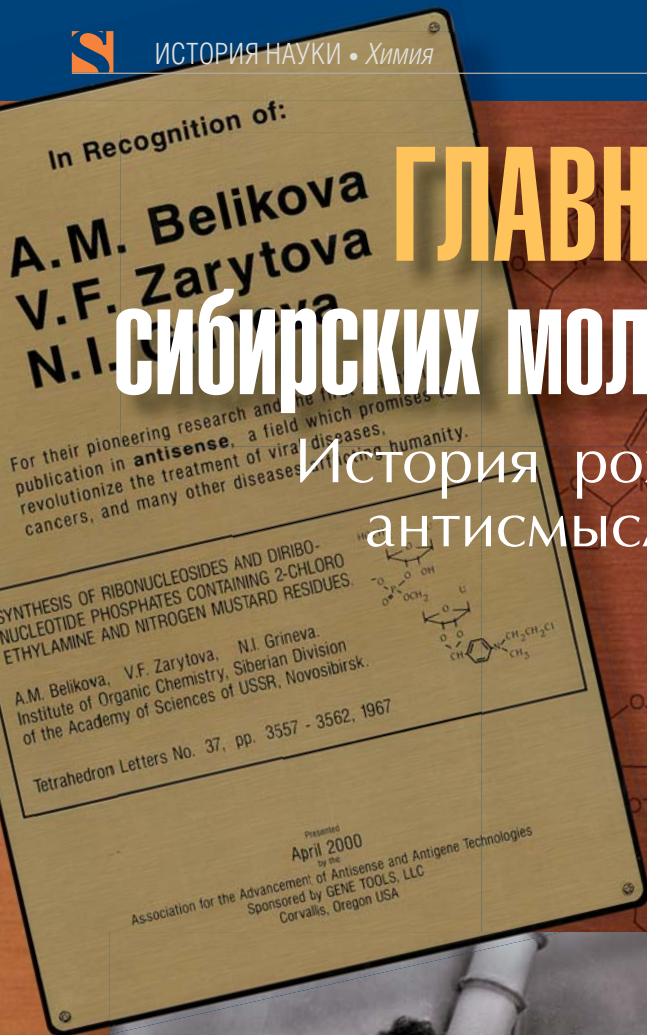


главный проект сибирских молекулярных биологов

История рождения и эволюции антисмысловых технологий

Создание новосибирского Академгородка можно по праву назвать уникальной страницей в истории российской науки. Удивительно быстро в диком лесу вырос мощный наукоград, где были запущены масштабные проекты, результаты которых оказали влияние на развитие мировой науки. К числу таких великих начинаний относится проект по созданию средств направленного воздействия на генетические структуры, который в начале 1960-х гг. стал воплощаться в жизнь в лаборатории природных полимеров, руководимой Д. Г. Кнорре



ВЛАСОВ Валентин Викторович – академик РАН, доктор химических наук, профессор, научный руководитель Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Лауреат Государственной премии РФ (1999), Национальной премии «Призвание» (2015), кавалер ордена Александра Невского (2022). Автор и соавтор более 600 научных работ и 30 патентов

На бронзовой доске, изготовленной по заказу международной ассоциации исследователей, развивающих антисмысловые технологии, запечатлена ссылка на пионерную работу сибирских ученых – первую публикацию в новом направлении биофармацевтики

Коллектив лаборатории природных полимеров Новосибирского института органической химии СО АН СССР, 1964 г. В первом ряду: Н. И. Гринева (крайняя слева), Д. Г. Кнорре (в центре), аспирантка А. М. Беликова (крайняя справа)

Ключевые слова: нуклеиновые кислоты, ДНК, РНК, олигонуклеотиды, антисмысловые технологии, Н. И. Гринева, Д. Г. Кнорре.

Key words: nucleic acids, DNA, RNA, oligonucleotides, antisense technologies, N. I. Grineva, D. G. Knorre



ЗЕНКОВА Марина Аркадьевна – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией биохимии нуклеиновых кислот Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 267 научных работ и 22 патентов



ЧЕРНОЛОВСКАЯ Елена Леонидовна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор более 100 научных работ и 5 патентов

Термин «молекулярная биология» был предложен еще в 1938 г., но годом подлинного рождения новой научной дисциплины стал 1953 г., когда исследователи из Кембриджского университета Дж. Уотсон и Ф. Крик опубликовали знаменитую статью о строении ДНК. В СССР в то время нуклеиновые кислоты не изучали – 1953 г. стал знаменителен для страны другими событиями.

В марте этого года умер И. В. Сталин, безраздельно правивший страной без малого три десятка лет. После этого было прекращено сфабрикованное властями «дело врачей», обвиняемых в заговоре против ряда советских лидеров. В 1953 г. удалось остановить грозящую ядерным конфликтом и унесшую миллионы жизней корейскую войну, в которой фактически участвовали более двух десятков государств, в первую очередь СССР и США. В том же году в Советском Союзе было впервые проведено успешное испытание водородной бомбы. Это четвертое по счету испытание советского ядерного оружия заставило американских военных отказаться от операции «Дропшот» – планов по нанесению ядерного удара по территории СССР, разработанных в начале холодной войны.

После 1953 г. в стране началась борьба с многолетней монополией в биологической науке создателя псевдонаучной «мичуринской биологии» академика Т. Д. Лысенко, известного как «убийца генетики», и его сторонников. В стране один за другим стали организовываться институты для проведения генетических и молекулярно-биологических исследований.

© В. В. Власов, М. А. Зенкова, Е. Л. Черноловская, 2024

Наиболее дальновидные и активные ученые понимали чрезвычайную важность развития этого направления науки и искали возможности начать новое дело там, где для этого появлялись лучшие возможности. Новосибирский Академгородок был именно тем местом, где могло родиться и развиваться новое. И энтузиасты двинулись в «сибирские леса».

Первые в Сибири

Строительство новосибирского Академгородка началось в 1958 г. А через два года в новый академический центр за Уралом приехал из столицы 35-летний кандидат химических наук Дмитрий Георгиевич Кнорре.

Кнорре обратился к академику Николаю Николаевичу Ворожцову – директору Новосибирского института органической химии (НИОХ) СО АН СССР – с просьбой создать в его институте лабораторию для проведения молекулярно-биологических исследований. Мудрый Ворожцов выслушал молодого ученого и сказал, что тот затевает большое дело, для которого нужна не лаборатория, а целый институт. И в качестве точки роста будущего института предложил организовать лабораторию природных полимеров.

Идея развивать новое направление науки была крайне притягательной, и в команду Кнорре потянулись люди, горящие желанием сделать что-то большое. В соответствии с планом Ворожцова – Кнорре новая лаборатория стала быстро расти и вскоре была преобразована в отдел биохимии.

В своей лаборатории Кнорре удалось собрать выдающийся коллектив, который не только успешно вел фундаментальные исследования, направленные

В команде Д. Г. Кнорре работали многие ставшие известными ученые, включая будущих академиков Л. С. Сандахчиева, основателя и руководителя ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор»; В. В. Власова, в 1996 г. сменившего Кнорре на посту директора института; М. А. Грачева, организовавшего исследования проблем Байкальского региона в качестве директора иркутского Лимнологического института; О. И. Лаврик, специалиста с мировым именем в области молекулярных механизмов репарации ДНК.

В лаборатории Кнорре работал гениальный конструктор С. В. Кузьмин, создатель жидкостного хроматографа «Милихром». Здесь начинали путь в науку многие блестящие ученые, такие как специалист по молекулярной вирусологии академик С. В. Нетесов; чл.- корр. РАН М. А. Зенкова, занимающаяся созданием противоопухолевых препаратов на основе нуклеиновых кислот и средств доставки их в клетки, и чл.- корр. РАН Д. В. Пышный.

Известный биотехнолог В. А. Рихтер, еще один бывший сотрудник команды Кнорре, сыграл огромную роль в проекте по организации производства радиоизотопов для молекулярно-биологических исследований в СССР. Он стал создателем отечественных компаний «Биосан» и «Биолабмикс», специализирующихся на разработке и выпуске биохимических реагентов, необходимых для производства медицинских диагностикумов и РНК-вакцин

Д. Г. Кнорре на встрече с руководителями НИОХ СО АН СССР: директором, академиком Н. Н. Ворожцовым (справа) и зам. директора В. П. Мамаевым (слева)



на расшифровку механизмов биосинтеза белка, но и решал важные практические задачи.

По инициативе Кнорре в Академгородке было создано первое биотехнологическое производство. В опытном цехе НИОХ начали производить препараты ферментов, катализирующих деградацию РНК и ДНК, а также организовали масштабную наработку различных *транспортных РНК* (тРНК), переносящих аминокислоты к месту сборки белка.

С помощью оригинальных методов, разработанных будущим академиком Л. С. Сандахчиевым, стало возможным выделять в больших количествах чистые препараты индивидуальных тРНК, необходимые для изучения структуры этих молекул. В результате в 1967 г. в Институте молекулярной биологии АН СССР была успешно расшифрована структура тРНК, переносящая аминокислоту *валин*. Это была большая победа советской биологии: аналогичные исследования проводились лишь в нескольких ведущих зарубежных центрах, а первая структура тРНК была расшифрована в США лишь немногим раньше (в 1964 г.).

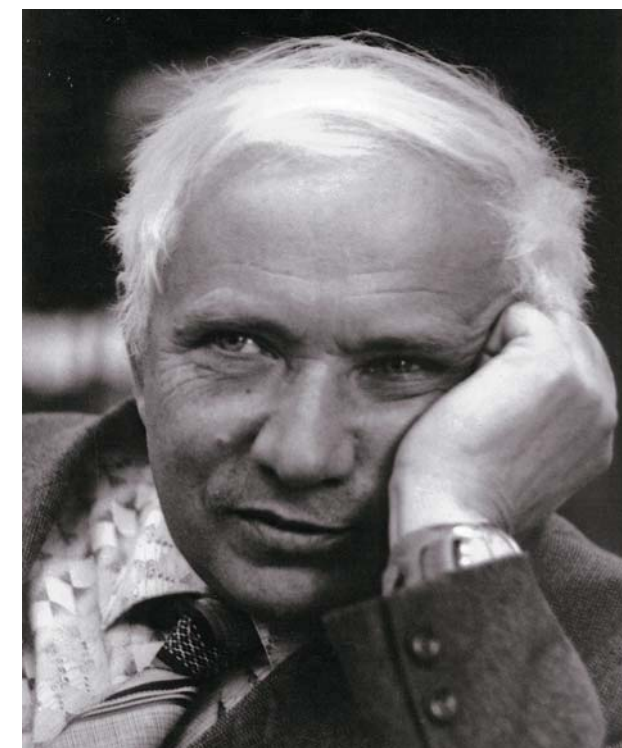
Работы сотрудников быстро растущей лаборатории Кнорре, а позже и созданного им института получили широкую известность в нашей стране и за рубежом. Но ученые мечтали о по-настоящему великих проектах. Один из них – изучение механизмов формообразования в живой природе – начал развивать Сандахчиев. А самый опытный сотрудник команды, Н. И. Гринева, предложила масштабный проект, который принес институту и сибирской науке мировую славу.

Задачей проекта – по тем временам совершенно фантастической! – было создание веществ для направленного воздействия на определенные гены. Этот проект оказал огромное влияние на развитие молекулярной биологии и положил начало, пожалуй, самому важному направлению биофармацевтики, основанному на использовании в качестве средств терапии фрагментов нуклеиновых кислот, обладающих широчайшим спектром биологических активностей.

Идея, опередившая время

О молекулярных средствах воздействия на определенные гены давно мечтали химиотерапевты, чтобы применять их как «волшебные пули», нацеленные на гены возбудителей инфекций либо онкогены, ответственные за злокачественный рост клеток. Понять, как сделать эти мечты былью, удалось специалисту в органической химии Нине Ивановне Гриневой, которая переехала в Новосибирск из Москвы в 1962 г. после защиты кандидатской диссертации.

Сформулированная ею основополагающая идея состояла в нацеливании химических реагентов на заданные генетические программы с помощью



Основатель Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, академик Д. Г. Кнорре

олигонуклеотидов – фрагментов нуклеиновых кислот, которые могут связываться с комплементарными им последовательностями в одноцепочечных РНК и ДНК. К олигонуклеотидам исследовательница предложила присоединять реакционноспособные группы, чтобы с их помощью вносить химические модификации в целевой участок мишени.

В этом случае олигонуклеотиды выступают как своего рода молекулярные «адреса», с помощью которых активные химические группы доставляются к нужным нуклеиновым кислотам. Для конструирования такого адреса требуется лишь найти в конкретной нуклеиновой кислоте уникальную последовательность.

Важными преимуществами олигонуклеотидов как основы биологически активных веществ является принципиальная возможность быстро получать препараты для воздействия на любые гены-мишени с использованием универсальной технологии. Что невероятно перспективно в плане производства.

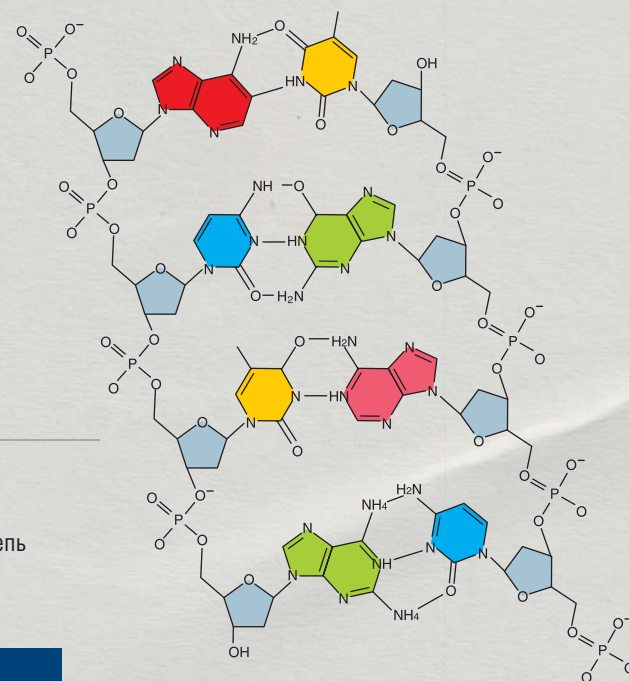
Идея Гриневой была, безусловно, великой, но, как и в случае большинства великих идей, решение выглядело просто только на бумаге. Вспомним, что описываемые события происходили в 1960-е гг., когда еще нигде в мире не умели синтезировать олигонуклеотиды нужной длины и в количестве, достаточном для



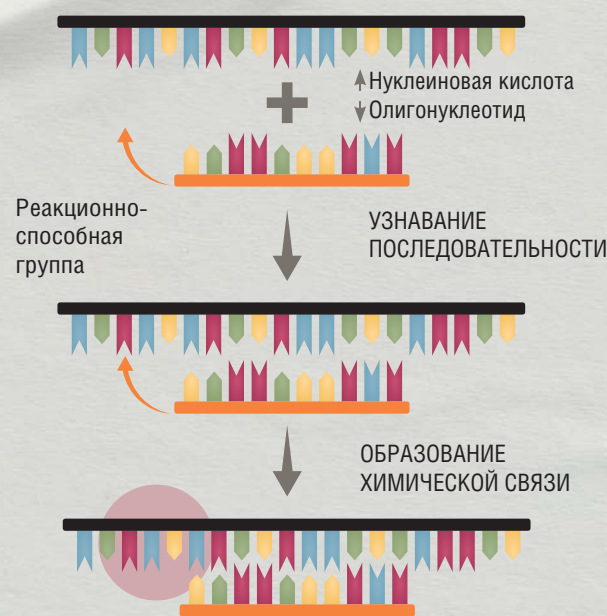
Азотистые основания:
 ■ Аденин (А)
 ■ Тимин (Т)
 ■ Гуанин (Г)
 ■ Цитозин (Ц)

Сахарофосфатный остов

Двойная цепь ДНК



Двухцепочечные структуры ДНК и РНК формируются за счет взаимодействия пар комплементарных нуклеотидов, расположенных определенным образом: напротив нуклеотидов А должны находиться Т, напротив Г – Ц. Фрагмент одной из цепей – олигонуклеотид – способен узнавать комплементарную ему последовательность в составе одноцепочечной нуклеиновой кислоты



Направленная химическая модификация нуклеиновой кислоты реакционноспособным производным олигонуклеотида

приготовления препаратов. И это не говоря уже о том, чтобы присоединять к ним какие-либо химические группы.

Не существовало тогда и эффективных методов *секвенирования* (определения последовательности) нуклеиновых кислот, без чего нельзя было найти последовательности-мишени. И никто не мог обещать, что возможность быстрой расшифровки структуры генов появится в ближайшее столетие. Однако все это не остановило запуск проекта, необычайного по смелости – нигде в мире в то время подобные работы даже не обсуждались!

Небольшая группа под руководством Гриневой начала развивать новое направление практически с нуля: учились синтезировать олигонуклеотиды, придумывали методы присоединения к ним химических групп. Было трудно, но исследователями двигала воля к победе. К тому же эта история начиналась в годы, когда государство активно поддерживало науку,

Если к биологической системе, где имеется множество молекул разных нуклеиновых кислот, добавить олигонуклеотид, то он образует комплекс только с той, где есть определенная, комплементарная ему последовательность. Такая особенность означает и способность узнавать гены, поскольку в каждом из них можно найти уникальные последовательности. Даже в огромном геноме человека 20-нуклеотидная последовательность статистически встречается только один раз. Так что для избирательного воздействия на определенные гены человека достаточно 20-звенных олигонуклеотидов, а на вирусные и бактериальные геномы – 12–15-звенных

а бюрократическая нагрузка на ученых была минимальной, когда новые проекты можно было запускать без сражений с запутанной грантовой системой, убивающей все по-настоящему революционные замыслы.

Для самой Нины Ивановны химия нуклеиновых кислот (в основном это была непростая химия фосфора) была «новым полем». Но трудности понемногу преодолевались, в лаборатории удалось организовать наработку веществ, необходимых для получения олигонуклеотидов.

Начало

Как все начиналось? Отдельного кабинета у Кнорре, в то время завлаба и кандидата наук, не было: его письменный стол стоял у окна в одномодульной комнате, а рядом с ним находился большой лабораторный стол со спектрофотометром, на котором работали аспиранты, изучавшие взаимодействия олигонуклеотидов физическими методами.

Группа Гриневой располагалась в трех комнатах. В ее состав входили несколько младших научных сотрудников, по паре аспирантов и лаборантов, да тройка студентов. Все они были молодыми и работающими, а их руководительница была образцом настойчивости и трудолюбия. В то время Нина Ивановна была чемпионкой Академгородка по теннису, и в комнате у нее на полу вечно валялись мячики, а сама она сидела за заваленным бумагами столом, под которым в летнюю жару ставила таз с водой и опускала в него ноги – для повышения продуктивности умственной деятельности...

Трудной задачей стало создание «боеголовки», действующих на ДНК, которыми надо было вооружить олигонуклеотиды. Гринева придумывала нужные реакционно-способные группы и схемы их присоединения к олигонуклеотидам. Было синтезировано несколько



Автор идеи комплементарно-адресованной модификации нуклеиновых кислот Н.И. Гринева в 1960 г. была принята старшим научным сотрудником в лабораторию природных полимеров (впоследствии – отдел биохимии) Института органической химии СО АН СССР, которой руководил Д.Г. Кнорре

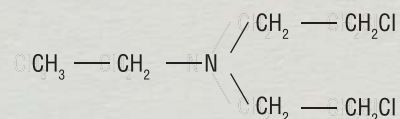
вариантов таких веществ, сложные синтезы выполнялись аспирантами и студентами.

Работа эта была непростой, и многих преследовали неудачи. Запомнился ужасный случай: студентка Евгения Сайкович уронила в коридоре колбу с эфирным раствором, где находился реагент, полученный ею в результате полугода работы. Бедняжка полдня поливала пол органическими растворителями и собирала лужицы пипеткой в надежде выделить из смывов хотя бы часть драгоценного материала.

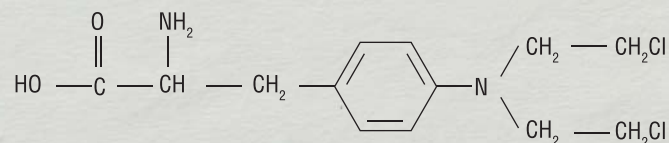
Испытания разных реакционноспособных групп выявили наиболее перспективные аналоги *азотистых ипритов*. Эти хлорорганические соединения первоначально были синтезированы в Германии в качестве боевых отравляющих веществ, но позже стало известно, что они реагируют с нуклеиновыми кислотами, и их стали применять как цитотоксические средства для лечения рака. Гринева решила использовать один из вариантов азотистого иприта как базовую структуру и придумала, как эту «боеголовку» можно присоединить к разным концам олигонуклеотидов. Чтобы снизить токсичность полученных соединений, в них решили оставить только один активный атом хлора.

Синтезировать азотистые иприты было поручено младшему научному сотруднику Тамаре Ломакиной, а присоединять их к олигонуклеотидам – стажеру-исследователю Валентине Зарытовой и лаборантке Алле Беликовой. Студенту Валентину Власову предстояло изучить свойства этих веществ: нужны были количественные данные об их реакционной способности в различных растворителях в зависимости от температуры, а также об изменении этих характеристик при присоединении ипритов к олигонуклеотидам. Трудность состояла в том, что исследуемых веществ было очень мало – необходимо было придумать, как провести такие работы в микромасштабе.

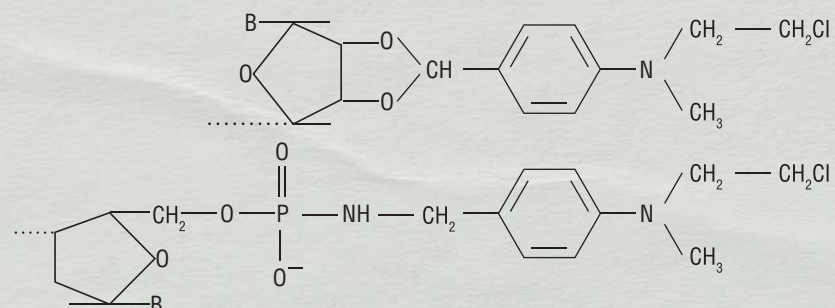
Отравляющее вещество
бис-(2-хлорэтил)этиламин
(«азотистый иприт HN1»)



Сарколизин



Аналоги азотистого иприта, алкилирующие группировки присоединены к концам олигонуклеотидов по методам, разработанным Н.И. Гриневой



Боевые отравляющие вещества «азотистые иприты» способны за счет своих группировок, содержащих атомы хлора, ковалентно присоединяться к ДНК и нарушать функционирование генов. Поскольку такие реакции оказываются наиболее губительными для быстро делящихся клеток, предпринимались попытки использовать аналоги азотистых ипритов для терапии рака, так как опухолевые клетки делятся исключительно интенсивно. Оказалось, что, изменяя структуру молекулы иприта, можно снизить его токсичность и присоединить к ней различные химические группировки. В результате удалось создать противораковый препарат сарколизин, который применяется химиотерапевтами и в наши дни

Самой яркой фигурой в группе Гриневой был аспирант Виктор Курбатов, в задачу которого входило изучение реакций между ипритами и полинуклеотидами. В очках, маленький и подвижный, вечно улыбающийся Витя вприпрыжку бегал по коридорам, разносил новости и громко хохотал. Он прекрасно знал английский и немецкий языки, был очень общительным и любим студентами младших курсов. Благодаря его общению со студентами в лабораторию пришло много будущих выдающихся химиков и биологов.

Осенью 1967 г. в лаборатории появилась еще одна неординарная личность – аспирант Виктор Кумарев, который занялся разработкой методов присоединения реакционноспособных групп к пуриновым нуклеотидам. В работе ему помогал его богатый экспериментальный опыт, полученный при работе аппаратчиком на химическом заводе во время учебы. Виктор почти все время проводил в институте, по ночам играл с сотрудниками в шахматы или извлекал из мандолины печальные мелодии.

Администрация института безуспешно боролась с привычкой аспиранта курить в лаборатории. В результате однажды произошел взрыв, и горе-курильщик едва не потерял зрение. Рассерженная Гринева решила, что с нее хватит, и Виктор перешел на работу к М.А. Грачеву, который взял его на поруки и предложил новую тему работы. Позже, уже работая в Институте цитологии и генетики АН СССР, Кумарев с сотрудниками синтезировали из олигонуклеотидных фрагментов

искусственный ген β -интерферона человека, который встроили в геном кишечной палочки.

...Жизнь в НИОХ протекала в то время точно так, как было описано у братьев Стругацких в фантастической повести «Понедельник начинается в субботу». Где-то вверху, в облаках обитал великий и могучий Директор, академик Ворожцов. Была беспокойная лаборатория Кнорре, сотрудники которой работали днем и ночью, семь дней в неделю. В институте, естественно, была парторганизация, которая периодически проводила философские семинары, во время которых ученые изображали интерес к планам построения коммунизма и читали научные статьи, устроившись подальше от трибуны.

Был и строгий Зам. Директора по общим вопросам, в прошлом полковник, командовавший вахтерами, снабженцами и уборщицами. Он боролся с нарушителями дисциплины и старался ограничить возможности ученых работать по ночам как в одиночку, так и парами, справедливо считая, что по ночам они могут развивать романтические отношения и нарушать технику безопасности (что также было правдой).

Работа химиков зачастую опасна, бывало всякое. Однажды в институте случился сильный пожар, в результате которого практически выгорел один этаж и погиб пожарный.

Потери были и в лаборатории Кнорре: погибла Тамара Ломакина. Она работала с органическими веществами, используя перчаточный сухой бокс с осушителем.



Аспирант В. Курбатов (в центре) с учениками физматшколы при НГУ, которые захотели поработать в лаборатории Кнорре, – будущим вирусологом академиком С.В. Нетесовым и будущим известным специалистом в области пептидного синтеза В.В. Самуковым

В бокс помещали колбы, мешалки, нагреватели и другие устройства, а химик манипулировал ими с помощью резиновых перчаток, вмонтированных в переднюю стенку. Случилось так, что в боксе долго стоял стакан с эфиром, образовалась опасная газообразная смесь. Когда Тамара включила один из приборов, произошел сильный взрыв, разорвавший бокс и выбивший окна и двери. Девушка получила сильные ожоги и травмы, помочь ей не смогли...

Первые успехи

Воля к победе, эффективное планирование и широкое междисциплинарное сотрудничество позволили исследователям быстро продвинуться вперед. В НИОХ было организовано производство веществ, необходимых для синтеза нуклеиновых кислот, созданы методы их химической модификации, позволяющие присоединять к олигонуклеотидам различные функциональные группы.

Первую статью на эту тему сибирские ученые опубликовали в 1967 г. в международном журнале *Tetrahedron Letters* (№ 37, с. 3557–3562). Эта основополагающая работа группы Гриневой была издана

на 20 лет раньше других аналогичных работ, о чем знают специалисты. Однако когда обсуждают появление идеи применять олигонуклеотиды в качестве лекарств, то как первооснову часто цитируют работу известного американского молекулярного биолога П. Замечника, которая вышла в журнале *PNAS* спустя 11 (!) лет после статьи новосибирских ученых (Stephenson, Zamecnik, 1978, vol. 75 (1), p. 285–288).

Почему так случилось? Ошибка Гриневой была в том, что она слишком строго, по-академически описала предлагаемый подход. Так, как пишут химики-экспериментаторы – без фантазий и необоснованных утверждений. Пол Замечник – очаровательный человек и великий ученый, но его заслуги лежат в других областях, а публикацию 1978 г. об олигонуклеотидах сейчас можно назвать фейком.

Замечник поступил так, как это делают в наши дни представители фармкомпаний: написал, что наблюдал эффект, который ожидал увидеть, хотя представленные в статье данные это не подтверждают. С тех пор прошло много лет, опубликованные им результаты никто не воспроизвел, но статью иногда по-прежнему цитируют, не читая. И даже в американской «Википедии» Замечник указан как основатель антисмысловой терапии.

Когда из лаборатории Кнорре пошла одна за другой статьи, описывающие реакционноспособные производные олигонуклеотидов и их применения, подтвердилось правило: яркие идеи рождаются одновременно во многих умных головах.

Так, Гринева получила письмо с поздравлениями от тогда еще неизвестного американского ученого

Д. Саммертона, который сообщил, что идея использовать олигонуклеотиды для воздействия на гены пришла ему практически одновременно с ней. Однако ему отказывали в финансировании работы, а начальники и рецензенты заявляли, что ничего подобного сделать просто невозможно. Ученый посетовал, что в его стране нельзя начать исследование, не получив предварительного специального гранта.

Надо отметить, что Саммертон не сдался и, вооружившись ссылками на работы Гриневой, нашел возможность убедить американских грантодателей в перспективности работ и начать свои собственные исследования. Он разработал технологию получения оригинальных аналогов олигонуклеотидов, которые сейчас называют *морфолиновыми*, и в 1997 г. создал компанию *Gene Tools*, которая поставляет пользователям морфолиновые олигонуклеотиды и средства для их доставки в клетки.

Кто, если не мы

Первые результаты сибиряков были получены в опытах с использованием простейших доступных материалов, при этом синтез даже коротких олигонуклеотидов стоил больших усилий. Традиционные химические методы, которые при этом применялись, требовали большого количества материала, а имеющиеся приборы не обладали нужной чувствительностью для детекции молекул и возможностями разделения и идентификации нуклеиновых кислот.

Дальнейшее развитие работ было невозможным без появления новых технологий и приборов для синтеза и анализа нуклеотидных последовательностей. Но в то время таких просто не существовало! Сибирской команде пришлось начать несколько проектов, направленных на создание нужных приборов и технологий.

Так, инженеры Института органической химии и Института ядерной физики СО АН СССР, которые работали в кооперации с химиками, создали приборы, позволявшие выделять и анализировать малые количества нуклеиновых кислот. Совместно с Московским государственным университетом были начаты работы по созданию первых автоматических синтезаторов олигонуклеотидов. Эти установки, которые стали производиться в новосибирском Академгородке группой инженеров, руководимой Ю. Г. Срединым и впоследствии организовавших компанию ООО «БИОССЕТ», обеспечили возможность массового синтеза олигонуклеотидов для исследовательских целей и диагностических наборов.

Удалось разработать и эффективные методы разделения и анализа нуклеиновых кислот, чему помогли изыскания Л. С. Сандахчиева и С. В. Кузмина в области

создания систем ультрамикрoанализа биополимеров. Полученные знания и опыт работы с такими системами позволили быстро сконструировать очень удачный вариант микроколоночного хроматографа, позволяющего эффективно разделять и анализировать олигонуклеотиды. «Милихром», которого к началу 1990-х гг. было выпущено около 6 тыс. штук, стал любимым прибором в научных лабораториях и биотехнологических компаниях. Лицензию на этот прибор приобрела шведская фирма LKB – лидер научного приборостроения тех лет.

Задачу обеспечения исследователей радиоизотопной продукцией, критически важной для секвенирования и анализа нуклеиновых кислот, удалось решить команде молодых ученых, собранной М. А. Грачевым, которые буквально с нуля создали сложное производство на ташкентском предприятии «Радиопрепарат».

Таким образом команда сибирских молекулярных биологов обеспечила собственные исследования (а заодно – и ученых всей страны) отличными приборами и радиоизотопной продукцией, которые нужны для множества важных приложений в самых разных областях науки и технологии.

Располагая необходимой материально-технической базой, сибиряки первыми в стране провели работы по расшифровке геномов (первым из них стал геном



Синтезатор нуклеиновых кислот ДНК и РНК ASM-800ET, разработанный ООО «БИОССЕТ». Этот эффективный прибор долгое время обеспечивал потребности российских организаций в олигонуклеотидах, а также поставлялся в 26 зарубежных стран, главным образом в США



На строительстве корпуса Новосибирского института биоорганической химии СО АН СССР. 1968 г.

вируса клещевого энцефалита) и создали первые средства детекции инфекционных агентов с помощью олигонуклеотидов, комплементарных вирусной РНК.

Была и еще одна проблема: растущему коллективу был необходим приток хорошо подготовленных специалистов, химиков и биологов. Решением этой задачи занялся сам Кнорре, который организовал кафедру молекулярной биологии на факультете естественных наук Новосибирского государственного университета. Он составил программы «гибридной» подготовки студентов, дающие знания как в биологии, так и в химии. А для обучения студентов по новым программам Кнорре и его сотрудники написали учебники и методические пособия.

За 17 лет, что Кнорре был деканом ФЕН НГУ, были подготовлены сотни специалистов высшей квалификации. Новый институт и другие научные организации Сибири были обеспечены отличными кадрами.

Открытий хватит всем!

Когда в 1984 г. на базе отдела биохимии был организован Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР, фронт работ с олигонуклеотидами расширился. Помимо лаборатории химии нуклеиновых кислот во главе с В. Ф. Зарытовой, появилась и лаборатория биохимии нуклеиновых кислот, которой руководил В. В. Власов.

В работу по синтезу реакционноспособных групп для олигонуклеотидов включились сотрудники лаборатории органического синтеза. Были синтезированы фотоактивируемые реагенты на основе флуоресцентного

красителя *бромистого этидия* и фоточувствительного красного пигмента *порфирина*. Производные олигонуклеотидов (*конъюгаты*) с такими группами при воздействии света катализируют окислительную деструкцию ДНК и РНК.

Также были разработаны несколько оригинальных реакционноспособных групп, вносящих необычные модификации в целевые нуклеиновые кислоты. Среди них – комплексные соединения *платины*, прочно связывающиеся с ДНК, и комплексы *этилендиаминтетрауксусной кислоты* (ЭДТА) с железом, генерирующие свободные радикалы, повреждающие ДНК. Кроме того, были синтезированы конъюгаты олигонуклеотидов, которые образуют комплексы с ДНК повышенной прочности, а также первые олигонуклеотидные реагенты с реакционноспособными группами, имитирующими активный центр *рибонуклеазы А*, способные, как и этот природный фермент, каталитически расщеплять РНК.

Один из успешных проектов по созданию олигонуклеотидных производных, обладающих высокой точностью действия, привел к так называемым *бинарным реагентам*. Они представляют собой пару олигонуклеотидных конъюгатов, которые формируют одну реакционноспособную структуру лишь после того, как свяжутся с соседствующими участками нуклеиновой кислоты. Таким образом, они начинают работать только в присутствии целевой нуклеотидной последовательности, что обеспечивает высокую избирательность их действия. В наши дни такой подход нашел применение



Академики Ю. А. Овчинников и Н. Л. Добрецов поддержали идею создания и развития в новосибирском Академгородке нового института, занимающегося исследованиями в области молекулярной биологии и разработкой инновационных медицинских технологий

Институт на базе отдела биохимии Д. Г. Кнорре был создан лишь в 1984 г. Задержка была связана с тем, что предлагаемое название – Институт молекулярной биологии – вызывало «аллергическую реакцию» у тогдашнего руководства Сибирского отделения АН СССР, которое раз за разом откладывало вопрос оформления необходимых документов.

Проблему решил вице-президент АН СССР, могущественный академик Ю. А. Овчинников, который в то время был директором Института биоорганической химии АН СССР и президентом Федерации европейских биохимических обществ. Ему импонировали научные направления, развиваемые сибирскими молекулярными биологами, и он провел необходимые переговоры с руководством Академии и членами правительства. А чтобы нейтрализовать сибирских научных чиновников, предложил дать новой организации «химическое» название, аналогичное названию его собственного института, как бы беря ее под свою защиту.

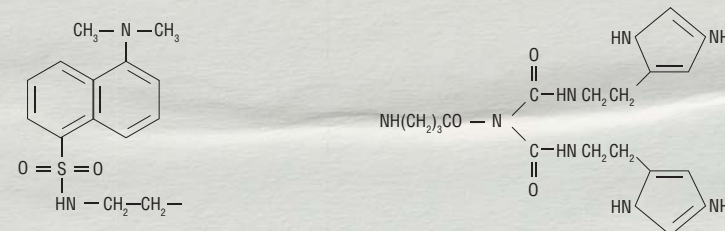
Так институт получил свое первое имя – Новосибирский институт биоорганической химии (НИБХ). Современное название – Институт химической биологии и фундаментальной медицины (ИХБФМ) – он приобрел в 2003 г. по инициативе замечательного ученого и выдающегося руководителя сибирской науки, академика Н. Л. Добрецова. Будучи председателем Президиума СО РАН, Добрецов предложил организовать в институте новый отдел – Центр новых медицинских технологий – и поручил развивать исследования в области фундаментальной медицины, планируя в будущем на базе этого отдела создать институт медицинского профиля. Однако «реформа» РАН в 2014 г. не дала этим планам осуществиться

в ряде приложений, в том числе в конструировании «нуклеиновых ферментов» – бинарных каталитических нуклеиновых кислот (*рибозимов* и *ДНКазимов*). Такие молекулы способны избирательно воздействовать на определенные РНК, например вирусные.

Не все разработанные сибирскими учеными реакционноспособные группы оказались востребованы для создания терапевтических препаратов, однако многие из них нашли применение в исследованиях пространственного строения нуклеиновых кислот и их комплексов с белками, а также для решения ряда других задач.

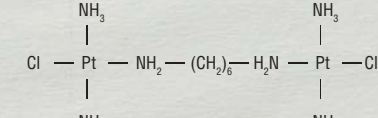
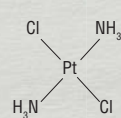
Что касается направленного воздействия на гены с помощью производных олигонуклеотидов, то эксперименты, проведенные на молекулах ДНК большой длины, доказали жизнеспособность идеи Гриневой. Было показано, что такие соединения действительно с высокой избирательностью взаимодействуют с комплементарными последовательностями в составе мишеней и могут их химически модифицировать в точно заданных участках.

Также была показана принципиальная возможность воздействовать с помощью производных олигонуклеотидов не только на одноцепочечную ДНК, но и на двуцепочечную, находящуюся в составе хромосом в клеточных ядрах. Оказалось, что в *хроматине* – нуклеопротеиде, составляющем основу хромосом, – в зависимости от функционального состояния клетки присутствуют активные «расплетенные» участки ДНК, которые доступны для модификации. Способность олигонуклеотидов связываться с двуцепочечной ДНК с образованием трехцепочечных комплексов открыла возможность направленной модификации и, соответственно, инактивации регуляторных участков онкогенов,



Фотоактивируемая группа, реагирующая с ДНК при облучении УФ-светом

Структура с двумя остатками имидазола, катализирующая расщепление РНК



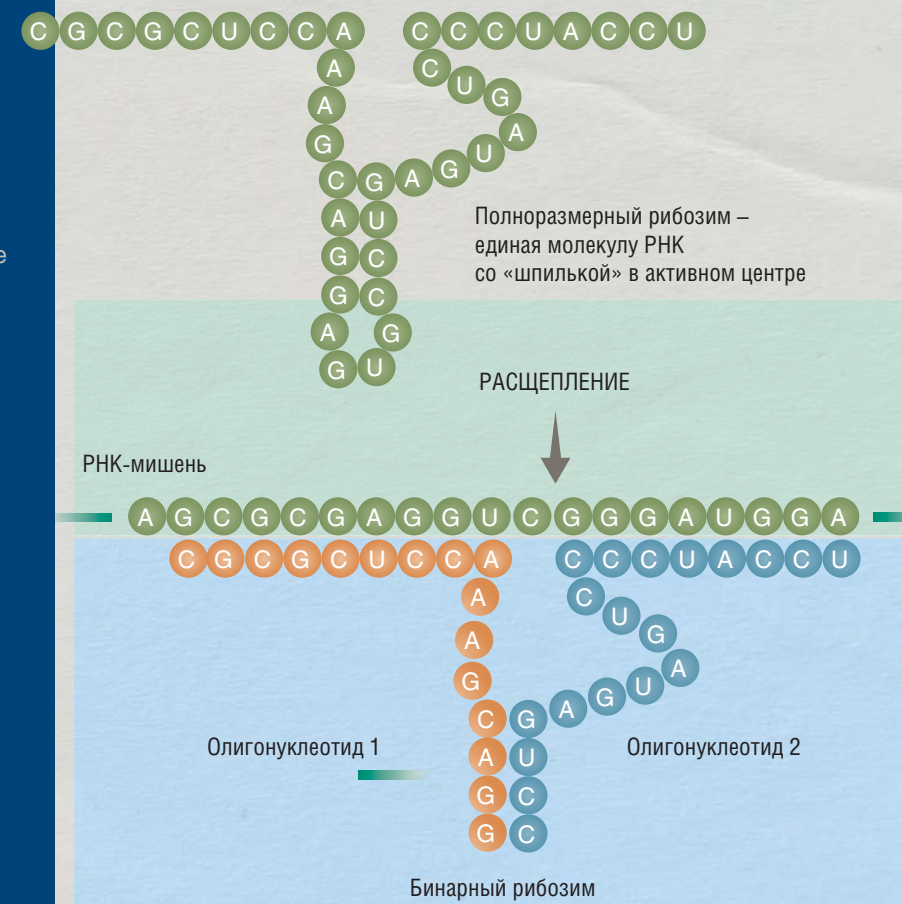
Моноядерные и биядерные платиновые комплексы, способные прочно связывать олигонуклеотид с ДНК за счет комплексообразования

Примеры различных реакционноспособных групп для производных олигонуклеотидов, разработанных в НИБХ АН СССР

ответственных за злокачественное перерождение клеток.

В биологических экспериментах впервые была показана возможность останавливать размножение вирусов в клетках и развитие вирусной инфекции у животных с помощью производных олигонуклеотидов, воздействующих на *матричную РНК*, кодирующую процесс синтеза белков. Опыты на мышах, зараженных вирусом клещевого энцефалита, проводились в лаборатории проф. В. В. Погодиной в московском Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова. При этом был получен неожиданный результат: противовирусное действие демонстрировали и некоторые «контрольные» олигонуклеотиды, которые не должны были взаимодействовать с вирусной РНК.

Рибозимы-олигонуклеотиды – природные катализаторы расщепления РНК. При связывании рибозима с комплементарной последовательностью РНК в нем с участием ионов металлов формируется структура, расщепляющая фосфодиэфирные связи в мишени. Бинарный рибозим, сконструированный А. Г. Веняминовой и М. А. Воробьевой, похож на известный природный молоточковый рибозим (*справа вверху*). В отличие от него, бинарный рибозим (*справа внизу*) представляет собой два отдельных олигонуклеотида, которые связываются с мишенью независимо друг от друга. Активный центр формируется только в том случае, если в мишени есть обе последовательности, связывающие олигонуклеотиды

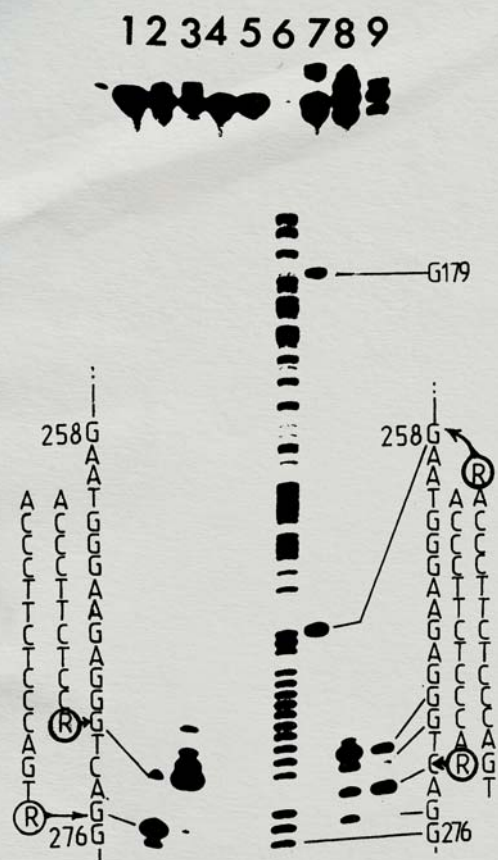


Полноразмерный рибозим – единая молекулу РНК со «шпилькой» в активном центре

РАСЦЕПЛЕНИЕ

Олигонуклеотид 1 Олигонуклеотид 2

Бинарный рибозим



Для оценки действия на ДНК олигонуклеотидов, несущих алкилирующие группы, использовался электрофорез. Одноцепочечная ДНК, меченая радиоактивным изотопом, под действием олигонуклеотидов расщеплялась по участкам реакции на фрагменты, которые анализировались. Слева и справа на электрофореграмме показаны последовательности анализируемой ДНК и позиции, которые должны были атаковать реагенты. Судя по результату, алкилирующие группы повредили ДНК именно там, где образуются ее комплементарные комплексы с олигонуклеотидным реагентом

К сожалению, объяснить механизм этого явления в то время не удалось. Позже выяснилось, что оно возникает за счет активации иммунной системы. Как установили американские исследователи, такой эффект связан с наличием CG-последовательностей в составе олигонуклеотидов. В наши дни олигонуклеотиды такого типа применяют при конструировании вакцин и для терапии опухолевых заболеваний.

Взлеты и падения

Публикации, посвященные биологическим эффектам олигонуклеотидов, вызвали огромный интерес специалистов. После симпозиума по проблемам применения

олигонуклеотидов, состоявшегося в 1988 г. в новосибирском Академгородке и на который собрались химики и биологи из самых известных зарубежных лабораторий, в работу по этой тематике активно включились ученые из США и Франции, а затем и других стран. Начались широкие исследования во всем мире.

В свое время новосибирские химики считали, что слово «олигонуклеотид» будет непонятным и не приживется, поэтому реагенты на основе олигонуклеотидов они предложили называть «комплементарно адресованными». Американцы, искусные изобретатели терминов, не испугались этого слова, быстро приучили к нему публику и стали называть терапевтические олигонуклеотиды *антисмысловыми*, а технологии работы с ними – *антисмысловыми технологиями*.

Такое странное, на первый взгляд, название появилось потому, что основными мишенями для олигонуклеотидов в то время были матричные РНК. Нуклеотидная последовательность конкретной мРНК кодирует последовательность определенного белка, и в этом смысле она является «смысловой». Соответственно, комплементарные этой последовательности олигонуклеотиды могут быть названы «антисмысловыми».

Идея антисмысловых технологий выглядела просто и красиво, ее можно было легко донести до представителей власти и бизнеса. За этим подходом вырисовывалось большое будущее, поскольку специфические препараты для защиты от различных вирусов или уничтожения раковых опухолей можно было быстро разработать и производить по универсальной технологии. Для этого требовалось только расшифровать структуру генов-мишеней, что в то время было уже вполне реальным делом.

В США и ведущих европейских странах были основаны десятки компаний, которые стали разрабатывать различные варианты олигонуклеотидных производных, направленных в первую очередь на вирусные РНК и специфические РНК опухолевых клеток. Журналы пестрели статьями, где описывались успешные эксперименты; на научных и медицинских конференциях представители фирм рассказывали о препаратах, готовых для клинических испытаний. Наступило время эйфории от успехов.

Большую роль в этом сыграли данные первых экспериментов по подавлению размножения *вируса иммунодефицита* (ВИЧ-1) в клетках человека. В то время со всей остротой встала проблема лечения СПИДа, и когда сотрудники американского Национального института рака С. Штайн и Д. Коэн сообщили о первых успешных результатах применения олигонуклеотидов для защиты клеток от ВИЧ-1, их лабораторию посетил тогдашний президент США Р. Рейган.

Правда, вскоре выяснилось, что противовирусный эффект был никак не связан со специфическим



Участники международного симпозиума 1988 г. в новосибирском Академгородке. Вверху – сотрудники НИБХ АН СССР М. А. Зенкова, Н. И. Гринева и Е. Л. Черноловская. Справа – исследователи биологических эффектов олигонуклеотидов: слева направо – К. Элен (Франция), Л. В. Юрченко, В. В. Власов, Л. А. Якубов и С. Штайн (США). Внизу – «главные химики» института Н. И. Гринева и В. Ф. Зарьтова



Международный симпозиум «Перспективы терапевтических и диагностических применений производных олигонуклеотидов» (1988 г.) стал первым в мире по этой тематике. В нем участвовали выдающиеся ученые, разрабатывавшие технологии синтеза производных олигонуклеотидов, создающие на их основе диагностические системы и изучающие возможности их применения в качестве лекарств. В последующие годы в новосибирском Академгородке состоялось еще несколько таких конференций

воздействием на нуклеиновые кислоты – это показал новосибирский биолог Л. А. Якубов, приехавший в лабораторию Штайна. Оказалось, что размножению ВИЧ-1 препятствуют олигонуклеотиды любой последовательности: они образуют комплексы с белками вируса и клеточной поверхности, что мешает патогену связаться с клеткой. Детально этот процесс был изучен впоследствии самим Якубовым совместно с сотрудниками ГНЦ ВБ «Вектор».

Несмотря на этот казус, казалось, что волшебные лекарства вскоре хлынут к страдающим пациентам. Однако, невзирая на интенсивную работу сотен исследовательских лабораторий и компаний, быстрой победы над болезнями не случилось. Слишком масштабны оказались задачи по синтезу пригодных для терапии олигонуклеотидов, слишком широкие биологические



Лаборатория биохимии нуклеиновых кислот НИБХ. Слева направо: сидят – С. Мамаев, С. А. Казаков, С. Гайдамаков, Е. Бросалина; стоят – В. В. Власов, А. Годовиков, С. Грачев, Т. Дзюба, Т. Л. Юрченко, Н. Д. Кобец, А. Райт, А. С. Буторин, Л. Стефанович. Фото сделано в конце 1980-х гг. Спустя несколько лет в лаборатории остались только заведующий В. В. Власов и лаборант Т. Дзюба

исследования требовалось провести, чтобы понять процессы, запускаемые ими в клетках.

Сенсационные сообщения появлялись все реже, энтузиазм инвесторов и академических начальников стал убывать. Маленькие фирмы сошли со сцены, и только крупные компании и академические лаборатории продолжили, уже без рекламной шумихи, систематические исследования, шаг за шагом развивая химию и биологию нуклеиновых кислот. Потребовались годы, чтобы накопить знания и разработать технологии, позволившие в конце концов подойти к созданию перспективных прототипов лекарств.

Затормозились работы и в Новосибирске. В стране началась «перестройка», сопровождавшаяся масштабными социальными и экономическими потрясениями. Институт оказался в тяжелом положении: возникли проблемы с финансированием, прекратились закупки современных приборов, реагентов... А ведь молекулярная биология очень быстро развивается: каждый год появляются новые технологии и инструментарий,

без которых просто невозможно работать на должном уровне.

Сотрудники института начали массово уезжать за рубеж, благо их хорошо знали в ведущих лабораториях мира и приглашали на высокооплачиваемые должности в известных научных центрах.

Но несмотря на все трудности, работа продолжалась. В институт активно шла молодежь из НГУ. В тяжелые 1990-е гг. имелось важное подспорье – Соросовская образовательная программа в области точных наук, созданная благодаря советскому и американскому ученому В. Н. Соيفеру, почетному профессору СО РАН.

Эта программа оказала существенную помощь российским ученым, педагогам и студентам. Так, в НИБХ каждый третий студент и каждый второй аспирант получали соросовскую стипендию. Практически все сотрудники кафедры молекулярной биологии НГУ также были соросовскими стипендиатами, что вполне закономерно: уровень работ сибирских ученых всегда был высок, и они были основоположниками новейшего

В трудный «перестроечный» период Новосибирскому институту биорганической химии очень помогли друзья из Франции – профессор М. Грюнберг-Манаго, которая в то время была президентом Французской академии наук, и нобелевский лауреат по химии Ж.-М. Лен и его сотрудники. Большую помощь оказали профессора Р. Жьеже и И. Буланже из Института молекулярной и клеточной биологии в Страсбурге, созданного другом нашей страны, профессором Ж.-П. Эбелем.

Благодаря поддержке друзей новосибирские ученые получали крупные зарубежные гранты, приезжали работать во Францию, где им предоставляли необходимое оборудование и материалы. Очень полезным было и сотрудничество с учеными из Германии: профессорами М. Шпринцлем из Байройтского университета, Г. Гроссом из Вюрцбургского университета и Г. Закиелем из Университета Любека

Французские коллеги.

Слева направо: биохимик М. Грюнберг-Манаго, президент Французской академии наук в 1995–1996 гг.; профессора Р. Жьеже и И. Буланже (Страсбург)



В. В. Власов и Нобелевский лауреат Ж.-М. Лен, директор Института супрамолекулярной науки и инженерии (Страсбург)

направления в молекулярной биологии и биотехнологии, стремительно развивавшегося в то время.

Как проникнуть в клетку

Природные олигонуклеотиды по своим свойствам не идеальны с точки зрения фармацевта. В крови они быстро разрушаются ферментами, есть проблемы и с их способностью проникать в клетки – важнейшей характеристикой терапевтических препаратов. Исправить ситуацию можно путем модификации структуры олигонуклеотидов и разработки специальных носителей.





Профессор В. Н. Соيفер, организатор Соросовской образовательной программы в области точных наук

Чтобы защитить олигонуклеотиды от ферментов, начали присоединять специальные группы к их концевым участкам и вводить в их структуру не природные аналоги нуклеотидов.

Что касается взаимодействия олигонуклеотидов с клетками, то известно, что сами эти соединения несут высокий отрицательный заряд и не могут самостоятельно проникнуть через состоящую из слоев липидных молекул клеточную мембрану, поверхность которой также имеет отрицательный заряд. Однако эксперименты сотрудников института показали, что олигонуклеотиды все же каким-то образом проникают в клетки и в клеточные ядра млекопитающих, хотя процесс этот не столь эффективен, как хотелось бы медикам.

Оказалось, что в этом олигонуклеотидам помогают специальные белки на поверхности клеток, которые их захватывают и переносят внутрь. А при высоких концентрациях в среде олигонуклеотиды могут попадать в клетку по механизму *эндоцитоза* (путем образования мембранных пузырьков-везикул) вместе с небольшими объемами окружающей жидкости.

Новосибирские исследователи изучили распределение олигонуклеотидов в организме при различных способах введения: в виде глазных капель, внутримышечно, внутривенно и др. Было установлено, что их можно вводить напрямую через кожу с помощью техники *ионофореза* – популярной аппаратной процедуры, обеспечивающей миграцию заряженных ионов через кожный барьер. Были идентифицированы и белки, с которыми олигонуклеотиды связываются при попадании в кровь.

Для повышения способности олигонуклеотидов попадать внутрь клетки было разработано несколько

подходов. Один из них состоял в присоединении к олигонуклеотидам *липофильных группировок*, которые могут внедряться в липидные структуры клеточной стенки. Самой лучшей из них оказался *холестерин*: его присоединение к разным молекулам до сих пор является непревзойденной по эффективности модификацией для проникновения в клетку.

Еще один подход был основан на использовании для транспортировки олигонуклеотидов мембранных носителей-везикул, способных сливаться с клетками. Их простейшим вариантом являются *липосомы*, микроскопические сферические водно-липидные структуры.

Были предложены и более сложные носители – на основе липидной оболочки *вируса Сендай* и так называемых *тений эритроцитов*, представляющих собой мембранные оболочки этих клеток крови. Впоследствии в лаборатории биохимии нуклеиновых кислот института разработали методы доставки олигонуклеотидов в клетки с использованием *экзосом* – природных микроскопических внеклеточных везикул, а также искусственных везикул, полученных из клеточных мембран.

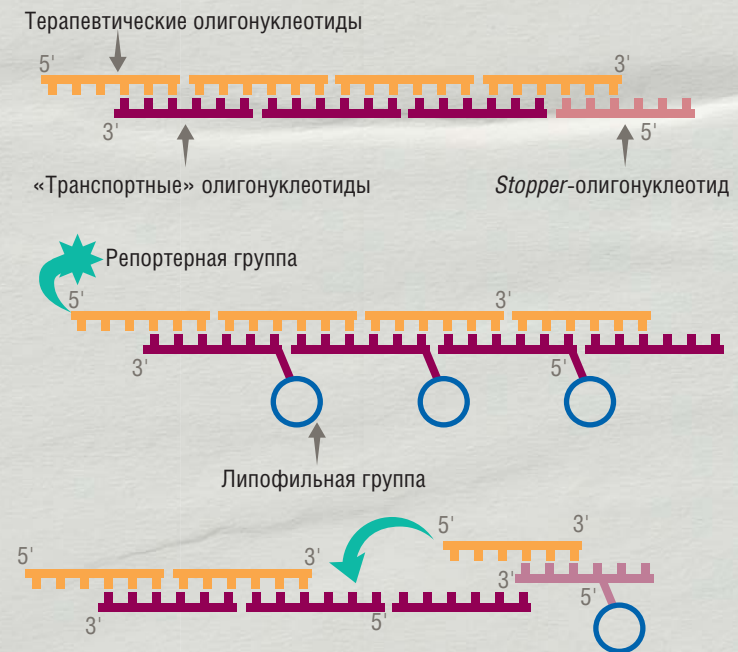
В качестве носителей для доставки олигонуклеотидов в клетки были опробованы и положительно заряженные полимерные структуры, способные адсорбировать олигонуклеотиды. Для этих целей были синтезированы носители на основе *полиэтиленimina*, с которыми олигонуклеотиды связывались за счет электростатических взаимодействий. А встроенные в носители остатки холестерина помогали таким комплексам проникать через клеточные мембраны.

Позднее был разработан способ доставки олигонуклеотидов в клетки, основанный на формировании ими *супрамолекулярных* (представляющих ансамбль молекул) или *конкатемерных* (состоящих из последовательно соединенных копий) структур.

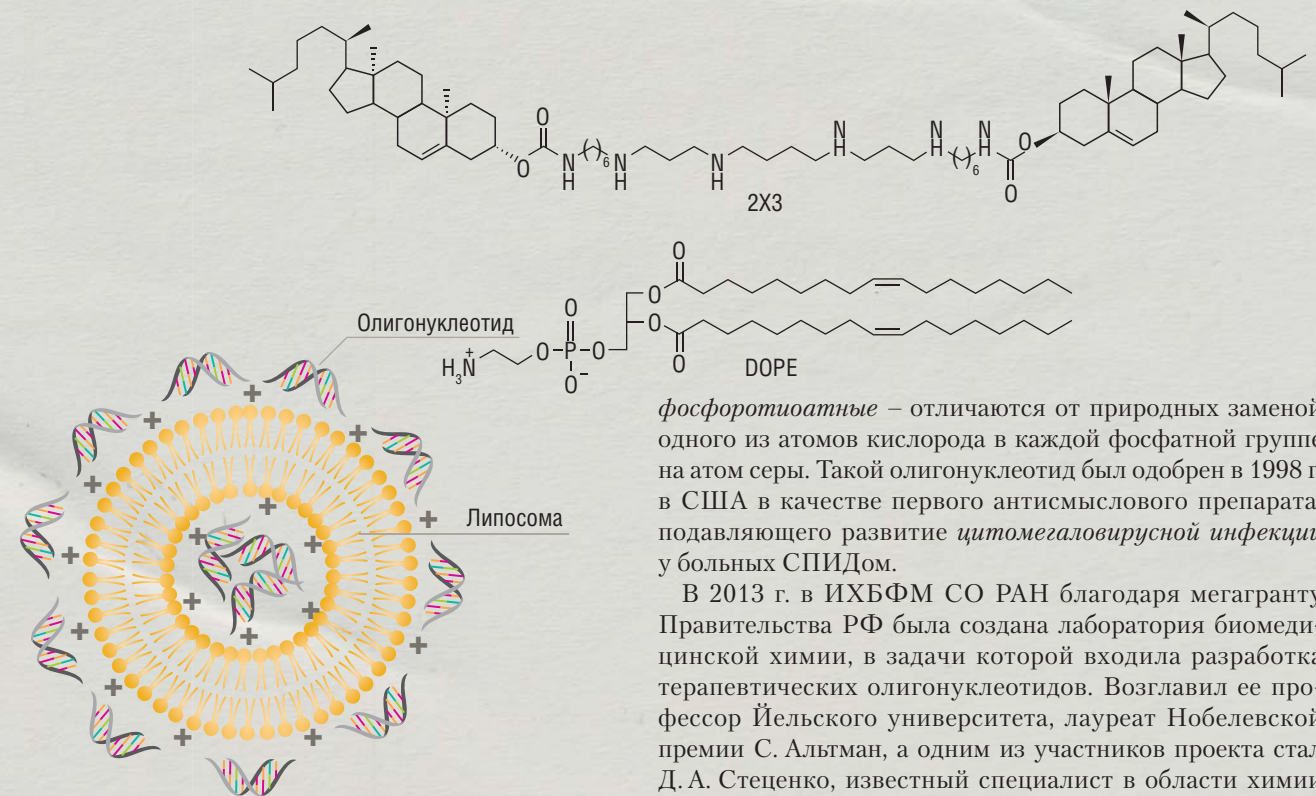
Сегодня наиболее популярен способ доставки олигонуклеотидов в клетки с помощью *катионных* (положительно заряженных) липидов. Растворяясь в воде, такие липиды образуют положительно заряженные липосомы, которые формируют комплексы с ДНК или РНК. Сотрудники института совместно со специалистами Московского института тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова получили катионные липиды, обеспечивающие рекордную по эффективности доставку в клетку любых РНК- и ДНК-олигонуклеотидов. Некоторые из них уже показали высокую результативность в испытаниях на животных.

Новые «пули» и новые мишени

Исследователям удалось улучшить свойства олигонуклеотидов путем введения в их структуру различных модификаций. Первые, наиболее известные модифицированные аналоги олигонуклеотидов –



Комплекс для доставки олигонуклеотидов в клетки на основе положительно заряженной липосомы, состоящей из катионного липида 2X3 и липида-помощника DOPE (внизу)



фосфоротиоатные – отличаются от природных заменой одного из атомов кислорода в каждой фосфатной группе на атом серы. Такой олигонуклеотид был одобрен в 1998 г. в США в качестве первого антисмыслового препарата, подавляющего развитие *цитомегаловирусной инфекции* у больных СПИДом.

В 2013 г. в ИХБФМ СО РАН благодаря мегагранту Правительства РФ была создана лаборатория биомедицинской химии, в задачи которой входила разработка терапевтических олигонуклеотидов. Возглавил ее профессор Йельского университета, лауреат Нобелевской премии С. Альтман, а одним из участников проекта стал Д. А. Стеценко, известный специалист в области химии нуклеиновых кислот.

Конкатемерные комплексы для доставки олигонуклеотидов в клетки состоят из двух цепей ДНК (слева). Одна из них – биологически активные олигонуклеотиды, комплементарная цепь – транспортер. Вторая цепь включает в себя *stopper*-олигонуклеотиды, регулирующие размер комплекса. В состав транспортеров могут входить остатки холестерина, способствующие транспорту конструкции в клетку. Протяженные олигонуклеотидные наноконтакты активнее проникают в клетки благодаря повышенному сродству к фосфолипидным мембранам. А присоединение холестеринных группировок к транспортеру позволяет сохранить высокую биологическую активность терапевтической молекулы.

a – немодифицированный конкатемер;
 б – конкатемер, содержащий на одной цепи репортерную флуоресцентную группу, на другой – липофильные холестеринные группы;
 в – немодифицированный конкатемер, гибридный с липофильно-модифицированным *stopper*-олигонуклеотидом



Руководитель лаборатории биомедицинской химии, лауреат Нобелевской премии по химии 1989 г., профессор Йельского университета С. Альтман

В этой лаборатории были разработаны принципиально новые аналоги олигонуклеотидов, отличающиеся от природных соединений модификацией на атоме фосфора, расположенном между двумя нуклеотидами. Платформа, разработанная для создания таких аналогов, позволяла получать широкий спектр олигонуклеотидов с модификациями в любых выбранных положениях. Таким образом появилась возможность создавать либо электронейтральные, полностью модифицированные *фосфорилгуанидиновые* производные, либо частично модифицированные, со сниженным отрицательным зарядом.

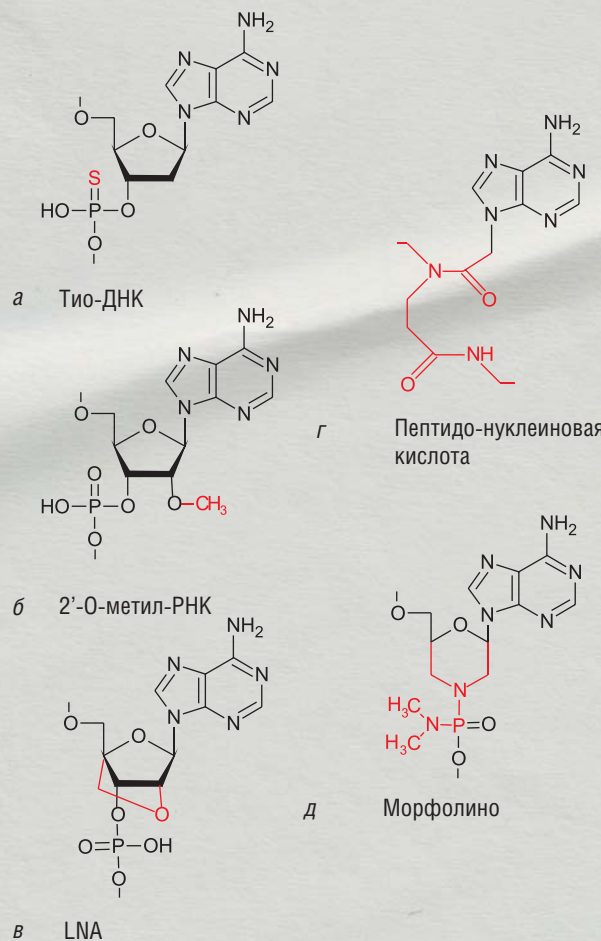
Новые аналоги отличались рекордной устойчивостью в биологических средах и хорошо связывались с РНК- и ДНК-мишенями в широком диапазоне условий. Благодаря спектру уникальных свойств их можно было использовать для создания терапевтических агентов.

Стартап при ИХБФМ СО РАН – компания «Нюо-Ген» – разработала и запатентовала удобную технологию получения фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов. Американской компании *Wave Life Sciences*, которая приобрела лицензию на эту технологию, удалось синтезировать ряд перспективных терапевтических препаратов, в настоящее время проходящих клинические испытания.

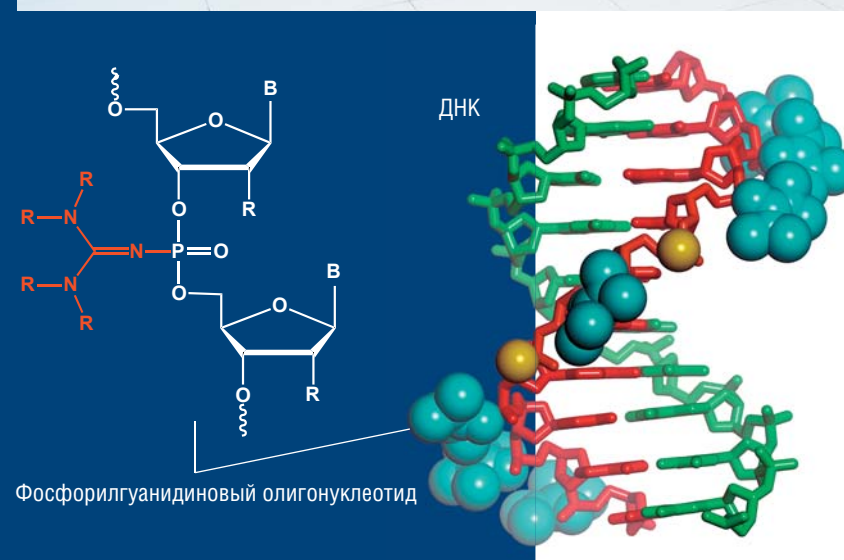
Вслед за фосфорилгуанидиновыми аналогами в институте были разработаны *сульфонамидофосфаты* и *триазинил-амидофосфаты* олигонуклеотидов, также перспективные для создания лекарственных средств.

Наиболее известные из модифицированных аналогов олигонуклеотидов:

- а* – фосфоротиоатные олигонуклеотиды, отличающиеся от природных заменой одного из атомов кислорода в каждой фосфатной группе на атом серы. Эта модификация, синтезированная американским ученым М. Карузерсом, до сих пор является одной из наиболее востребованных в мире;
- б* – олигонуклеотиды, содержащие 2'-модифицированные остатки рибозы, в которых гидроксильная группа чаще всего метилирована или метоксиэтилирована либо заменена на атом фтора;
- в* – LNA-олигонуклеотиды, разработанные в датской компании «Эксикон» бывшим сотрудником ИХБФМ СО РАН А. Кошкиным; их структура стабилизирована 2'-О,4'-С-метиленовым или этиленовым мостиком;
- г* – пептидо-нуклеиновые олигонуклеотиды, в которых сахарофосфатный остов заменен полиамидным;
- д* – морфолиновые олигонуклеотиды, разработанные американским ученым Дж. Саммертоном, в которых азотистые основания связаны со скелетом, состоящим из остатков гетероциклического соединения морфолина



Коллектив лаборатории С. Альтмана. Первый слева – канд. хим. наук Д. С. Стеценко, четвертый – канд. хим. наук М. С. Купрюшкин



В ИХБФМ СО РАН были впервые в мире синтезированы фосфорилгуанидиновые производные олигонуклеотидов. Комплементарный комплекс ДНК-мишени с таким олигонуклеотидом оказался почти таким же устойчивым, как и природная спираль ДНК

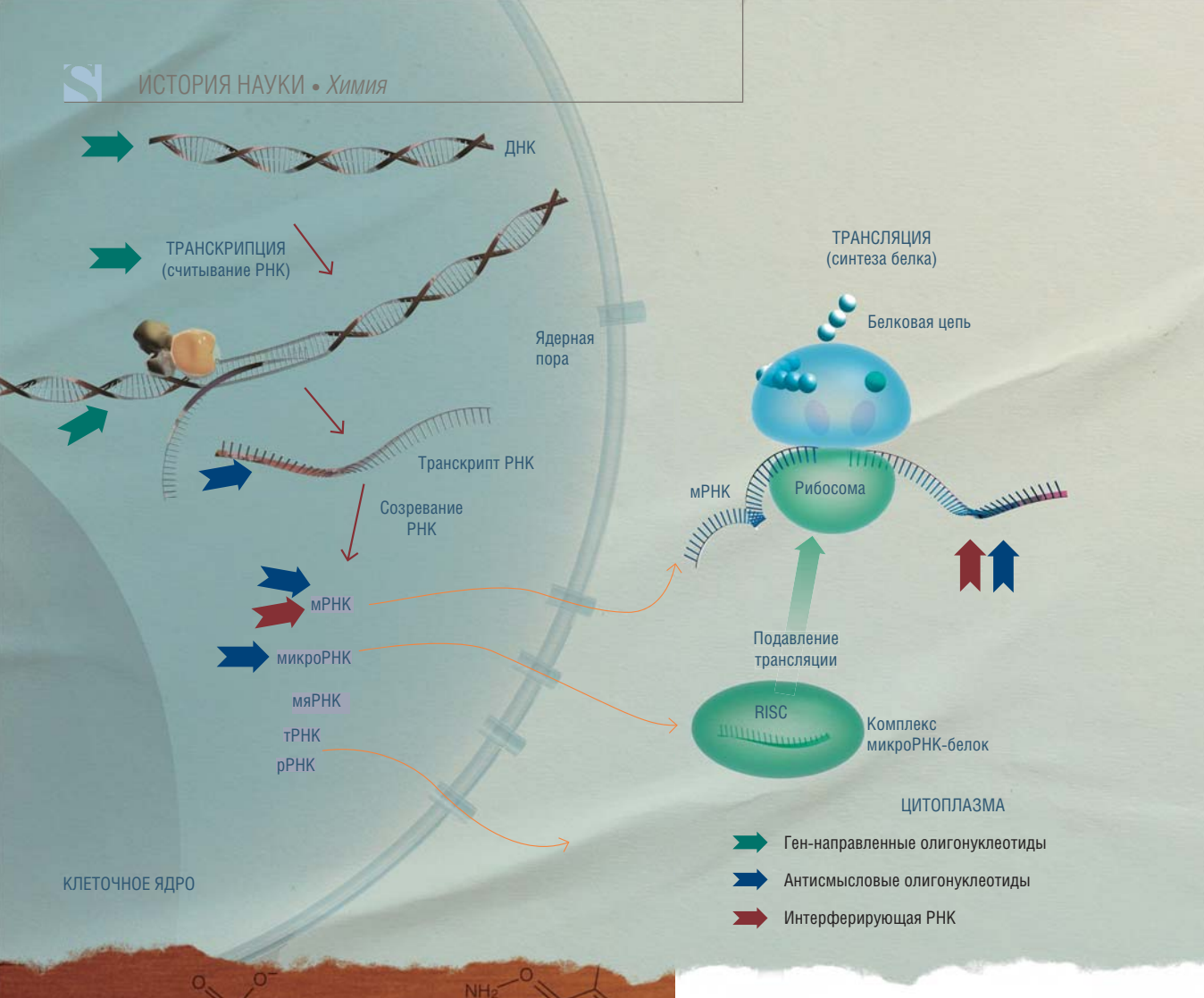
Высокий терапевтический потенциал этих аналогов антисмысловых олигонуклеотидов был продемонстрирован как на культурах опухолевых клеток, так и на уровне организма – на опухолях у лабораторных животных.

В лаборатории химии нуклеиновых кислот, руководимой М. С. Купрюшкиным, где в настоящее время разрабатываются новые аналоги олигонуклеотидов, показано, что они представляют интерес не только как потенциальные лекарства. Эти соединения можно использовать и как компоненты диагностических систем, основанных на применении *полимеразной цепной реакции* (ПЦР).

Учимся у природы

Работы по изучению биологической активности олигонуклеотидов, которые интенсивно велись в ведущих научных центрах мира, показали, что они могут регулировать работу генов на различных уровнях их экспрессии: *транскрипции* (синтезе РНК на ДНК-матрицах), *сплайсинге* («созревании» РНК) и *трансляции* (синтезе белка на матрице РНК).

Исследования биологов привели к открытию природных систем направленного воздействия на нуклеиновые кислоты, где направляющую роль выполняют олигонуклеотиды, аналогичные придуманным Н. И. Гриневой



Регуляция функционирования генов под действием олигонуклеотидов возможна на разных уровнях – как в ядре, так и в цитоплазме клетки. Молекулярными мишенями «антисмысловых» олигонуклеотидов в клетке могут быть как традиционная мишень – мРНК (подавление трансляции), так и все виды некодирующих РНК

Эту трудную задачу удалось решить в лаборатории А. Г. Веняминой, которая работала с Гриневой с самого начала олигонуклеотидного проекта. Химия РНК гораздо сложнее, чем химия ДНК, но рибоолигонуклеотиды, способные активировать клеточные процессы, ведущие к инактивации РНК, открыли совершенно новые возможности создания терапевтических препаратов. Первая российская работа, посвященная ингибированию гена *множественной лекарственной устойчивости* (MDR1) с помощью interfering РНК, была опубликована в 2002 г.

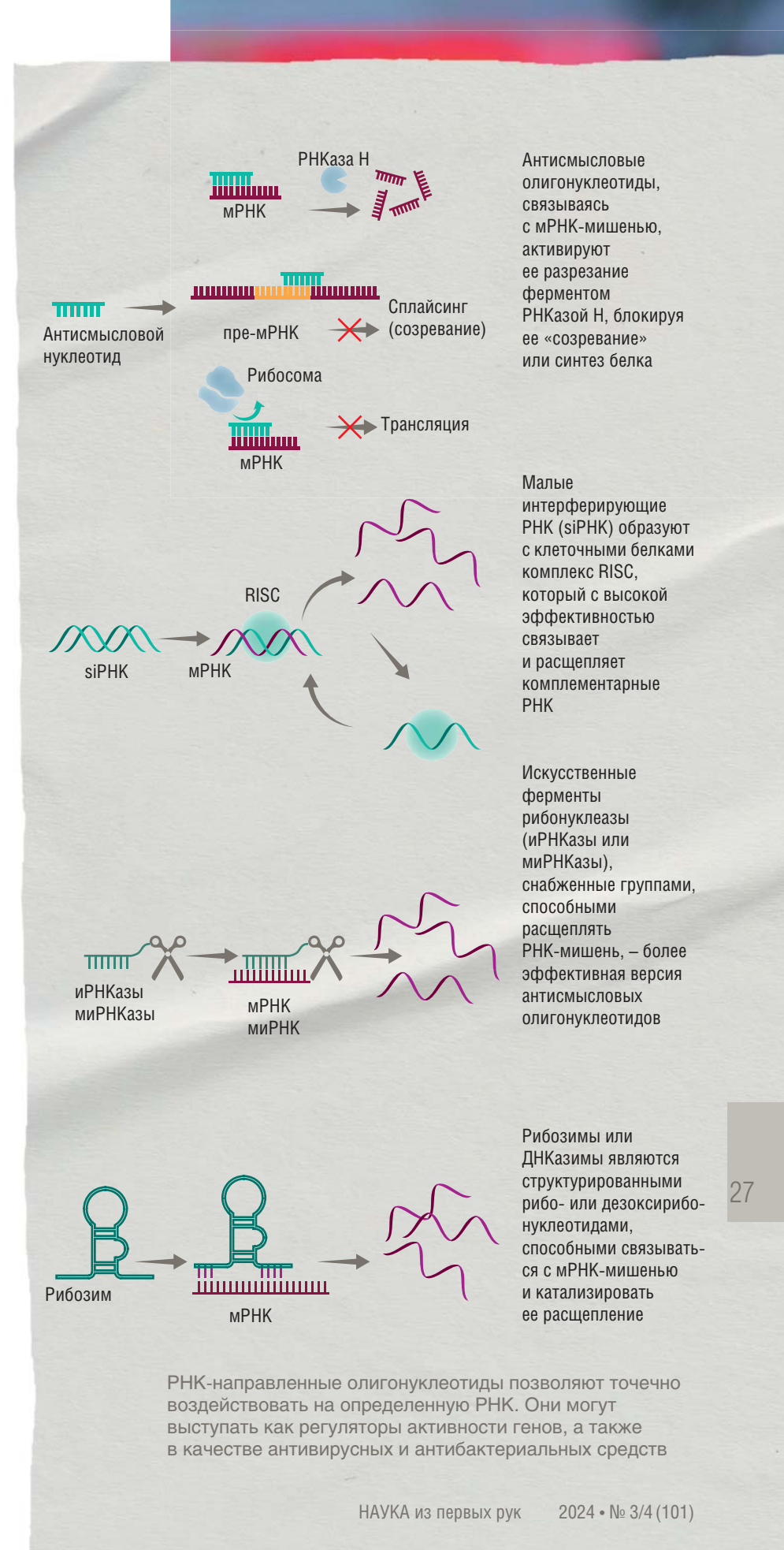
Исследования последних лет показали, что олигонуклеотиды могут вызывать биологические эффекты не только за счет взаимодействия с нуклеиновыми кислотами – они могут избирательно действовать и на белки.

Создание методов молекулярной селекции и молекулярной эволюции открыло возможность получения *аптамеров* – структурированных олигонуклеотидов, обладающих способностью, подобно антителам, избирательно связываться с самыми различными молекулами, имеющими характерную пространственную структуру, – с небольшими органическими молекулами и с белками. Такие олигонуклеотиды могут применяться для создания препаратов, подавляющих функции определенных белков, а также аналитических систем.

В лаборатории химии РНК института были созданы устойчивые в биологических средах фторсодержащие РНК-аптамеры, способные связываться с рядом белков, ответственных за развитие заболеваний. Среди этих белков – *цитокины* IL-17 и TNFalfa, отвечающие за развитие воспалительных реакций, а также патогенные *антитела*, циркулирующие в крови больных *рассеянным склерозом*. Созданный специалистами института аптамер к TNFalfa уже продемонстрировал способность предотвращать острое повреждение легких у мышей, вызванное *бактериальным эндотоксином*.

Аптамеры находят применение и для создания аналитических систем. Так, сотрудники лаборатории химии РНК совместно со специалистами Института биофизики СО РАН разработали *биосенсоры* на основе бифункциональных аптамеров, генерирующие световой сигнал при связывании с определенными белками.

Двухцепочечные РНК и ДНК, содержащие определенные последовательности, могут взаимодействовать с рецепторами на поверхности и в цитоплазме клеток (*паттерн-распознающие рецепторы*, или PRRs), за счет чего в клетках запускаются процессы синтеза белков, активирующих иммунную систему. Специалисты института идентифицировали короткие двухцепочечные



Антисмысловые олигонуклеотиды, связываясь с мРНК-мишенью, активируют ее разрезание ферментом РНКазой H, блокируя ее «созревание» или синтез белка

Малые интерферирующие РНК (siРНК) образуют с клеточными белками комплекс RISC, который с высокой эффективностью связывает и расщепляет комплементарные РНК

Искусственные ферменты рибонуклеазы (иРНКазы или миРНКазы), снабженные группами, способными расщеплять РНК-мишень, – более эффективная версия антисмысловых олигонуклеотидов

Рибозимы или ДНКазимы являются структурированными рибо- или дезоксирибонуклеотидами, способными связываться с мРНК-мишенью и катализировать ее расщепление

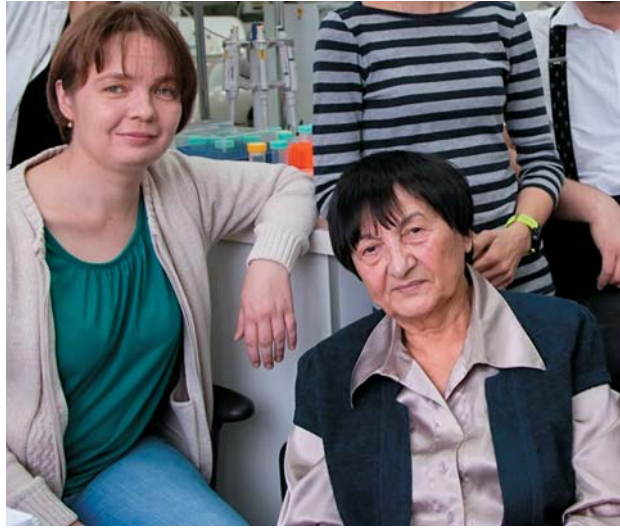
РНК-направленные олигонуклеотиды позволяют точно воздействовать на определенную РНК. Они могут выступать как регуляторы активности генов, а также в качестве антивирусных и антибактериальных средств

адресованным реагентам. Разница в том, что в таких системах сами олигонуклеотиды не содержат реакционноспособных групп, а мобилизуют для воздействия на мишень специфические ферменты.

Было обнаружено, что в клетках имеется фермент *РНКазы H*, который расщепляет цепь РНК в комплексах РНК и ДНК. Поэтому попавшие в клетки РНК-олигонуклеотиды приводят к разрушению молекул РНК, содержащих комплементарные им последовательности.

Оказалось, что избирательное расщепление определенных РНК в клетках может осуществляться по механизму *РНК-интерференции*, в котором роль адресующих структур играют *малые интерферирующие РНК*. Они представляют собой комплексы РНК-олигонуклеотидов, одна из цепей которых (*антисмысловая*) комплементарна определенному участку целевой РНК. При связывании олигонуклеотида с РНК-мишенью специфический белок атакует мРНК и расщепляет ее.

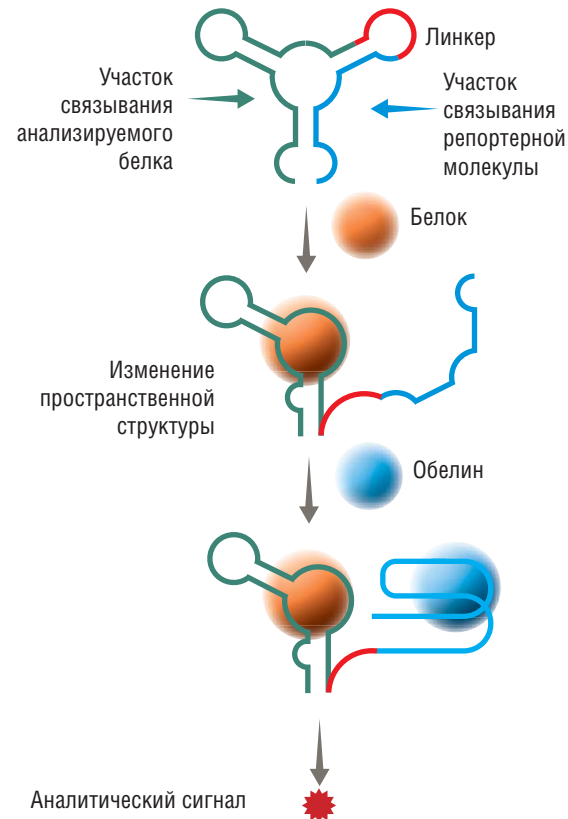
ИХБФМ СО РАН первым в стране включился в исследования в этой области, поскольку в институте были разработаны эффективные методы синтеза РНК-олигонуклеотидов и их аналогов.



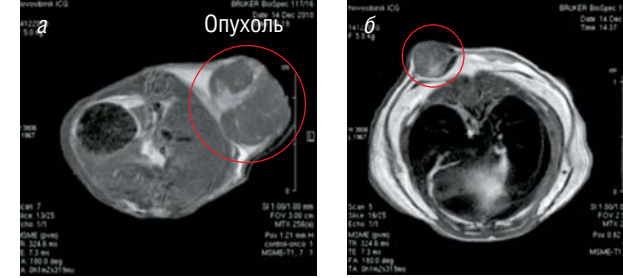
Конструкторы аптамеров и терапевтических РНК – М.А. Воробьева и А.Г. Веньямина

РНК, которые стимулируют в организме производство иммунного белка *интерферона*. Такие *иммуностимулирующие РНК* (исРНК) ингибируют рост опухолевых клеток. В опытах на лабораторных животных они препятствовали росту и метастазированию *рака печени* и *меланомы*, а также размножению *вируса гриппа* в легких инфицированных мышей.

Участники проекта по разработке терапевтических нуклеотидов: Д.В. Пышный, С. Альтман, М.А. Зенкова, Н.В. Тикунова



Бифункциональный аптамер, объединяющий в одной молекуле модули для связывания целевой молекулы и белка-репортера, обеспечивающего аналитический сигнал. Работоспособность такой системы показана на примере детекции гемоглобина при помощи репортерного светящегося белка обелина



Новый терапевтический агент на основе двуцепочечной ДНК – иммуностимулирующая ДНК (исДНК), обладающая противоопухолевым, антиметастатическим и противовирусным действием. В опытах на мышах с меланомой В16 инъекции имРНК вместе с усиливающим ее действие новым катионным липидом 2X3:DOPE привели к регрессии первичной раковой опухоли. Слева – томограммы контрольной мыши (а) и особи, получавшей экспериментальное лечение (б)

Пионерные исследования ученых Новосибирского института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН позволили разработать принципы создания широкого спектра терапевтических препаратов, совершивших революцию в фармацевтической промышленности.

Сегодня ведущие компании мира предлагают множество новых препаратов на основе олигонуклеотидов. Наиболее известные из них – *инклизиран*, регулирующий в крови уровень холестерина и липопротеинов низкой плотности и используемый для терапии больных с тяжелой *гиперлипидемией*, а также *спинраза* – первый препарат для лечения *спинальной мышечной атрофии*, такой, к примеру, как генетически обусловленная прогрессирующая *мышечная дистрофия Дюшенна*, проявляющаяся в первые годы жизни.

Активно ведутся исследования, направленные на создание терапевтических систем геномного редактирования. Аптамеры, способные специфически связываться с молекулярными «мишенями», применяются для адресной доставки терапевтических препаратов в определенные клетки.

Пока не оправдались надежды разработать на основе олигонуклеотидов препараты для лечения быстро развивающихся инфекций, вызванных вирусами гриппа, коронавирусами и др. Проблема здесь в том, что эти патогены размножаются в организме стремительно, и к моменту постановки диагноза применять подобные препараты уже поздно – к этому времени практически все чувствительные к вирусу клетки оказываются зараженными.

Однако для инфекций, вызываемых медленно размножающимися вирусами, создание эффективных лекарств на основе олигонуклеотидов возможно. И такие лекарства позволят радикально решить проблему лечения больных ВИЧ, *гепатитом В*, *герпесом* и другими вирусными инфекциями, при которых возбудитель встраивает свой геном в геном клеток.

Химиков ждет множество интересных проектов. До сих пор не вполне решена задача доставки олигонуклеотидных препаратов в «нужные» клетки; несомненно, также можно улучшить терапевтические свойства олигонуклеотидов путем совершенствования их структуры.

Небывалые возможности открываются и в связи с разработкой технологий предсказания структуры белков и нуклеиновых кислот. Вскоре станет возможным использовать при создании биофармацевтических препаратов не только природные структуры наподобие систем генетического редактирования, но и олигонуклеотиды, вооруженные искусственными каталитическими группами, созданными путем рационального синтеза.

Наступает эра синтетической биологии. Именно о таком уровне развития науки и технологии мечтали первопроходцы антисмысловых технологий Кнорре и Гринева. Ученые Института химической биологии и фундаментальной медицины сегодня вооружены знаниями и техникой несравненно более высокого уровня по сравнению с тем, что было доступно им в начале пути. И сегодня они делают эти мечты былью.



Терапевтические препараты, созданные на основе олигонуклеотидов

В публикации использованы фотографии из архива авторов и ИХБФМ СО РАН