходит как переключение класса антител, так и появление антител, специфичных к белку хвостовых нитей бактериофага. (Похожий результат наблюдался и для бактериофагов другой таксономической принадлежности и специфичности).

Мы предположили модель взаимодействия бактериофага и клеток иммунной системы, в которой предсуществующие низкоаффинные антитела, генерируемые врожденной популяцией В лимфоцитов (B1) способствуют формированию высокоаффинных В-лимфоцитов, за счет трансфера антигенных комплексов в герминативные центры. Эксперимент *ex vivo* показал, что при стимулировании клеток неиммунизированных бактериофагом животных, бактериофаг и рекомбинантный капсидный белок способны активировать только клетки типа B1. В то же время, у иммунизированных животных наблюдается ответ преимущественно B2-лимфоцитов, что подтверждает предложенную гипотезу переключения специфичности.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что бактериофаг не только потенцирует формирование антител к *P. mirabilis*, но также при самостоятельном введении вызывает формирование иммунного ответа против бактерии. Результаты также позволяют сформировать ранее не описанную модель взаимодействия бактериофагов и клеток иммунной системы, и ставят вопрос о том, почему репертуар врожденных B1-лимфоцитов содержит паттерны распознавания бактериофагов. Данная парадигма может быть использована в разработке вакцин для профилактики бактериальных инфекций, в частности, использование литических бактериофагов для иммунизации против полисахаридных и комплексных антигенов.

1. Van Belleghem, Jonas D., Krystyna Dąbrowska, Mario Vaneechoutte, Jeremy J. Barr, and Paul L. Bollyky. 2019. "Interactions between Bacteriophage, Bacteria, and the Mammalian Immune System." *Viruses* 11(1).

Enhanced efficiency of oncogenic miRNAs cleavage by bulge-forming bi-peptide miRNases

Chiglintseva D.A.¹, Patutina O.A.¹, Amirloo B.², Gaponova S.K.¹, Clarke D.J.²,
Vlassov V.V.¹, Bichenkova E.V.², Zenkova M.A.¹

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

² University of Manchester, Manchester, UK

Selective inactivation of redundant disease-associated miRNAs offers a new avenue for cancer therapy. While most of the current anti-miRNA oligonucleotides promote miRNA inhibition by stoichiometric binding, miRNA-targeted artificial ribonucleases (miRNases) provide a unique opportunity for irreversible catalytic destruction of pathogenic miRNAs.

Herein a series of miRNases of new design – bulge-forming peptide-oligonucleotide conjugates (BCs), targeted to oncogenic miR-21 and miR-17, was developed. The principle behind the BC design is the cleavage of miRNA at three-nucleotide bulge-loop formed in its central part upon binding with the miRNase. Four principal BC configurations were engineered and investigated, which differed in the number of catalytic peptides (one or two) attached to oligonucleotide in different conformations (α , β , $\alpha\alpha$ and $\beta\beta$). A comparative study of mono- and bi-peptide miRNases showed that bi-peptide- $\beta\beta$ BC is the leading compound that quantitatively cleaves miRNA at linkages within the bulge-loop. The sequence of miRNA bulge-loop and adjacent motifs was shown to be of fundamental importance for efficient miRNA cleavage by BCs: motifs containing repeating pyrimidine-A bonds are more susceptible for cleavage. The significant outcome of the study is the discovery that in the presence of RNase H, conditions mimicking the intracellular environment, the rate of miRNA cleavage by BCs dramatically increases, indicating a synergistic effect of nucleases. Thus, the developed bulge-forming bi-peptide miRNases are promising anti-tumour agents intended for miRNA inhibition in cells.

This work was supported by the Russian Science Foundation (grant number 19-14-00250).

Дизайн и сравнительное исследование характеристик химерных антигенных рецепторов, созданных на основе CD19-специфического антитела LT19

Чикаев А.Н.¹, Горчаков А.А.,¹ Кулемзин С.В.¹, Беловежец Т.Н.¹, Латарцев К.В.², Филатов А.В.³, Таранин А.В.¹

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России

Технология адоптивного переноса перепрограммированных Т-клеток, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы (CAR-T), убедительно доказала свою эффективность в отношении острых/хронических В-клеточных лимфобластных лейкозов, а также В-клеточных неходжкинских лимфом. Наиболее часто и успешно используемая поверхностная мишень В-клеток, в отношении которой клинически опробованы CAR-T клетки, это рецептор CD19. В то же время, описаны случаи возникновения резистентности к терапии CD19-специфичными CAR T из-за мутаций в гене CD19, которые приводят к нарушению эпитопа, узнаваемого антителом FMC63 [1,2]. При этом существенная часть CAR-T препаратов, проходящих клинические испытания, а также 4 из 6 CAR-T, уже одобренных FDA для клинического использования, основаны на scFv именно от антитела FMC63. Возможным вариантом решения данной проблемы, помимо нацеливания химерных рецепторов на другие онкомаркеры, является использование в составе CAR scFv, связывающихся с альтернативными эпитопами CD19.

В рамках этой работы были созданы лентивирусные плазмиды, кодирующие CAR на основе CD19-специфического отечественного МКА LT19, ранее не использовавшегося для дизайна химерных рецепторов. С использованием псевдовиральных частиц на основе данных плазмид из Т-клеток здорового донора были получены LT19-CAR Т-клеточные продукты. Для сравнения эффективности LT19-CAR с «золотым стандартом» – CAR, используемом в препарате Кумриах, также были получены Кумриах CAR-T. Было проведено фенотипирование всех трех CAR-T и исследование субпопуляционного состава, а также выполнен *in vitro* анализ их цитотоксических свойств. Было показано, что все три конструкции обладают очень схожими характеристиками и обеспечивают выраженную цитотоксичность CAR-T в отношении CD19+ клеток-мишеней. Также методом подоменного картирования был частично локализован эпитоп, узнаваемый МКА LT19. По предварительным данным, ключевые аминокислотные остатки, формирующие эпитоп LT19, сосредоточены в участке, соответствующем 4 экзону гена CD19.

Таким образом, нами были получены функциональные CAR конструкции на основе российского МКА LT19, *in vitro* не уступающие по эффективности Кумриах CAR, хорошо зарекомендовавшим себя при лечении В-клеточных неоплазий.

1. Sotillo E., Barrett M., Black K.L., Bagashev A., Oldridge D., *др. всего 10 человек*. Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy // *Cancer Discov.* -2015. -V. 5. -P 1282–1295.
2. Fischer J., Paret C., El Malki K., Alt F., Wingerter, A., *др. всего 10 человек*. CD19 Isoforms Enabling Resistance to CART-19 Immunotherapy Are Expressed in B-ALL Patients at Initial Diagnosis. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*. - 2017. - V. 40. -N. 5. -P 187.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках Проекта 20-415-540024

Роль белка СНСНD1 в регуляции трансляции в митохондриях человека

Чичерин И.В., Балева М.В., Левицкий С.А., Каменский П.А.

*Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва, Россия*

Геномы митохондрий млекопитающих имеют в своем составе гены 13 белков, являющихся компонентами комплексов цепи окислительного фосфорилирования внутренней митохондриальной мембраны. Биосинтез этих белков должен быть скоординирован с трансляцией других субъединиц комплексов, закодированных в ядре и синтезируемых в цитозоле. В настоящее время молекулярные механизмы регуляции митохондриальной трансляции остаются малоизученными. Предполагается, что одним из таких механизмов может служить различие в эффективности взаимодействия малой субчастицы митохондриальной рибосомы с различными мРНК, обуславливаемое миторибосомными белками. В рамках данной работы мы исследовали функциональность белка малой субчастицы миторибосомы млекопитающих СНСНD1 как потенциального регулятора биосинтеза белка. С помощью технологии редактирования генома мы получили линию клеток человека HeLa, несущую функциональную делецию в гене белка СНСНD1, и показали, что эффективность митохондриальной трансляции в клетках этой линии снижена на ~30%. Анализ метаболической активности митохондрий этой линии показал, что у клеток с отсутствующим белком СНСНD1 снижено потребление кислорода, также нами продемонстрировано снижение количества суперкомплексов высокого порядка. Кроме этого, нами было показано накопление в клетках с делецией свободной F1 субъединицы АТФ-синтазы, что говорит о раскоординированности митохондриальной трансляции и сборки АТФ-синтазы. Также мы исследовали функциональную роль белка СНСНD1 в митохондриальной трансляции, проанализировав эффективность связывания различных мРНК с миторибосомами в митохондриях клеток с делецией соответствующего гена. Полученные нами данные расширяют знания о регуляции трансляции в митохондриях, а также могут стать частью фундаментальной основы для разработки подходов к терапии митохондриальных болезней.

Исследование поддержано грантом Российского Научного Фонда № 21-14-00008.

Протеом экзосом карциномы молочной железы как источник биомаркеров

Шефер А.А.^{1,2}, Штам Т.А.³, Яньшолле Л.В.⁴, Григорьева А.Е.¹, Центалович Ю.П.⁴,
Тамкович С.Н.^{1,2}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

³ *НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия*

⁴ *Институт «Международный Томографический Центр» СО РАН,
Новосибирск, Россия*

Экзосомы представляют собой внеклеточные везикулы диаметром 30-150 нм, которые отличаются от других микровезикул наличием трансмембранных белков – тетраспанинов CD9, CD63 и CD81. Секреция экзосом клетками определяет индивидуальный набор биомолекул в составе этих частиц, что принципиально как для межклеточной коммуникации (в клетку-реципиент попадает сразу множество молекул из клетки-донора), так и для скрининга трансформированных клеток (характерные молекулы сконцентрированы в одной частице). Для поиска экзосомальных опухоли-ассоциированных белков и выяснения их роли в патогенезе рака молочной железы были получены экзосомы клеточных линий HBL-100 (псевдо-нормальные эпителиоциты молочной железы), MCF-7 (люминальный А подтип карциномы молочной железы) и BT-549 (трижды негативный подтип карциномы молочной железы). Экзосомы клеточных линий были охарактеризованы По данным трансмиссионной электронной и крио-микроскопии, трекового анализа и проточной цитофлуорометрии все полученные препараты содержали экзосомы. Показано, что линии карциномы молочной железы MCF-7 и BT-549 секретируют в 7 и 4 раза больше экзосом, чем линия псевдо-нормальных эпителиоцитов, соответственно. Методом MALDI-TOF масс спектрометрии с высокой достоверностью идентифицирован 301 белок экзосом, из них согласно базе данных Vesiclepedia 32% впервые выявлены в составе экзосом. Сравнительный протеомный анализ идентифицированных белков экзосом выявил 26 белков, универсальных для всех клеточных линий и 8 белков, общих для линий карциномы молочной железы MCF-7 и BT-549. При помощи сравнительного протеомного анализа обнаружено, что более агрессивные опухоли секретируют экзосомы с уменьшенным содержанием внеклеточных белков и белков плазматической мембраны и, напротив, с повышенным содержанием белков с ДНК-связывающей функцией и вовлеченных в метаболизм белков. Обнаружено, что универсальными белками экзосом линий карциномы молочной железы MCF-7 и BT-549, ответственными за опухолевую диссеминацию являются два белка - LIM domain-containing protein 2 (вовлечен в стимуляцию клеточной подвижности) и 39S ribosomal protein L16, mitochondrial (вовлечен в стимуляцию клеточной пролиферации и обладающий онкогенным потенциалом).

Исследование было поддержано проектом базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН № 121030200173-6 “Диагностика и терапия онкологических заболеваний”.

Участие клеточного белка SFPQ во взаимодействии с обратной транскриптазой и интегразой ВИЧ-1

Шехтман С.П.¹, Кихай Т.Ф.¹, Приказчикова Т.А.¹, Агапкина Ю.Ю.^{1,2}, Готтих М.Б.^{1,2}

¹ Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, Москва, Россия

Высокоактивная антиретровирусная терапия (ВААРТ), применяемая в настоящее время для лечения ВИЧ-инфицированных пациентов, направлена на подавление активности основных вирусных ферментов. Однако, существует проблема возникновения резистентности вируса к применяемым препаратам. В связи с этим поиск и изучение новых мишеней для подавления вируса является актуальной задачей. Потенциально такими мишенями могут быть комплексы вирусных белков с клеточными белками-партнерами, участвующими в репликации вируса. Одним из клеточных белков-партнеров, является белок SFPQ (Splicing factor, proline- and glutamine-rich). Он относится к семейству белков DBHS (*Drosophila* behavior/human splicing) и входит в состав ядерных телец парасплеклей. SFPQ участвует в регуляции сплайсинга и транскрипции, ответе на повреждения ДНК и других клеточных процессах. *Существует ряд работ, в которых показано, что SFPQ участвует в регуляции ранних стадий репликации ВИЧ-1, однако пути такой регуляции остаются невыясненными.*

В нашей лаборатории было подтверждено, что SFPQ является положительным фактором обратной транскрипции и интеграции ВИЧ-1. Также известно, что SFPQ образует комплекс с интегразой ВИЧ-1, что может объяснить его участие в репликации вируса на стадии интеграции. Кроме того, известно, что обязательным условием успешной репликации вируса является формирование комплекса между обратной транскриптазой и интегразой. Таким образом, целью настоящей работы было исследовать взаимодействие SFPQ с обратной транскриптазой, а также оценить влияние SFPQ на формирование комплекса обратной транскриптазы и интегразы. С использованием рекомбинантных белков методом соосаждения с последующим анализом Вестерн-блотом мы обнаружили, что SFPQ участвует во взаимодействии интегразы с обратной транскриптазой. На основании этих данных можно предположить, что участие SFPQ в обратной транскрипции вируса может осуществляться посредством взаимодействия с интегразой.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-04-00437.

Создание универсального вектора доставки генно-инженерных конструкций путем модификации капсида аденоассоциированного вируса второго серотипа

Шитик Е.М.¹, Шалик И.К.¹, Юдкин Д.В.¹

¹ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Россия

Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (рААВ) является ведущей платформой для доставки генотерапевтических препаратов *in vivo*. Несмотря на выраженные преимущества данного вируса, рААВ обладает широким неспецифическим тропизмом к разным клеткам-мишеням, что значительно ограничивает его применение в клинической практике. В рамках данной работы была проведена модификация капсида рААВ 2-го серотипа и была создана предварительная универсальная модель для создания высокотропных специфических векторов доставки.

Все изученные серотипы рААВ имеют схожую структуру капсида, состоящую из белков VP1, VP2 и VP3, закодированных в гене *Cap*. Ген *Cap* транскрибируется с одного промотора, в результате чего последовательность VP3 во всех белковых субъединицах повторяется. Именно последовательность VP3 определяет связывание рААВ 2-го серотипа с рецептором интереса – гепарансульфатом. Более того, последовательность VP3 белка определяет подверженность вируса процессам убиквитинирования внутри цитоплазмы клеток-мишеней ввиду наличия гидроксильных групп определенных остатков тирозина. Субъединица VP2, представленная в небольшом количестве в структуре капсида, не оказывает значимого влияния на его сборку. При этом, она имеет свободный N-конец, выступающий за пределы капсида, в область которого потенциально можно внести достаточно длинные последовательности аминокислот.

В рамках данной работы с использованием ПЦР с перекрывающимися праймерами были получены три варианта модифицированных частиц рААВ 2-го серотипа, содержащих последовательность зеленого флуоресцентного белка EGFP. Трансдукция вирусных частиц выполнялась на линиях клеток HeLa. Оценка эффективности трансдукции проводилась методом флуоресцентной микроскопии. Первый вариант содержал замены Y444F, Y500F и Y730F в последовательности белка VP3. Для данного варианта было показано повышение эффективности трансдукции более чем в 10 раз по сравнению с вирусом дикого типа. Второй вариант модифицированного вируса был получен с использованием генетических конструкций с вынесенной последовательностью VP2 под отдельный промотор. В результате, нами было показано, что данная модификация не влияет на сборку вирусных частиц. В случае третьего варианта вируса последовательность VP2 также была вынесена под отдельный промотор и были выполнены замены R585A, R588A, R484A, R487A, K532A и R513A в области VP3. Практически полное отсутствие флуоресценции по сравнению со вторым модифицированным типом показало, что эти замены определяют тропизм рААВ 2 серотипа.

Дальнейшее внесение белков интереса в область N-конца белка VP2 позволит оценить эффективность и универсальность полученного вектора.

Исследования выполнены при поддержке гранта Минобрнауки России (договор № 075-15-2019-1665).

Исследование невирусных носителей как средств доставки нуклеиновых кислот в клетки миомы матки с целью генной терапии

Штыкалова С.В.^{1,2}, Егорова А.А.¹, Фрейнд С.А.^{1,2}, Маретина М.А.¹, Швед Н.Ю.¹, Баранов В.С.^{1,2}, Киселев А.В.¹

¹ Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Миома матки (ММ) является наиболее распространенной доброкачественной опухолью женской репродуктивной системы. Возможность точной ультразвуковой локализации делает данную опухоль идеальной мишенью для суицидной генной терапии (СГТ) *in situ*. Одним из серьезных барьеров для доставки генов является сложно организованный внеклеточный матрикс (ВКМ). Покрытие полианионами способствует улучшению коллоидной стабильности катионных полиплексов и прохождению через ВКМ. Также перспективным подходом к доставке генетических конструкций в глубокие слои опухоли является использование магнитных наночастиц (МНЧ). Нами разработаны невирусные носители на основе пептидов, модифицированные лигандом к интегринам $\alpha\beta3$, и анионное пептидное покрытие для доставки ДНК в первичные клетки ММ. Для повышения эффективности трансфекции полиплексы с пептидными носителями и ДНК были нековалентно связаны с МНЧ.

Были синтезированы аргинин-богатые гистидин-содержащие пептидные носители, модифицированные циклическим лигандом RGD. Исследованы физико-химические свойства полиплексов ДНК с пептидными носителями и анионным покрытием, а также полиплексов с МНЧ. Была изучена эффективность трансфекции полиплексов с анионным покрытием при различных зарядовых соотношениях и полиплексов с МНЧ при различных количественных соотношениях ДНК:МНЧ в экспериментах на клетках PANC-1, на поверхности которых представлены интегрин $\alpha\beta3$. Была проведена СГТ первичных клеток ММ на ранних пассажах. Проведены инъекции полиплексов с анионным покрытием, несущие плазмиду с геном *GFP*, в миоматозные узлы, полученные после миомэктомии (органотипическая модель ММ).

Было установлено, что разработанное анионное покрытие повышает стабильность полиплексов и способствует успешной трансфекции клеток в присутствии сыворотки крови. Связывание полиплексов с МНЧ позволяет значительно сократить время инкубации с клетками, необходимое для успешной трансфекции. Оценка метаболической активности с использованием реагента AlamarBlue и окрашивание трипановым синим показали снижение пролиферативной активности первичных клеток ММ после СГТ полиплексами с анионным покрытием и полиплексами с МНЧ. На срезах миоматозных узлов после введения полиплексов было зарегистрировано специфичное свечение, соответствующее накоплению белка GFP клетками, что свидетельствует об успешной трансфекции тканей ММ.

Разработанные пептидные носители, модифицированные лигандом к интегрину $\alpha\beta3$, являются перспективными средствами доставки ДНК в клетки миомы матки с целью генной терапии.

Исследование поддержано грантом РФФ 21-15-00111.

Влияние активации рецептора эритропоэтина на экспрессию регуляторных белков в норме и в постишемическом периоде у мышей

Щелчкова Н.А.^{1,2}, Пчелин П.В.^{1,2}, Глявина М.М.^{1,2}, Жученко М.А.³, Мухина И.В.^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет», Нижний Новгород, Россия

² ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород, Россия

³ ООО «Фармапарк», Москва, Россия

Показано, что клетки головного мозга (ГМ) экспрессируют рецептор к эритропоэтину. Исследование активности негемопоэтического карбамилированного дарбэпоэтина (CdEPO) в нормальной и ткани ГМ, поврежденной ишемией, остается актуальной задачей.

Цель - изучение влияния активации гетеродимерного рецептора к эритропоэтину агонистом CdEPO на экспрессию регуляторных белков ГМ в норме и после транзиторной окклюзии средней мозговой артерии (ТОСМА) у мышей. Исследование выполнялось на 4 группах самцов мышей линии C57BL/6: интактная, животные без ТОСМА, животные с ТОСМА и животные с ТОСМА и внутривенным введением CdEPO (50 мкг/кг) через 1 час после операции. Для оценки экспрессии регуляторных белков (BDNF, GDNF) в коре больших полушарий ГМ на 4 и 20 сутки после ТОСМА использовались наборы для иммуноферментного анализа (Cloud Clode, Китай). Статистическая обработка данных производилась с применением U-критерия Манна-Уитни.

Введение CdEPO животным без ТОСМА увеличивало уровень BDNF в 2 раза на 4 сутки и достоверно его снижало на 20 сутки относительно интактной группы. ТОСМА вызывала снижение содержания BDNF на 4 и 20 сутки (в 3 раза/на 29%, $P=0,004/0,04$) в сравнении с интактной группой. Внутривенное введение CdEPO приводит к повышению уровня BDNF относительно животных с ТОСМА на 4 сутки в 3 раза ($P=0,01$), и сопоставимо с интактными, однако на 20 сутки обнаружено значимое снижение показателя по сравнению с интактным уровнем и животными после ТОСМА ($P=0,001$).

Введение CdEPO животным без ТОСМА также обнаруживает его стимулирующее действие относительно GDNF на 4 (многократно) и 20 сутки эксперимента по сравнению с интактными. После моделирования ТОСМА выявлено повышение уровня GDNF лишь на 20 сутки (в 2,6 раз, $P=0,02$) относительно интактных показателей. Введение CdEPO после ТОСМА поддерживает содержание GDNF на уровне интактных животных, но значимо ниже относительно других экспериментальных групп на 20 сутки.

Таким образом, внутривенное введение CdEPO животным без патологии головного мозга приводит к стимуляции экспрессии регуляторных белков, определяющих рост и развитие, как нейронов, так и глиальной популяции клеток. Применение CdEPO у животных в острый период ишемического повреждения приводит к поддержанию белков-регуляторов на уровне интактных значений, но не проявляет стимулирующего влияния. Такой механизм действия карбамилированного дарбэпоэтина, на наш взгляд, позволяет сохранить жизнеспособность клеток при ишемии в условиях острого дефицита кислорода и питательных веществ.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

A

Al Allaf L. 242,
Alekseeva L.A. 149, 150, 237
Amirloo B. 128, 243
Artemyeva L.V. 212
Awad M.S. 144

B

Bichenkova E.V. 163, 243
Bishani A. 145
Burakova E.A. 124

C

Chernikov I.V. 164, 212, 232, 241
Chernolovskaya E.L. 145, 164, 212, 232, 241
Chernonosov A.A. 212
Chiglintseva D.A. 163, 243
Clarke D.J. 128, 243

E

ElDeeb A. 147
Entelis N. 213
Evtushenko E.G. 212

F

Filatova A.A. 237

G

Gaevsky V.N. 197
Gamburg T.A. 166
Gaponova S.K. 124, 163, 212, 243
Gladkikh D.V. 164, 241
Goncharova E.P. 166

H

Hamad A. 146, 148
Heckel A.-M. 213
Heyman T. 128, 163
Hussein Z. 147

I

Ilyina A.A. 201

J

Jen C.-P. 140

K

Karelina U.A. 241
Kiseleva E.V. 212
Kolesnikova I.A. 197
Kolos E.A. 217
Kolpashchikov D.M. 147
Kupryushkin M. 180

L

Lalkovičová M. 197

Levina A. 180

Lin K.-M. 140

Lipatova A.V. 146, 148

Logashenko E.B. 231, 232

Lyakhova K.N. 197

M

Mahmoud M. 146, 148

Markov A.V. 124, 201, 205, 207, 209, 225, 228,
232

Maslov M.A. 120, 124, 145, 164

Matveeva V.A. 212

Mazurkova N. 180

Meschaninova M. 123, 213, 241

Mironova N.L. 120, 149, 150, 207, 237

Mohamed I.S. 207

Moralev A.D. 205

Morozova K.N. 212

N

Nefedorova S.I. 148

O

Odarenko K.V. 201, 209

Okhina A.A. 183

Oshchepkova A.L. 212

P

Patutina O.A. 163, 212, 243

Pavlova A. 180, 213

Petrova E.S. 217

Pyshnaya I. 213

Pyshnyi D. 180

R

Repkova M. 180

Rogachev A.D. 183

S

Salakhutdinov N.F. 183, 205, 209

Salomatina O.V. 205, 209

Savin I.A. 124, 205, 207, 209, 225, 228

Sen'kova A.V. 120, 124, 150, 205, 207, 225, 228

Severyukhin Yu.S. 197

Shebanov N. 213

Shmendel E.V. 124, 145

Sounbuli Kh. 149

Staroselets Y.Y. 128

Staroselets Ya.Yu. 232

Stetsenko D.A. 124

T

Talyshev V.A. 231

Tarassov I. 213
Tatarnikova I.S. 232

U

Utina D.M. 197

V

Venyaminova A. 213
Vlassov V.V. 124, 212, 241, 243
Vorobyeva M. 123

Z

Zarytova V. 180
Zenkova M.A. 120, 124, 128, 144, 145, 150,
163, 164, 201, 205, 207, 212, 225, 228, 237,
241, 243

A

Абакумова Т. 127
Абдурахманова М.М. 61
Абзианидзе В.В. 94
Абрамова Т.В. 142, 221
Абрикосова В.А. 208
Аврамчук Т.В. 142
Агапкина Ю.Ю. 45, 247
Агеенко А.Б. 84
Адаменко Л.С. 91
Ажикина Т.Л. 66
Акахори Я. 58
Александрова Л.А. 119
Александровская Н.А. 60
Алексеев А.Ю. 28
Алексеев К.С. 39
Алексеева И.В. 36
Алексеев И.В. 195
Алексейчик С.Е. 56
Алиева Ф.У. 63
Алкалаева Е.З. 98
Алрхмун С. 58
Алсаллум А. 58
Алферова В.А. 74, 192, 204
Амерканов Д.А. 141
Анвар М.Ш. 135
Антоневич Н.Г. 56
Антошина Е.Е. 63
Аралов А.В. 66, 77, 116
Артемяева Л.В. 202
Асеев А.Л. 72
Астахова Е.А. 34
Ачасова К.М. 157

Б

Баженов М.А. 200
Баклаушев В.П. 28, 57, 64
Балева М.В. 103, 106, 152, 218, 245
Банная Е.И. 51
Баранов В.С. 249
Баранов К.О. 28, 33
Баранова М.Н. 208
Баранова С.В. 153, 210
Барановская Е.Е. 154, 160
Бардашева А.В. 179
Бауэр И.А. 155
Башмакова Е.Е. 30, 67, 215
Белавин П.А. 108
Беленькая С.В. 53
Белицкий Г.А. 54, 63
Беловежец Т.Н. 28, 33, 61, 244
Белогуров А.А. 31
Белокопытова П.С. 110
Берзина М.Я. 174
Бизяев Н.С. 98
Бирюков М.М. 140, 156
Бишани А. 132
Богданов А.А. 186
Богомазова А.Н. 77, 116
Болдырева Л.В. 157
Боргоякова М.Б. 222
Борунова А.А. 54, 162
Бохян Б.Ю. 63
Бочаров А.А. 64
Брезгин С.А. 99, 104, 105, 125
Брылёв В.А. 74, 170, 227
Бугай А.Н. 138
Будкина М.Л. 216
Булгакова А.Е. 158
Булыгин А.А. 47
Бурдаков В.С. 141, 159, 161
Буркин К.М. 79
Быченко О.С. 66
Бязрова М.Г. 34

В

Валуев-Эллистон В.Т. 28
Ван М. 142
Варижук А.М. 51, 66, 68, 77, 116, 118
Васильев Р.А. 100
Васильева Н.С. 84
Васильева С.В. 154, 160
Вацадзе С.З. 53

Ведехина Т.С. 51, 68
Веньямина А.Г. 132, 194
Верлов Н.А. 141, 159, 161
Верюгин Д.А. 74
Весна Э.С. 110
Виноградов Д.И. 111
Власов В.В. 111, 132
Власов П.К. 98
Власова О.А. 54, 162
Волкова О.Ю. 28, 33
Волницкий А.В. 141
Волок В.П. 129
Волосникова Е.А. 53, 222
Волчо К.П. 37
Вольнец М.О. 58
Воробьев И.И. 69
Воробьев П.Е. 78, 101
Воробьева М.А. 70, 101, 139
Вохтанцев И.П. 101, 182
Высоцкий Е.С. 198, 199

Г

Габибов А.Г. 29, 31, 47, 208
Гаврилов Л.А. 174
Гараева Л.А. 134, 141
Гарафутдинов Р.Р. 71
Гарина А.В. 141
Генералов В.М. 72
Гилева М.С. 236
Гладких Д.В. 132
Гладкова Е.Д. 49
Гладышев П.П. 80
Глушков А.Н. 235
Глущенко Д.А. 220
Глявина М.М. 250
Годовикова Т.С. 142
Голосова Н.Н. 238
Голота О.В. 32
Гольшев В.М. 165
Гончаров А.Е. 56
Гончарова Е.П. 238
Горбунова Е.А. 167
Горленко Е.С. 168, 182
Горчаков А.А. 28, 33, 64, 244
Горькова Т.Г. 63
Готгих М.Б. 38, 45, 247
Гражданцева А.А. 87
Грибова Е.Д. 80

Григорьева А.Е. 179, 246
Григорьева Е.В. 107, 169
Гринева Е.Н. 229
Гулина Л.С. 161
Гуляева Л.Ф. 236
Гуляева М.А. 28, 91
Гуляк Е.Л. 74, 170, 220, 227
Гуничева Н.М. 100
Гусельников С.В. 28, 33
Густин Д.Д. 68
Гущин В.А. 117

Д

Данилин Н.А. 171
Дашинимаев Э.Б. 64
Даянова Л.К. 69
Дейнеко Е.В. 108
Дзантиев Б.Б. 79
Дмитриев С.Е. 117
Дмитриенко Е.В. 155, 158, 169, 187, 219
Довыденко И.С. 78, 112, 175
Должикова И.В. 69
Доме А.С. 172
Дреничев М.С. 39, 42
Дрозд В.С. 135, 173
Дуров О.В. 57
Дымова М.А. 139, 142
Дырхеева Н.С. 37, 39, 40, 42, 49

Е

Евсеев П.В. 50
Евтеева М.А. 100
Егоров А.Д. 85
Егорова А.А. 249
Егорова Т.В. 98
Елецкая Б.З. 122, 174, 233
Емельянова Л.А. 32, 238
Емельянова С.С. 134
Епанчинцева А.В. 78, 167, 175
Ерёмин С.А. 220
Еремичев Р.Ю. 60
Ермаков М.С. 181
Ершов Н.И. 224
Ефременкова О.В. 119

Ж

Жаворонкова О.Н. 174
Жарков Д.О. 41, 101
Жарков Т.Д. 176, 203
Жданов Г.А. 73

- Жданова П.В. 102, 210
Жердев А.В. 79
Жиянов А.П. 29
Жуков С.А. 177
Журавлев Е.С. 111, 151, 178
Жученко М.А.
- З**
Забелина Д.С. 86
Заботина Т.Н. 54, 162
Завьялова Е.Г. 73
Загорская А.А. 108
Задворных Д.А. 47, 179
Зайнутдинов С.С. 87
Зайцева Э.Г. 76
Закиян С.М. 107
Закревский Д.Э. 140, 156
Захаренко А.Л. 37, 39, 40, 42, 49, 189, 239
Захаренкова С.А. 94
Захарова М.Н. 31
Захарова М.Ю. 29, 47
Захарова О.Д. 142, 239
Зацепин Т. 66, 127
Зацепин Т.С. 66
Звягин И. 31
Земская А.С. 43
Зенкова М.А. 132
Зенченко А.А. 39
Зиновьева В.Ю. 63
Зинченко Н.Д. 181
- И**
Иванская Е.В. 182
Иванисенко В.А. 48
Иванисенко Н.В. 48
Иванов А.В. 28, 79
Иванов Г.А. 39
Ивлева И.С. 206
Ильина И.В. 37
Ильичев А.А. 222
Илющенко В.В. 184, 214
Ишина И.А. 29
Ишмухаметов А.А. 129
- К**
Кабиллов М.Р. 31, 101
Калиберда Е.Н. 47
Калинкин А.А. 64
Кальсин В.А. 57, 64
Каменский П.А. 103, 106, 152, 218, 245
Камзеева П.Н. 66
Канарская М.А. 185
Карганова Г.Г. 230
Карпенко И.Л. 119
Карпенко Л.И. 222, 223
Карпенко М.Н. 206
Карпов В.Л. 230
Карпов Д.С. 229
Кезин В.А. 129
Кирилин Е.М. 63
Кирсанов К.И. 44, 54, 63, 162
Киселев А.В. 249
Кихай Т.Ф. 45, 247
Кладова О.А. 36
Клыпа Т.В. 28
Книжник Е.К. 51
Кнорре В.Д. 47
Князев Н.А. 186
Коваль В.В. 102, 153, 210
Коваль О.А. 61, 88, 140, 156
Ковнир С.В. 69
Ковригина Е.Н. 187
Кожевникова Е.Н. 157
Козлов М.В. 43
Козлов С.А. 188
Козлова Ю.Н. 242
Козловская Л.И. 129, 204
Колесникова В.А. 62
Колесникова Л.И. 211
Колесов Д.Э. 69
Колосов П.М. 98
Колпащиков Д.М. 135, 173
Комарова Е.Ю. 134
Комиссаров А.Б. 151, 178
Комякова А.М. 188
Кондратов И.Г. 211
Кондратьева С.А. 195
Конева А.Л. 141
Кононова Ю.В. 28
Константинова И.Д. 122, 174
Копылов А.М. 62
Кораблев А.Н. 110
Корниенко Т.Е. 39, 42, 189
Королев М.А. 70
Королева Л.С. 47, 179
Коротов И.А. 190
Коршун В.А. 74, 170, 192, 204, 227
Костарева О.С. 191

- Костюшев Д.С. 99, 104, 105, 125
Костюшева А.П. 99, 104, 105, 125
Кочетков С.Н. 46, 119, 122, 129
Кочнева Г.В. 87, 88
Кравченко Т.В. 192
Крайникова Л.В. 178
Красильников М.С. 204
Красицкая В.В. 193
Криворотов Д.В. 94
Кропачева Н.О. 194
Кропотова Е.С. 206
Кудров Г.А. 32
Кудрявцев А.Н. 30, 67
Кузнецов В.В. 108
Кузнецов Н.А. 36, 47
Кузнецова А.А. 36, 47
Кузнецова М.С. 58
Кузьменко Ю.В. 230
Кузьмич А.И. 195
Кузьмичев К.В. 216
Кукушкин В.И. 73
Кулагин К.А. 229
Кулебякина М.А. 60
Кулемзин С.В. 28, 33, 59, 61, 64, 244
Кулигина Е.В. 84, 88, 139, 172, 181, 226
Куликова А.В. 135
Купова О.Ю. 71
Купрюшкин М.С. 112, 176, 177, 203
Купрюшкин М.С. 112, 176, 177, 203
Курбатов Л.К. 196
Курбатская И.Н. 47
Курочкин И. 127
Куус Е.А. 159
- Л**
Лаврик И.Н. 48
Лаврик О.И. 37, 39, 40, 42, 49, 189, 239
Лагарькова М.А. 77, 116
Лалетина Л.А. 63
Ланда С.Б. 161
Ларионова М.Д. 198
Ларичев В.Ф. 28
Латанова А.А. 230
Латарцев К.В. 244
Лебедев Д.В. 141
Левцкий С.А. 103, 106, 152, 218, 245
Лейченко Е.В. 188
Ли-Жуланов Н.С. 37
- Лисица А.В. 196
Ломакин Я.А. 31, 208
Ломзов А.А. 102, 154, 160, 165, 185, 219
Лосев М.В. 96
Лузина О.А. 42, 49, 189, 239
Лукашев А.Н. 99, 104, 105, 125
Лукина М.М. 77, 116
Лукьянчикова В.А. 110
Лукьянова А.А. 50
- М**
Магомедова Х.М. 54, 162
Макаревич П.И. 60
Макаров А.А. 52
Макаров Д.А. 119, 233
Максимов Г.В. 104, 125
Максимова Н.С. 216
Малахова А.А. 107
Маликова Н.П. 199
Малова Е.А. 200
Маникайло А.Е. 63
Манувера В.А. 51
Маренкова Т.В. 108
Маретина М.А. 249
Мариевская К.А. 204
Марков О.В. 176, 177, 203
Маркова С.В. 75, 190, 198
Мархаев А.Г. 28
Маслов М.А. 121, 126
Маслова А.А. 129
Матвеев А.Л. 32, 171, 202, 238
Матвеева А.М. 111, 178
Матвеева В.А. 202
Матюгина Е.В. 51
Матюгина Е.С. 122, 129
Матюшкина Д.С. 114
Махмудова Л.Ф. 63
Медведев С.П. 107
Мелихова Т.Д. 174, 233
Мелихова Т.Д. 174, 233
Мельников П.М. 64
Меркулова Т.И. 224
Меркульева Ю.А. 72
Мечетина Л.В. 28, 33
Мещанинова М.И. 101, 132, 171, 194
Милахина Е.А. 140
Минина В.И. 235
Миронов А.Ф. 174

- Миронова Е.М. 203
Мирошников К.А. 50
Мисюрин В.А. 74, 170, 227
Митькевич В.А. 52
Михайлина А.О. 191
Михайлова А.С. 74
Михновец И.Э. 204
Моисеева Н.Н. 63
Мокрушина Ю.А. 208
Морозов В.В. 202, 226
Морозова О.В. 63
Мосевичкий М.И. 206
Мрасов А.М. 204
Мукба С.А. 98
Мустафа А.Я.Н. 135
Мухаметова Л.Э. 220
Мухина И.В. 250
Мягких И.В. 188, 233
- Н**
Назаренко Е.А. 230
Науменко О.Б. 96
Наумова О.В. 72, 76
Наякшин А.М. 28, 33
Невинский Г.А. 234, 240
Негря С.Д. 119
Недорезова Д.Д. 135, 173
Нерсисян С.А. 29
Нетёсов С.В. 86, 89
Никитин Т.Д. 204
Николин В.П. 42, 189
Нимирицкий П.П. 60
Новиков М.С. 129
Новиков Р.А. 52
Новопашина Д.С. 139, 168, 171, 182
Нуштаева А.А. 61, 181, 226
- О**
Овчинникова Л.А. 31, 208
Отарков О.Б. 211
Огиенко А.А. 157
Олейник Г.А. 210
Орешков С.Д. 74
Орлова Е.А. 211
Орлова Н.А. 69
Осипов И.Д. 86, 89
Ословский В.Е. 39, 42
- П**
Павленко Д.М. 233
Павлова А.С. 184, 214
Павлова Г.В. 62
Павлова С.В. 107
Пак Ф.А. 141
Панамарев Н.С. 67, 215
Панкратова Ю.Ю. 56
Панова Е.А. 117
Пантелеев Д.Ю. 98
Парамоник А.П. 240
Патра Х.К. 135
Патракова Е.А. 140, 156
Переверзев И.В. 238
Переверзев И.М. 112
Пермякова Н.В. 108
Першин В.И. 216
Петрунина Н.А. 77, 116
Печковская С.А. 186
Пиунова У.Е. 103, 218
Плешкан В.В. 195
Полетаева Ю.Е. 140, 175
Пономарева Н.И. 99, 104, 105, 125
Попова В.К. 219
Попова Н.А. 42, 189
Потапов К.В. 52
Починка И.Г. 216
Прасолов В.С. 109
Приказчикова Т.А. 45, 247
Прохоренко И.А. 220
Прохорова Д.В. 112
Пустогаров Н.А. 98
Путевич Е.Д. 134
Пучков П.А. 126
Пчелин П.В. 250
Пышная И.А. 78, 167, 175, 184, 200, 214, 222
Пышный Д.В. 78, 112, 154, 160, 165, 167, 184, 200, 214
Пьянков О.В. 32
- Р**
Радилов А.С. 94
Радько С.П. 196
Расколупова В.И. 142, 221
Рейниссон Й. 37
Рихтер В.А. 61, 84, 88, 139, 172, 226
Розов С.М. 108
Романенко М.В. 86
Рубекина А.А. 204
Рудомётов А.П. 222

Рудометова Н.Б. 223
Рыкова Е.Ю. 224
Рында Е.Г. 56
Рябова Е.С. 179
Рябцева Т.В. 56
Рябчикова Е.И. 78, 140, 175, 226

С

Савельева А.В. 226
Савиновская Ю.И. 181, 226
Сайдакова С.С. 157
Саковина Л.В. 168, 182
Салахутдинов Н.Ф. 37, 42, 49, 53, 189, 239
Сальников П.А. 110
Сапожникова К.А. 74, 170, 227
Сафенкова И.В. 79
Сахабутдинова А.Р. 71
Светлова Ю.И. 51, 66
Своглазова А.Е. 191
Северов В.В. 51
Седельникова А.Ю. 155
Седых С.Е. 32, 234, 240
Селедцова Н.В. 202
Семенов Д.В. 111, 172, 181, 226
Сенников С.В. 58
Сергеева М.В. 178
Сергеева О.В. 127
Середа К.Н. 131
Серова И.А. 110
Сиволобова Г.Ф. 87
Сидорчук Ю.В. 108
Сильников В.Н. 47, 142, 179, 221
Симанив Т. 31
Синегубова М.В. 69
Синичич А.А. 204
Скворцова Ю.В. 66
Слатинская О.В. 104, 125
Смирнов И.В. 47, 208
Соболева О.А. 235
Солодков П.П. 28, 33
Сольев П.Н. 52, 119
Сорокин И.И. 117
Спасская Д.С. 229
Спирин П.В. 109
Спицына А.С. 134
Стародубова Е.С. 230
Степаненко В.Н. 188, 233
Степанов Г.А. 111, 112, 151, 172, 178

Степанчук Я.К. 110
Сулов Е.В. 37

Т

Тамкович С.Н. 246
Таранин А.В. 28, 33, 244
Таскаев С.Ю. 139, 142
Терехов С.С. 208
Терешин М.Н. 188, 233
Терещенко В.П. 58
Тихунова Н.В. 32, 179, 238, 242
Тиллиб С.В. 33
Тимофеева А.М. 32, 234
Тимошенко О.С. 196
Титов Р.А. 235
Тихомиров С.А. 110
Тихонова Д.А. 73
Тищенко С.В. 191
Ткачук В.А. 60
Толстова П.О. 112
Томилин А.Н. 113
Тоневицкий А.Г. 29
Торгунакова А.В. 235
Трашков А.П. 91
Труханова Л.С. 63
Туманов А.В. 126
Туманов Ю.В. 80
Тушкин А.Е. 31
Тюрин А.П. 192

У

Уварова Е.А. 108
Усачев Д.Ю. 62
Устинов А.В. 204
Устьянцева Е.И. 107
Уфимцева Е.Г. 236

Ф

Фатеев И.В. 122
Федорова О.С. 36, 47
Фетисов Т.И. 44, 54, 63
Филатов А.В. 34, 244
Филатова Н.А. 186
Филимонов А.С. 42, 49, 189, 239
Филиппова Ю.Г. 58
Фисунов Г.Ю. 114
Фишман В.С. 110
Фомин А.С. 112
Фомина Л.Я. 63
Франк Л.А. 30, 67, 193, 215

Фрейнд С.А. 249

Фролов А.А. 216

Х

Хандажинская А.Л. 51, 122, 129

Ханова Л.И. 71

Хлусевич Я.А. 32, 238

Хмелева С.А. 196

Ходорович Ю.М. 77, 116

Хоменко Т.М. 37

Хомутов А.Р. 130

Хрулев А.А. 66

Хусейн З. 135

Ц

Цветков В.Б. 66

Центалович Ю.П. 246

Ч

Чекан В.Л. 56

Челкин А.А. 131

Челуснова Ю.В. 94

Черемискина А.А. 72

Черенко В.А. 240

Черников И.В. 132

Черникова Д.С. 33

Чернова И.А. 54, 162

Черноловская Е.Л. 132

Черноносов А.А. 102, 153, 210

Чернохаева Л.Л. 230

Чернышова И.А. 39, 40, 42

Чечушков А.В. 32, 242

Чиж К.А. 56

Чикаев А.Н. 28, 33, 244

Чикаев Н.А. 28, 33

Чиркова В.Ю. 53

Чистов А.А. 204

Чичерин И.В. 103, 106, 152, 218, 245

Чубаров А.С. 158

Чудинов А.В. 133

Чуланов В.П. 99

Ш

Шадрина О.А. 45

Шалик И.К. 248

Шаповалов А.В. 32

Шарабрин С.В. 222

Шарлаева О.А. 53

Швед Н.Ю. 249

Швейгер И.В. 140, 156

Шевченко Ю.А. 58

Шендер В.О. 36, 77, 116

Шестопалов А.М. 28, 91

Шефер А.А. 246

Шехтман С.П. 247

Шику Х. 58

Ширшин Е.А. 204

Шитик Е.М. 248

Шнайдер П.В. 36

Шошина Н.С. 188

Штам Т.А. 134, 141, 246

Штомпель П.А. 54

Шторк А.С. 77, 116

Штро А.А. 204

Штыкалова С.В. 249

Шувалов А.В. 98

Шувалова Е.Ю. 98

Шулепова Э.А. 56

Шустова Е.Ю. 129

Щ

Щелчкова Н.А. 216, 250

Щербаков А.М. 63

Щербаков Д.Н. 53, 72, 223

Щербакова А.С. 43

Щербинина Е. 127

Щукин Д.В. 112

Э

Эйер Л. 204

Эльдиб А.А. 135, 173

Эмануэль В.Л. 161

Ю

Юдкин Д.В. 248

Южакова Д.В. 64

Юрченко К.С. 91

Юсубалиева Г.М. 28, 64, 84

Я

Яковлева А.А. 235

Якубовская М.Г. 44, 54, 63, 162

Ян А.П. 110

Яньшолле Л.В. 246

Яровая О.И. 53

Ясько М.В. 119

СПИСОК УЧАСТНИКОВ

Awad Mona Sami	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск www.awad.mona.1998@gmail.com
Bishani Ali	Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск ali1bishani@gmail.com
Eldeeb Ahmed	Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург eldeeb@scamt-itmo.ru
Zain Hussein	Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург zain@scamt-itmo.ru
Абрамова Татьяна Вениаминовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск abramova@niboch.nsc.ru
Аврамчук Татьяна Витальевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск popovaty@niboch.nsc.ru
Алексеева Ирина Владимировна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск irina.Alekseeva@niboch.nsc.ru
Алексеева Людмила Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск mila_alex@ngs.ru
Алкалаева Елена Зиновьевна	Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва alkalaeva@eimb.ru
Антоневич Наталья Георгиевна	Государственное научное учреждение “Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси”, Минск antonevich.n@gmail.com
Антропов Денис Николаевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск des_ant_nik95@mail.ru
Аралов Андрей Владимирович	Фиалил Института биоорганической химии им. академиком М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва baruh238@mail.ru
Артемьева Людмила Владимировна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск mila_a@ngs.ru

Баклаушев Владимир Павлович	ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, Москва baklaushev.vp@fnkc-fmba.ru
Балева Мария	Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова Москва mary-bw@mail.ru
Баранова Светлана	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск swb@niboch.nsc.ru
Барановская Елизавета Евгеньевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск evgenevnalizaveta@gmail.com
Барсуков Артём Ильич	ООО «СЛТ Трейд» barsai@ngs.ru
Бауэр Ирина Алексеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск i.bauer@g.nsu.ru
Башмакова Евгения	Институт биофизики СО РАН, Красноярск jeyn_a@bk.ru
Бирюков Михаил Михайлович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск biryukov.mm@ya.ru
Болдырева Лидия Валерьевна	Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск boldyrevalv@neuronm.ru
Брезгин Сергей	Институт медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е. И. Марциновского, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва seegez@mail.ru
Бугай Александр Николаевич	Объединенный институт ядерных исследований, Дубна bugay@jinr.ru
Булгакова Анастасия Евгеньевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск bulgakovanastasi@gmail.com
Варижук Анна Михайловна	Федеральный научно-клинический центр физико-хи- мической медицины Федерального Медико-биологи- ческого Агентства, Москва annavarizhuk@gmail.com
Васильев Руслан Алексеевич	НИЦ «Курчатовский институт», Москва ruavasilev@gmail.com

Васильева Наталья Сергеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск nataly_vas@bk.ru
Васильева Светлана Викторовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск svetlana2001@gmail.com
Ведехина Татьяна Сергеевна	Федеральный научно-клинический центр физико-хи- мической медицины Федерального Медико-биологи- ческого Агентства, Москва taveda@gmail.com
Верлов Николай Александрович	НИЦ “Курчатовский институт” – ПИЯФ, Гатчина verlov_na@pnpi.nrcki.ru
Власова Ольга Александровна	НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва olya_vlasov@mail.ru
Волчо Константин Петрович	Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск volcho@nioch.nsc.ru
Воробьев Иван Иванович	ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва ptichman@gmail.com
Воробьев Павел Евгеньевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск vorobyev@niboch.nsc.ru
Воробьева Мария Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск maria.vorobjeva@gmail.com
Габибов Александр Габирович	Институт биоорганической химии им. академи- ков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва gabibov@gmail.com
Гапонова Светлана Константиновна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск sveta-mira@yandex.ru
Гарафутдинов Равиль Ринатович	Институт биохимии и генетики Уфимского федераль- ного исследовательского центра РАН, Уфа garafutdinov@mail.ru
Генералов Владимир	Федеральное государственное учреждение науки «Го- сударственный научный центр вирусологии и биотех- нологии «Вектор» Роспотребнадзора», Кольцово general@vector.nsc.ru
Гладких Даниил Викторович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск medulla35@gmail.com

Гольшев Виктор Михайлович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск golyshevsvictor@gmail.com
Гончарова Елена Павловна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск egn@niboch.nsc.ru
Горбунова Екатерина Андреевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск gorbunova-ekaterina@inbox.ru
Горленко Елена Сергеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск lena.gorlenko@mail.ru
Готтих Марина Борисовна	НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Бело- зерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва gottikh@belozersky.msu.ru
Григорьева Евгения Владимировна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск zeka_98@bk.ru
Гуляк Евгений Леонидович	Институт биоорганической химии им. академи- ков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Мо- сква evgeny.gulyak@gmail.com
Гусельников Сергей Владимирович	Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск sguselnikov@mcb.nsc.ru
Давыдова Анна Сергеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск anna.davydova@niboch.nsc.ru
Данилин Николай Александрович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск n.danilin@g.nsu.ru
Деев Роман	Северо-Западный государственный медицинский уни- верситет им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург romdey@gmail.com
Деев Сергей Михайлович	Институт биоорганической химии им. академи- ков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва biomem@mail.ru
Денисов Евгений Владимирович	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовате- льский медицинский центр Российской академии наук», Томск d_evgeniy@oncology.tomsk.ru

Дмитриев Сергей Евгеньевич	НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва sergey.dmitriev@belozersky.msu.ru
Дмитриенко Елена Владимировна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск elena.dmitrienko@niboch.nsc.ru
Доме Антон Сергеевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск domeanton@ya.ru
Дреничев Михаил Сергеевич	Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва mdrenichev@mail.ru
Дрозд Валерия Сергеевна	Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург valeryadroz@gmail.com
Дымова Майя Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск dymova@niboch.nsc.ru
Дыркеева Надежда Сергеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск dyrkheeva.n.s@gmail.com
Егоров Александр Дмитриевич	Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет “Сириус”», Сочи egorov.ad@talantiuspeh.ru
Елецкая Барбара Златковна	Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва fraubarusya@gmail.com
Епанчинцева Анна Валерьевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск annaepanch@gmail.com
Жарков Дмитрий Олегович	Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск dzharkov@niboch.nsc.ru
Жарков Тимофей Дмитриевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск timazharkov74@gmail.com
Жданова Полина Викторовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск polina.zhdanova@niboch.nsc.ru
Жуков Сергей Артемович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск jsvbsasp@yandex.ru

Журавлев Евгений Сергеевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск evgenijur@gmail.com
Забелина Дарья Сергеевна	Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск dazabelina@gmail.com
Завьялова Елена Геннадиевна	Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова zlenka2006@gmail.com
Задворных Данила Андреевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск danila.zadvornykh@gmail.com
Зайнутдинов Сергей Сергеевич	Федеральное государственное учреждение науки «Го- сударственный научный центр вирусологии и биотех- нологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово zaynutdinov_ss@vector.nsc.ru
Зарытова Валентина Филипповна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск zarytova@niboch.nsc.ru
Захаренко Александра Леонидовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск a.zakharenko73@gmail.com
Захарова Мария Юрьевна	Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва marusya3@mail.ru
Земская Анастасия Сергеевна	Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгель- гардта РАН, Москва a.zemskaia@mail.ru
Зинченко Никита Дмитриевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск nikita.zinchenko.1994@mail.ru
Иванская Елена Вадимовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск e.agalakova@g.nsu.ru
Ильина Анна Андреевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск humanity2206@mail.ru
Ильичёв Александр Алексеевич	Федеральное государственное учреждение науки «Го- сударственный научный центр вирусологии и биотех- нологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово ilyichev@vector.nsc.ru
Илющенко Валерия Викторовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск LeraVil@yandex.ru

Каменский Петр Андреевич	Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова peter@protein.bio.msu.ru
Канажевская Любовь Юрьевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск Lyubov.Kanazhevskaya@niboch.nsc.ru
Канарская Мария Антоновна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск makanarskaya@gmail.com
Карабельский Александр Владимирович	Автономная некоммерческая образовательная органи- зация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус», Сочи karabelskiy.av@siriusuniversity.ru
Карагяур Максим Николаевич	Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова m.karagyaur@mail.ru
Карпенко Лариса Ивановна	Федеральное государственное учреждение науки «Го- сударственный научный центр вирусологии и биотех- нологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово karpenko@vector.nsc.ru
Кириллова Юлия Геннадьевна	Российский Технологический Университет – МИРЭА, Москва dryulets@mail.ru
Киров Илья	Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва kirovez@gmail.com
Кирсанов Кирилл	НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва kkirsanov85@yandex.ru
Кихай Татьяна Фёдоровна	Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова kih.t1996@yandex.ru
Клабуков Илья Дмитриевич	НМИЦ радиологии Минздрава России, Обнинск ilya.klabukov@gmail.com
Кладова Ольга	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск kladova.nsk@gmail.com
Коваль Владимир Васильевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск koval@niboch.nsc.ru
Коваль Ольга Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск o.koval@niboch.nsc.ru

Ковригина Екатерина Николаевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск e.bobrikova96@gmail.com
Козел Анастасия Юрьевна	Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой, Москва 07.06anastasia@gmail.com
Кокшаров Максим	Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва m.o.koksharov@gmail.com
Колос Елена Андреевна	Институт экспериментальной медицины, Санкт- Петербург koloselena1984@yandex.ru
Комиссаров Андрей Борисович	Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург a.b.komissarov@gmail.com
Комякова Алина Михайловна	Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва komyakova.1999@mail.ru
Коневета Андрей Леонидович	НИЦ “Курчатовский институт” - ПИЯФ, Гатчина konevega_al@npni.nrcki.ru
Корниенко Татьяна Евгеньевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск t.kornienko1995@gmail.com
Королева Людмила Сергеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск koroleva@niboch.nsc.ru
Коротов Игорь Александрович	Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, Красноярск igorkorotov96@gmail.com
Коршун Владимир Аркадьевич	Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва v-korshun@yandex.ru
Костарева Ольга Сергеевна	Институт белка РАН, Пушкино kostareva@vega.protres.ru
Костюшев Дмитрий Сергеевич	Институт медицинской паразитологии и тропической медицины имени Е. И. Марциновского, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва dkostushev@gmail.com

Костюшева Анастасия Павловна	Институт медицинской паразитологии и тропической медицины имени Е. И. Марциновского, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва kostyusheva_ap@mail.ru
Кофиади Илья Андреевич,	ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва
Кочетков Сергей Николаевич	Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва kochetkoffsergej@yandex.ru
Кравченко Татьяна Валерьевна	Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва tanyakravchenko2309@gmail.com
Красицкая Василиса Валерьевна	Институт биофизики СО РАН, Красноярск vasilisa.krasitskaya@gmail.com
Криворотов Денис Викторович	ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург denhome@bk.ru
Кропачева Надежда Олеговна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск n.kropacheva1@ngsu.ru
Крылов Вадим Борисович	Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва vadimkrilov@yandex.ru
Кудрявцев Александр Николаевич	Институт биофизики СО РАН, Красноярск kirush07@mail.ru
Кузнецов Никита	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск Nikita.Kuznetsov@niboch.nsc.ru
Кузнецова Александра Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск sandra-k@niboch.nsc.ru
Кузнецова Мария Сергеевна	ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск mskuz92@mail.ru
Кузьмич Алексей	Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва akrubik@gmail.com

Кулемзин Сергей Викторович	Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск skulemzin@mcb.nsc.ru
Кулигина Елена	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск kuligina@niboch.nsc.ru
Купрюшкин Максим Сергеевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск kuprummax@gmail.com
Курбатов Леонид Константинович	Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва leonid15@mail.ru
Лаврик Инна Николаевна	Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск ilav3103@gmail.com
Лаврик Ольга Ивановна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск lavrik@niboch.nsc.ru
Лалковичова Мария	Объединенный институт ядерных исследований, Дубна lalkovicova@jinr.ru
Ларионова Марина Дмитриевна	Институт биофизики СО РАН, Красноярск larionova.marina@inbox.ru
Левицкий Сергей Алексеевич	Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва krolick@yandex.ru
Логашенко Евгения Борисовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск evg_log@niboch.nsc.ru
Ломакин Яков Анатольевич	Филиал Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемя- кина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва yasha.l@bk.ru
Ломзов Александр Анатольевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск lomzov@niboch.nsc.ru
Лосев Михаил Викторович	ООО «Медико-биологический Союз», Новосибирск lossev@yandex.ru
Лузина Ольга Анатольевна	Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск luzina@nioch.nsc.ru
Лукашев Александр Николаевич	Институт медицинской паразитологии и тропической медицины имени Е. И. Марциновского, Москва qip_20@mail.ru

Лукина Мария Владимировна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск lukina@niboch.nsc.ru
Мазунин Илья	Федеральная сеть “Клиника Фомина”, Москва I.Mazunin@skoltech.ru
Макаревич Павел Игоревич	Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова Москва makarevichpi@my.msu.ru
Макаров Дмитрий Александрович	Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгель- гардта РАН, Москва dmitmakarov_97@mail.ru
Максимов Георгий Владимирович	Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова Москва qip_20@mail.ru
Маланханова Туяна Баировна	Акционерное Общество «БИОКАД», Санкт-Петербург malankhanovatb@biocad.ru
Маликова Наталья Петровна	Институт биофизики СО РАН, Красноярск nrmal@yandex.ru
Малова Евгения Андреевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск malova.ev.an@gmail.com
Мальшева Дарья Олеговна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск d.malysheva@g.nsu.ru
Марков Андрей Владимирович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск andmrkv@gmail.com
Марков Олег Владимирович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск markov_oleg@list.ru
Маркова Светлана Владимировна	Институт биофизики СО РАН, Красноярск smarkova@mail.ru
Маслов Михаил Александрович	Российский Технологический Университет – МИРЭА, Москва
Матвеев Андрей	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск guterus@gmail.com
Матвеева Анастасия Михайловна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск anastasiya.maateeveva@gmail.com
Матвеева Вера Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск vam@niboch.nsc.ru

Матюгина Елена Сергеевна	Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва matyugina@gmail.com
Махмуд Марах	НИИ “Московский физико-технический институт”, Москва mrmormah97@gmail.com
Мацвай Алина	ФГБУ “ЦСП” ФМБА России, Москва amatsvay@cspmz.ru
Медведев Сергей Петрович	Институт цитологии и генетики СО РАН, Новоси- бирск medvedev@bionet.nsc.ru
Мелихова Татьяна Дмитриевна	Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва tdm-63@yandex.ru
Мещанинова Мария Ивановна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск mesch@niboch.nsc.ru
Минтаев Рамиль Рафаилович	Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Феде- рального медико-биологического агентства, Москва ramil.mintaev@fbb.msu.ru
Миронова Екатерина Михайловна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск mironovaforwork@gmail.com
Миронова Надежда Львовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск mironova@niboch.nsc.ru
Мирошников Анатолий Иванович	Филиал Института биоорганической химии им. ака- демиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва aiv@ibch.ru
Мирошников Константин Анатольевич	Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва kmi@bk.ru
Михновец Игорь Эдуардович	Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва mikhnovets.igor@gmail.com
Моралев Арсений Денисович	Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск arseniimoralev@gmail.com
Морозов Виталий Валерьевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск doctor.morozov@mail.ru

Мосевичкий Марк Исаакович	Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Санкт-Петербург m_mosev@mail.ru
Мохамед Ислам Сабер	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск sabermohamedm28@gmail.com
Мурашев Аркадий Николаевич	Филиал Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемя- кина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва murashev@bibch.ru
Науменко Ольга Борисовна	ООО «МБС-Технология», Новосибирск naumenko@mbu-tech.com
Наумова Ольга Викторовна	Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН, Новосибирск naumova@isp.nsc.ru
Невинский Георгий Александрович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск nevinsky@niboch.nsc.ru
Нетёсов Сергей Викторович	Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск svn15@hotmail.com
Новопашина Дарья Сергеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск danov@niboch.nsc.ru
Нуштаева Анна Андреевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск nushtaeva.anna@gmail.com
Овчинникова Лейла Александровна	Филиал Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемя- кина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва leyla_ovchinnikova@yahoo.com
Одаренко Кирилл Вячеславович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск k.odarenko@yandex.ru
Олейник Галина Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск zakabluk@niboch.nsc.ru
Орлова Елизавета Андреевна	Научный центр проблем здоровья семьи и репродук- ции человека, Иркутск elizaveta.a.orlova@gmail.com
Ощепкова Анастасия Леонидовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск oshchepkova.2018@gmail.com

Павленко Даниил Михайлович	Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва tovmolotov@yandex.ru
Павлова Анна Сергеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск annivany@gmail.com
Павлова Галина Валериевна	Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва lkorochkin@mail.ru
Панамарев Никита Сергеевич	Институт биофизики СО РАН, Красноярск panamarev-n@yandex.ru
Парамоник Анастасия Павловна	Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск paramonik.ap@gmail.com
Патугина Ольга Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск patutina@niboch.nsc.ru
Пермякова Наталья Владиславовна	Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск puh@bionet.nsc.ru
Першин Владимир Игоревич	Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород bp1995@yandex.ru
Пестряков Павел Ефимович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск pavel.pestryakov@niboch.nsc.ru
Петрова Елена Сергеевна	Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург iempes@yandex.ru
Петрунина Наталья Андреевна	Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства, Москва petrunina@phystech.edu
Печковская Софья Александровна	Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург sapechkovskaya@gmail.com
Пиунова Ульяна Евгеньевна	Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва ulya.ulichka@gmail.com
Пономарева Наталья Игоревна	Институт медицинской паразитологии и тропической медицины имени Е. И. Марциновского, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва ponomareva.n.i13@yandex.ru

Попова Валерия Геннадьевна	НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва nuarrbio@gmail.com
Попова Виктория Константиновна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск fom.nin198@mail.ru
Прасолов Владимир Сергеевич	Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгель- гардта РАН, Москва prassolov45@mail.ru
Прохоренко Игорь Адамович	Филиал Института биоорганической химии им. ака- демиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва prig67@mail.ru
Прохорова Дарья Вадимовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск prohorova1994@gmail.com
Пучков Павел Анатольевич	Российский Технологический Университет – МИРЭА, Москва puchkov_pa@mail.ru
Пышная Инна Алексеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск grafinna@gmail.com
Расколупова Валерия Игоревна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск v.raskolupova@mail.ru
Рихтер Владимир Александрович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск richter@niboch.nsc.ru
Рудометов Андрей Павлович	Федеральное государственное учреждение науки «Го- сударственный научный центр вирусологии и биотех- нологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово andrei692@mail.ru
Рудометова Надежда	Федеральное государственное учреждение науки «Го- сударственный научный центр вирусологии и биотех- нологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово nadenkaand100@mail.ru
Рыкова Елена Юрьевна	Институт цитологии и генетики СО РАН, Новоси- бирск rykova.elena.2014@gmail.com
Савин Иннокентий Андреевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск savin_ia@niboch.nsc.ru
Савиновская Юлия	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск yulya_savinovskaya@mail.ru

Сальников Павел Александрович	Институт цитологии и генетики СО РАН, Новоси- бирск paul.salnikov@gmail.com
Сапожникова Ксения Андреевна	Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва ksapozh@mail.ru
Сафенкова Ирина Викторовна	ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва saf-iri@yandex.ru
Свердлов Евгений Давидович	НИЦ “Курчатовский институт”, Москва edsverd@gmail.com
Светлова Юлия Игоревна	ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва j.i.svetlova@gmail.com
Селедцова Наталья Владимировна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск jewel82@yandex.ru
Сенькова Александра Васильевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск alsenko@mail.ru
Сергеева Ольга Владимировна	Сколковский институт науки и технологии, Москва o.sergeeva@skoltech.ru
Сильников Владимир Николаевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск v.silnikov@mail.ru
Сольев Павел Николаевич	Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгель- гардта РАН, Москва solyev@gmail.com
Спасская Дарья Сергеевна	Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгель- гардта РАН, Москва drspssk@gmail.com
Стародубова Елизавета Сергеевна	Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгель- гардта РАН, Москва estarodubova@yandex.ru
Староселец Ярослав	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск staroselec@ngs.ru
Степанов Григорий Александрович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск stepanovga@niboch.nsc.ru
Сунбули Хетам	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск khetam.sounbuli.edu@gmail.com

Талышев Вадим Алексеевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск talyshev.v@gmail.com
Таранин Александр Владимирович	Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск taranin@mcb.nsc.ru
Таскаев Сергей Юрьевич	Институт ядерной физики имени Г. И. Будкера СО РАН, Новосибирск taskaev@inp.nsk.su
Татарникова Ирина Сергеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск istatarnikova@gmail.com
Терешин Михаил Николаевич	Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва misha060596@yandex.ru
Тимофеева Анна Михайловна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск anna.m.timofeeva@gmail.com
Томилин Алексей Николаевич	Институт цитологии и генетики СО РАН, Новоси- бирск a.tomilin@incras.ru
Торгунакова Анастасия Владимировна	Институт экологии человека Федерального исследова- тельского центра угля и угляхимии СО РАН, Кемерово A.VRyzhkova@yandex.ru
Торощина Анастасия Владимировна	Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова, Санкт-Петербург darkagness@mail.ru
Туманов Юрий Васильевич	Государственный научный центр вирусологии и био- технологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово tumanov@vector.nsc.ru
Уфимцева Елена	НИИ биохимии ФИЦ ФТМ, Новосибирск ufim1@ngs.ru
Федорова Ольга Семеновна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск fedorova@niboch.nsc.ru
Фетисов Тимур Игоревич	НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва timkatryam@yandex.ru
Филатов Александр Василье- вич	ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, Москва avfilat@yandex.ru
Филатова Алина Алексеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск a.filatova2@g.nsu.ru

Филимонов Александр Сергеевич	Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск alfil@nioch.nsc.ru
Фисунов Глеб Юрьевич	“Научно-исследовательский институт дезинфектологии” Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва herr.romanoff@gmail.com
Хамад Аззам Нассерович	Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Москва azzam.hamad@phsytech.edu
Хандажинская Анастасия Львовна	Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва khandazhinskaya@bk.ru
Хлусевич Яна Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск khlusevichjana@mail.ru
Хомутов Алексей Радиевич	Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва alexkhom@list.ru
Челкин Александр Андреевич	АО “ГенТерра”, Москва e.nam@genterra.ru
Чепанова Арина Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск arinachepanova@mail.ru
Черенко Виктория Александровна	Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск v.cherenko@g.nsu.ru
Черников Иван Вячеславович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск Chernikovivanv@gmail.com
Черноловская Елена Леонидовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск elena_ch@nioch.nsc.ru
Чечушков Антон	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск achechushkov@gmail.com
Чиглинцева Дарья Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск dashachiglintseva@gmail.com
Чикаев Антон Николаевич	Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск chikaev@mcb.nsc.ru

Чичерин Иван Владимирович	Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова Москва i.v.chicherin@gmail.com
Чубаров Алексей Сергеевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск chubarovalesha@mail.ru
Чудинов Александр Васильевич	Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва chud@eimb.ru
Чуланов Владимир Петрович	Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний Министерства здравоохранения России, Москва vladimir@chulanov.ru
Шалик Игорь Константинович	Федеральное государственное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово i.shalik@g.nsu.ru
Шагунова Елизавета Андреевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск lizashatunova@yandex.ru
Шестопалов Александр Михайлович	Федеральный Исследовательский Центр Фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск shestopalov2@ngs.ru
Шефер Алексей Александрович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск ashiefier@bk.ru
Шехтман Софья Павловна	Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова Москва sssonnya@gmail.com
Шипулин Герман Александрович	Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва Shipulin@cspmz.ru
Шитик Екатерина Максимовна	Федеральное государственное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово galaninaekaterin@gmail.com
Штам Татьяна Александровна	НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина Shtam_TA@pnpi.nrcki.ru
Штыкалова Софья Валерьевна	НИИ Акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург sofia.shtykalova@gmail.com

Шуряева Анна Константиновна	ФГБУ “ЦСП” ФМБА России, Москва anna.shuryaewa@yandex.ru
Щелчкова Наталья Александровна	Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород n.shchelchkova@mail.ru
Щербаков Дмитрий Николаевич	Федеральное государственное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово dnshcherbakov@gmail.com
Юдкин Дмитрий Владимирович	Федеральное государственное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово yudkin_dv@vector.nsc.ru
Юсубалиева Гаухар Маратовна	ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, Москва gaukhar@gaukhar.org
Якубовская Марианна Геннадиевна	НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва mgyakubovskaya@mail.ru

СОДЕРЖАНИЕ

Устные доклады	25
Антитела для медицины.....	27
Ингибиторы ферментов как терапевтические агенты	35
Клеточные технологии в медицине	55
Молекулярная диагностика и биоимиджинг	65
Онколитические вирусы и генная терапия.....	83
Симпозиум «30 лет компании «Биосан». Российская реагентная база для генетических технологий»	93
Системы геномного редактирования и технологии управления геномом	97
Терапевтические нуклеиновые кислоты, РНК и ДНК-вакцины, средства их адресной доставки	115
Ядерные технологии в биомедицине	137
Стендовые доклады	143
Авторский указатель	251
Список участников	260

Подписано в печать 13.07.2022. Формат 70x100/16.
Усл. печ. л. 17,5. Тираж 100 экз. Заказ № 740.

Отпечатано в типографии ООО «Офсет-ТМ».
630117, Новосибирск, ул. Арбузова 1/1, корп. 14.
тел.(383)304-82-32, e-mail: ofsetn@yandex.ru.