

Информация о выполнении проекта по Соглашению с Минобрнауки России о предоставлении субсидии № 14.604.21.0018 от 17.06.2014 за 1-й этап работ

Наименование организации - Получателя субсидии:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН).

В ходе выполнения проекта по Соглашению о предоставлении субсидии от 17.06.2014 № 14.604.21.0018 с Минобрнауки России в рамках Федеральной целевой программы "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы" **на этапе №1 выполнены следующие работы:**

1. Написан аналитический обзор научных и информационных источников по исследованию классов ингибиторов ферментов репарации ДНК PARP1/2 и Tdp1.
2. Осуществлен выбор направлений исследований и проведены предварительные эксперименты, в том числе выделены рекомбинантные PARP1 и Tdp1, экспрессированные в клетках E.coli, PARP2, экспрессированная в клетках насекомых, рекомбинантные ферменты процесса ЭПО - ДНК-полимераза β и апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1, экспрессированные в клетках E.coli.
3. Составлен план экспериментальных исследований по определению ингибиторной активности экспериментальных образцов соединений в отношении PARP1/2 и Tdp1.
4. Созданы библиотеки классов природных и синтетических соединений, ранее неизученных в качестве потенциальных ингибиторов ферментов репарации ДНК.
5. Проведен компьютерный скрининг библиотек потенциальных ингибиторов. для отбора структур химических соединений, взаимодействующих с Tdp1 и PARP1/2 с использованием полноатомных моделей ферментов и технологии молекулярного докинга с последующей структурной фильтрацией результатов.
6. Проведено обоснование выбора классов соединений – потенциальных ингибиторов.
7. Разработаны методы синтеза потенциальных ингибиторов и оформлены лабораторные методики синтеза новых соединений - потенциальных ингибиторов PARP1/2 и Tdp1.
8. Проведено экспериментальное изучение влияния 7-метилгуанина на пролиферацию опухолевых клеток как в виде монопрепарата, так и в комбинации с препаратами, используемыми в клинической практике для противоопухолевой терапии.
9. Разработан флуоресцентный метод определения активности APE1 и оформлена методика.
10. Проведены патентные исследования с учетом требований ГОСТ 15.011-96.
11. Проведена экспертная оценка возможности создания лекарственных средств на основе исследуемых ингибиторов ферментов репарации ДНК.
12. Разработана и оформлена методика определения ингибиторных характеристик соединений в отношении очищенного фермента Tdp1.
13. Осуществлен выбор модельных линий перевиваемых клеток для проверки соединений как сенситизаторов.

При этом были получены следующие результаты:

- 1) Оформлен аналитический обзор научных и информационных источников по исследованию классов ингибиторов ферментов репарации ДНК PARP1/2 и Tdp1.
- 2) Проведены предварительные эксперименты, в том числе:
 - выделены рекомбинантные PARP1 (1,4 мг), Tdp1 (4,8 мг) и PARP2 (3.1 мг). Чистота препаратов ферментов составляет 95%;
 - выделены рекомбинантные ДНК-полимераза β (10,8 мг) и апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 (12.8 мг). Чистота препаратов ферментов составляет 95%;
 - проведено предварительное определение ингибиторных характеристик производных бензо[1,2,3,4,5] пентатиепина по отношению к Tdp1. Обнаружены ингибиторы в микромолярном диапазоне, обнаружена зависимость ингибиторной активности от структуры и липофильности соединения.

Значение IC_{50} для соединения – лидера (дибутиламинового производное, рис. 1) составляет 0,22 μ M, это соединение является одним из наиболее эффективных ингибиторов этого фермента из известных на сегодняшний день.

- проведено предварительное изучение влияния обнаруженных ингибиторов Tdp1 - производных бензо[1,2,3,4,5]пентатиопина на культуры опухолевых клеток. Обнаружена умеренная цитотоксичность веществ этого класса.

3) Составлен план экспериментальных исследований

4) Созданы компьютерные библиотеки классов природных и синтетических соединений - производных усниновой и бетулоновой кислот и адамантана - для проведения скрининга потенциальных ингибиторов ферментов репарации ДНК.

5) Проведен компьютерный скрининг библиотек соединений, ряд производных усниновой кислоты и адамантана рекомендован к синтезу.

6) Проведено обоснование выбора классов соединений

7) Разработаны методы синтеза рекомендованных соединений.

8) Проведено экспериментальное изучение влияния 7-метилгуанина на пролиферацию опухолевых клеток. Показано, что 7-метилгуанин в концентрации 150 μ M не токсичен сам по себе, но усиливает цитостатическое действие цисплатина на опухолевые клетки. Таким образом, 7-метилгуанин способен усиливать эффективность существующих химиопрепаратов в случае комбинированного использования.

9) Разработана и оформлена методика определения активности APE1 флуоресцентным методом.

10) Проведены патентные исследования

11) Проведена экспертная оценка возможности создания лекарственных средств на основе исследуемых ингибиторов ферментов репарации ДНК

12) Разработана методика определения ингибиторных характеристик соединений в отношении очищенного фермента Tdp1, основанная на использовании флуоресцентного олигонуклеотида. Методика предназначена для скрининга библиотек соединений в формате реального времени.

13) Проведен выбор модельных линий перевиваемых клеток для проверки соединений как сенсibilизаторов клеток к действию известных противораковых препаратов.

Оценка элементов новизны научных (технологических) решений, применявшихся методик и решений.

Полученные результаты соответствуют мировому уровню исследований и разработок в области разработки ингибиторов ферментов репарации ДНК. Производные бензо[1,2,3,4,5]пентатиопина изучены в качестве ингибиторов Tdp1 впервые в мире. 7-Метилгуанин впервые использован как сенсibilизатор опухолевых клеток к действию химиопрепаратов и является перспективным кандидатом для разработки клинических сенсibilизаторов. Разработанные биосенсоры на основе ДНК могут быть адаптированы для скрининга уровня активности соответствующего фермента у пациентов для составления прогноза об эффективности лечения и выбора тактики лечения

Информация о полученных на отчетном этапе охраноспособных РИД:

В ходе выполнения 1-го Этапа проекта получен 1 Результат интеллектуальной деятельности:

- Изобретение заявка № 2014139787 от 30.10.2014 «Средство для ингибирования фермента тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1», РФ.

Полученные результаты полностью соответствуют требованиям Технического задания.