

- (21) Paraiškos numeris: **2017 523** (51) Int. Cl. (2019.01): **C07H 19/00**
C07H 21/00
(22) Paraiškos padavimo data: **2017-09-12** **C12Q 1/00**
C12N 15/00
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2019-03-25**
(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
(30) Prioritetas: —
(71) Pareiškėjas:
Vilniaus Universitetas, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, LT
(72) Išradėjas:
Rolandas MEŠKYS, LT
Jevgenija JAKUBOVSKA, LT
Daiva TAURAITĖ, LT
(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Jurga PETNIŪNAITĖ, AAA Law, A. Goštauto g. 40B, Verslo centras „Dvyniai”,
LT-03163 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
N⁴-modifikuoti citidino nukleotidai ir jų panaudojimas

- (57) Referatas:
Šis išradimas aprašo N⁴-padėtyje modifikuotus citidino nukleotidus. Pateikiama N⁴-modifikuotų citidino trifosfatų cheminė sintezė ir aprašomi modifikuotų citidino nukleotidų panaudojimo metodai, o taip pat ir čia pateiktų citidino analogų pritaikymas modifikuotų nukleorūgščių sintezei. Nukleorūgštys gali būti sudarytos iš DNR, RNR ar DNR/RNR kombinacijos. Viena iš modifikuotų citidino nukleotidų panaudojimo sričių yra fermentų atranka, kur fermentai pasižymi esteraziniu, amidaziniu, oksidoreduktaziniu, liaziniu, ligaziniu ar kitu fermentiniu aktyvumu.

N⁴-Modifikuoti citidino nukleotidai ir jų panaudojimas

Išradimo sritis

Išradimas yra susijęs su nukleorūgščių chemija, konkrečiai su N⁴-pozicijoje modifikuotais citidino trifosfatais. Taip pat šis išradimas yra susijęs su minėtų citidino analogų sinteze bei naudojimu. Išradimas apima modifikuotų nukleotidų panaudojimą sintetinant modifikuotą produktą, kuris gali būti oligonukleotidu, dvigrandininiu DNR ar RNR fragmentu ar aptameru. Visus išradimo objektus vienija modifikuotų nukleorūgščių biosintezės ir pritaikymo idėja, panaudojant N⁴-pozicijoje modifikuotus citidino trifosfatus. Šio išradimo modifikuotų nukleorūgščių biosintezės ir pritaikymo idėja apima bet kokios struktūros nukleorūgščių, kuriuose bent viena nukleobazė turi šiame išradime minimas citozino N⁴-padėties modifikacijas, gavimo ir panaudojimo būdus.

Išradimas yra paremtas pavyzdžiais, naudojant šiame išradime minimas polimerazes. Tačiau jis gali būti naudojamas ir su kitomis, šiame išradime nepaminėtomis polimerazėmis, kurių substratai yra su išradimu susiję modifikuoti citidino dariniai.

Išradimo technikos lygis

Oligonukleotidai (ON) yra trumpos DNR ar RNR molekulės, naudojamos molekulinės biologijos, biotechnologijos, sintetinės biologijos srityse, taip pat medicinoje (medicininė diagnostika, priešprasminė terapija). ON sudaryti iš natūralių nukleotidų dažnai yra netinkami medicinos srityje dėl savo prasto biostabilumo ir atsparumo, pvz., kraujo serumo nukleazėms. Modifikuoti nukleotidai yra naudojami modifikuotų ON sintezei siekiant pagerinti jų savybes, t.y., stabilumą, atsparumą, selektyvumą, katalizinį aktyvumą, farmakokinetines ar farmakodinamines charakteristikas. ON cheminės modifikacijos yra aktualus klausimas įvairiose sferose, nes tokiu būdu yra sukuriama žymiai didesnė ON įvairovė. Tokiu būdu modifikacijos gali pagerinti terapijai naudojamų ON giminingumą ar specifiškumą taikinio molekulei, pasiskirstymą organizme, kontroliuoti kai kurių ON motyvų polinkį agreguotis ar sumažinti toksiškumą.

Pagrindinės ON savybės lemiančios jų panaudojimo efektyvumą yra giminingumas ir specifiškumas. Įprastai, šios dvi charakteristikos antikoreliuoja, t.y., kuo didesnis giminingumas tikslinei sekai, tuo stipresnės sąveikos su panašiomis sekomis (Lomakin ir Frank-Kamenetskii 1998). Tokia antikoreliacija turėtų prieštarauti nukleorūgščių sąveikomis paremtų technologijų veikimo principams: dupleksų ar tripleksų susidarymas įmanomas, esant arba silpnai, arba nespecifiškai sąveikai. Tokia tendencija yra paaiškinama viena iš biomolekulių sąveikos teorijų. Biomolekulių sąveikas apibūdina dvi pagrindinės teorijos – erdvinės formos komplementarumo arba erdvinio atitikimo (angl. *shape complementarity/steric fit*) ir sąveikos užuomazgų užtrauktuko (angl. *nucleation zipping*). Erdvinio atitikimo sąvoka apibrėžia fermento-substrato,

antigeno-antikūno, aptamero-substrato kompleksų susidarymą, kurį nulemia ypač tikslus dviejų biomolekulių paviršiaus sričių atitikimas (Koshland 1995). Ši teorija siejama tiek su dideliu giminingumu, tiek su dideliu specifiškumu (von Hippel ir Berg 1986). Sąveikos užuomazgų užtrauktuko mechanizmas yra taikomas nukleorūgščių sudaromiems dupleksams ar tripleksams (Craig, Crothers, ir Doty 1971; Alberti et al. 2002). Priešingai nei erdvinio atitikimo teorijos atveju, net esant neįprastai ar trūkstamai jungčiai, stiprus užtrauktukas vis tiek gali būti „užsegta“ (Rougee et al. 1992). Dėl šios priežasties, atsiranda giminingumo-specifiškumo problema: energetiškai specifiški kompleksai susidaro panašiu efektyvumu lyginant su tais, kurie turi bent vieną neatitikimą.

Metodai, kurie remiasi nukleorūgščių sąveikomis, gali būti suskirstyti į dvi grupes – leidžiantys kelis neatitikimus bei reikalaujantys ypač didelio specifiškumo. Viena iš labai svarbių technologijų, grindžiama dideliu giminingumu bei specifiškumu, yra genomo analizė. Genomo analizė gali suteikti daug informacijos apie ligas ir patogenus, taip pat yra svarbi biocheminiuose ir biomediciniuose tyrimuose. Dažnai genomo analizės pagrindas yra specifinių DNR sekų aptikimas esant ypač mažiems DNR kiekiams, todėl pagrindinis siekis yra didelis giminingumas kartu su specifiškumu. Neretai reikia atskirti dvi labai panašias DNR sekas, pvz., nustatant vieno nukleotido polimorfizmą, todėl išauga būtinybė ypatingai dideliu specifiškumu. Todėl esant didžiulei genomo analizės ir kitų panašių technologijų paklausai bei siekiant užtikrinti jų kokybę daug dėmesio skiriama giminingumo ir specifiškumo problemos šalinimui.

Vienas iš būdų sušvelninti giminingumo ir specifiškumo antikoreliaciją yra sintetinių modifikuotų nukleorūgščių panaudojimas. Dažnai modifikuoti ON turi privalumų lyginant su natūraliais DNR fragmentais – modifikacijos suteikia didesnę giminingumą ir specifiškumą, stabilumą ar pagerina kitas savybes. Pavyzdžiui, sintetinis polimeras, panašus į DNR ir RNR, peptido nukleorūgštys (PNR) (angl. *peptide nucleic acids (PNA)*) pralenkia DNR savo savybėmis. PNR atveju, fosfodiesterinis karkasas yra pakeistas pseudopeptido polimeru (*N*-(2-amino-etil)-glicinu), kuriame nukleobazės yra sujungtos per metilenkarbonilo jungtis. Yra žinoma, kad PNR pasižymi didesniu giminingumu kartu ir specifiškumu nei analogiška DNR molekulė (Ratilainen et al. 2000) bei didesniu stabilumu ant įvairių paviršių (Kröger et al. 2002). Tam, kad susidarytų DNR-PNR dupleksai, papildoma joninė jėga nėra reikalinga, kadangi PNR yra sudarytas iš neutralaus karkaso. Dėl šios priežasties, priešingai nei natūralūs ON, PNR sugeba hibridizuotis, esant mažoms druskų koncentracijoms (Weiler et al. 1997). Taigi destabilizuojant DNR-DNR dupleksus, galima optimizuoti palankias sąlygas DNR-PNR kompleksų susidarymui. Tokiu būdu PNR detekcijos zondai įgytų didelį pranašumą lyginant su DNR zondais (Pokorski et al. 2004).

Panašiai kaip PNR, užrakintos nukleorūgštys (LNR) (angl. *locked nucleic acid (LNA)*) irgi pasižymi dideliu giminingumu ir specifiškumu (Braasch ir Corey 2001; Petersen ir Wengel 2003; Rakesh N. Veedu ir Wengel 2010; Veedu ir Wengel 2009). LNR karkasas yra sudarytas iš

tarpusavyje sujungtų ribozijų (kovalentinis ryšys tarp ribozės 2'-O ir 4'-C), todėl yra sumažintas konformacinis judėjimas. Dėl šios priežasties, LNR lengviau įgyja duplexo struktūrą ir atitinkamai didėja giminingumas ir specifiškumas komplementarioms DNR ir RNR sekoms. Be to, karbocikliniai LNR analogai, pvz., etilen-sujungtos nukleorūgštys (ENR) (angl. *ethylene-bridged nucleic acids (ENA)*), pasižymi ypatingai dideliu atsparumu kraujo serumo nukleazėms (>48 val.) lyginant su natūraliais ON (<3 val.) ar LNR (>9 val.).

Panašiai kaip PNR ar LNR atveju, yra daugiau sintetinių, bet į DNR ar RNR panašių oligomerų, kurie turi persvarą lyginant su natūraliais ON – atsparumas nukleazėms, stabilumas, pigesnė sintezė, didesnė įvairovė, pvz., morfolino nukleorūgštys (Summerton 1989), heksitolio ir 1,5-anhidroheksitolio nukleorūgštys (Lescrinier et al. 2000), triciklo-DNR (Renneberg ir Leumann 2002), neužrakintos nukleorūgštys (UNR) (angl. *unlocked nucleic acids (UNA)*) (Langkjaer, Pasternak, ir Wengel 2009), arabinozės nukleorūgštys (ANR), treozės nukleorūgštys (TNR) ir kiti oligomerai (Wilson ir Keefe 2006).

ON yra vienas pagrindinių šiuolaikinės medicinos įrankių, naudojamų nukleorūgščių terapijoje, kuri apima priešprasminę terapiją (angl. *antisense therapy*), RNR interferenciją (RNRI), ribozimų ar aptamerų panaudojimą (Sharma, Rungta, ir Prasad 2014; Rayburn ir Zhang 2008). Priešprasminė terapija ir RNRI yra efektyvūs genų raiškos kontrolės įrankiai. Veikimo principas remiasi tuo, kad sintetiniai ON komplementariai sąveikaudami su taikinio informacinės RNR (iRNR) molekule slopina transliaciją, todėl stebimas geno nutildymas. Tam, kad ON galėtų būti panaudotas terapijoje, jis turi atitikti tam tikrus reikalavimus. Pirmiausia, ON turi pereiti per ląstelės plazminę membraną ir specifiškai sąveikauti tik su taikiniu. Taip pat, ON neturi būti toksiškas ir turi išlikti stabilus tiek viduląstelinėje aplinkoje, tiek už ląstelės ribų. ON sintezės kaina taip pat yra gana svarus kriterijus. Taigi ON turi pasižymėti dideliu giminingumu ir specifiškumu savo taikiniui, atsparumu ląstelės ir užląstelinėms nukleazėms (egzo- ir endo-nukleazėms), nesąveikauti su kitomis ląstelės biomolekulėmis, pasižymėti tam tikromis savybėmis, tinkamomis pernašai į ląstelės vidų. Dėl šių priežasčių daug dėmesio skiriama modifikuotiems ON, siekiant pagerinti terapijai reikalingas savybės.

Šiuo metu yra trijų tipų (pirmos, antros ir trečios kartos) priešprasmiai ON (Sharma, Sharma, ir Singh 2014; Chery 2016). Pirmosios kartos priešprasmiai ON buvo kuriami siekiant padidinti atsparumą nukleazėms. Įprastai modifikuojamas fosfodiesterinis karkasas, deguonį pakeičiant siera (fosforotioatiniai ON (PS-ON)) (Xie et al. 2012; Rahman et al. 2012; E. De Clercq, Eckstein, ir Merigan 1969) arba metil grupe (metilfosfonatai) (Monn ir Schurch 2007; Shoji et al. 1991). Tokie ON pasižymi atsparumu nukleazėms, o pakeistas molekulės krūvis lemia lengvesnę pernašą bei periferinį pasiskirstymą (Yu et al. 2007). Nepaisant pranašumų lyginant su natūraliais ON, pirmos kartos ON yra nepakankamai giminingi ir specifiški.

Siekiant pašalinti pirmos kartos ON trūkumus buvo sukurti antros kartos ON. Be PS karkaso, antros kartos ON turi papildomų nukleobazės ar monosacharido modifikacijų, kurios

padidina giminingumą ir specifiškumą. 2'-O-metil (2'-OME) ir 2'-O-metoksietil (2'-OMOE) (Frank Bennett 2007) ribozės modifikacijos yra vienos pagrindinių antros kartos ON modifikacijų. Taip pat būdingi ir nukleobazės cheminiai pakeitimai, pvz., C5 pirimidinų (Moulds et al. 1995; Flanagan, Kothavale, ir Wagner 1996), C7 purinų modifikacijos (Buhr et al. 1996). Antros kartos ON pasižymi ne tik didesniu giminingumu ir specifiškumu, tačiau yra mažiau toksiški bei geriau pernešami organizmo viduje.

Trečios kartos ON pasižymi furanozės žiedo modifikacijomis, pvz., PNR, LNR ir fosfordiamidato-morfolino oligomerai (PMO). Šios kartos ON pasižymi atsparumu nukleazėms, geresniu stabilumu, giminingumu ir specifiškumu bei kitomis farmakodinaminėmis savybėmis.

Panašiai kaip ir priešprasminėje terapijoje, dažniausios RNRI srityje naudojamos modifikacijos yra karkaso pakeitimai, t.y., boranofosfatų bei fosforotioatų panaudojimas, bei monosacharido 2'-pakeitimai, pvz., 2'-OME-, 2'-OMOE-, 2'-F- (Bumcrot et al. 2006).

Be plataus modifikuotų ON pritaikymo, modifikuoti nukleozidai ar nukleotidai taip pat yra svarbūs molekuliniai įrankiai naudojami medicinoje. Modifikuoti nukleozidai/nukleotidai yra viena iš atvirkštinių transkriptazių slopiklių kategorijų, įeinančių į antiretrovirusinių vaistų sudėtį. Šių antiretrovirusinių vaistų veikimo principas yra toks, kad natūralių nukleotidų analogai neturi 3'-OH grupės, todėl veikia kaip grandinės ilginimo terminatorius. Tokiu būdu yra stabdoma virusinės DNR sintezė. Modifikuoti nukleozidų/nukleotidų analogai naudojami AIDS gydymui bei ypač aktyvios antiretrovirusinės terapijos (angl. *highly active antiretroviral therapy, HAART*) metu. Vienas iš auksinių standartų gydant herpes viruso sukeltas infekcijas yra modifikuotas guaninas Acyclovir (Elion et al. 1977; Schaeffer et al. 1978). 3'-pakeisti-2',3'-dideoksinukleozidai naudojami ŽIV infekcijų gydymui (Herdewijn et al. 1987; Balzarini et al. 1988), o L-nukleozidai yra žinomi kaip specifiniai hepatito B viruso slopikliai (Bryant et al. 2001). Daug kitų nukleozidų ir nukleotidų analogų yra naudojami antivirusinėje terapijoje (Erik De Clercq ir Field 2006; Hurwitz ir Schinazi 2013).

Šiuo metu yra patvirtinti trys ON-pagrindo vaistai, naudojami medicinoje. Pegaptanib (Macugen®) yra ON, kuris specifiškai sąveikauja su kraujagyslių endotelio augimo veiksnium (VEGF), ir yra naudojamas gydant geltonosios dėmės degeneraciją. Tai yra pirmasis patvirtintas su polietilenglikoliu (PEG)-konjuguotas aptameras, turintis 2'-F ir 2'-O-metil pirimidino nukleotidų modifikacijas (Pat. Nr. US20130142796; Tucker et al. 1999). Fomivirsen (Vitravene™) yra PS-ON, kuris komplementariai sąveikaudamas su citomegalo viruso (CMV) iRNR slopina virusinių iRNR transliaciją, ir yra naudojamas priešprasminėje terapijoje gydant CMV sukeltas pasekmes (Pat. Nr. US5595978; Marwick 1998). Mipomersen (Kynamro™) yra PS-ON, turintis 2'-OMOE bei 5-metilcitozino modifikacijas (Pat. Nr. US2014243389). Mipomersen taikinyas yra apolipoproteino B (apo-B) iRNR, todėl yra slopinama apo-B sintezė. Šis modifikuotas ON yra naudojamas hipercholesterolemijos gydymui (McGowan et al. 2012). Daugybė įvairių modifikuotų ON yra klinikinių bandymų etape (Chery 2016).

Ribozimai yra RNR molekulės, gebančios katalizuoti biochemines reakcijas. Tai yra fermentų analogai nukleorūgščių lygmenyje. Kadangi neretai ribozimai yra naudojami medicinoje, atliekamos įvairios ribozimo ON modifikacijos siekiant pagerinti jų biostabilumą ar atsparumą nukleazėms. Ribozimų atveju, modifikacijų pasirinkimas yra ribojamas tuo, kad naujos cheminės grupės gali pakeisti katalizinį aktyvumą. Kartais katalizinis aktyvumas gali būti prarandamas, tačiau kitais atvejais – gali būti pagerintas (Beigelman et al. 1995).

Aptamerai yra DNR ar RNR ON, formuojantys stabilias ir unikalias erdvinės struktūras bei pasižymintys dideliu giminingumu ir specifiškumu įvairioms taikinio molekulėms, pvz., baltymams, vaistams, gyvoms ląstelėms, mažoms organinėms ar neorganinėms molekulėms (Patel ir Suri 2000; Sun ir Zu 2015). SELEX (angl. *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) yra aptamerų atrankos *in vitro* procesas (Pat. Nr. US5270163; Tuerk ir Gold 1990; Ellington ir Szostak 1990). Didelis susidomėjimas aptamerų technologija paskatino SELEX metodikos progresą link efektyvesnių, pigesnių ir lengvesnių atrankos būdų (Darmostuk et al. 2015). Siekiant atrinkti aptamerą, pasižymintį bet kokiomis pageidaujamomis savybėmis (pvz., giminingumas taikiniui, selektyvumas) iš atsitiktinių ON bibliotekos SELEX metu yra vykdoma ON atranka ir identifikacija. Papildomai modifikuojant jau atrinkto aptamero sudėtį post-SELEX proceso metu, pagerinamos įvairios aptamero savybės – stabilumas, bendras nukleorūgšties molekulės krūvis, hidrofobiškumas ar hidrofiliškumas, lipofiliškumas, atsparumas nukleazėms ar temperatūrai (Gao et al. 2016; Kusser 2000). Vis dėlto post-modifikacija didina tikimybę deformuoti aptamero erdvinę struktūrą, todėl ON savybės (giminingumas, selektyvumas ar katalizinis aktyvumas), kurios buvo pagrindiniai atrankos *in vitro* kriterijai, gali pakisti (Avino et al. 2012). Remiantis alternatyvia strategija ir siekiant sukurti didesnę struktūrinę ir funkcinę ON įvairovę, chemiškai modifikuota oligonukleotidų biblioteka naudojama modifikuotų aptamerų atrankai – mod-SELEX (Keefe ir Cload 2008). Skirtingos nukleotidų modifikacijos suteikia galimybę praturtinti aptamerų biblioteką, tačiau sukelia problemų dauginant ON, kadangi modifikuoti nukleotidai turi būti DNR ar RNR polimerazių substratai, dauginant atitinkamai DNR ar RNR aptamerus SELEX metu (Lapa, Chudinov, ir Timofeev 2016). Yra sukurta gausybė tradicinio SELEX metodo patobulinimų/modifikacijų. Tai yra kapiliarinės elektroforezės-, magnetinių dalelių-, ląstelės-, *in vivo*-, vieno žingsnio-, post-, foto-, *in silico*-, mišrus-, veidrodinio atspindžio- (arba Spiegelmer-), chimerinis-, netiesioginis-, kryžminis-, click- ir kiti SELEX metodai (Darmostuk et al. 2015). Idealaus ir universalus aptamerų atrankos metodo nėra, kadangi kiekvienas SELEX turi savo privalumų bei trūkumų.

Aptamerų pritaikymo sritys yra labai įvairios – nuo medicininės paskirties iki panaudojimo biotechnologijoje (chromatografija, masių spektrometrija, kapiliarinė elektroforezė, optiniai ir akustiniai jutikliai, signaliniai aptamerai) (Tombelli, Minunni, ir Mascini 2005). Pagrindinės aptamerų naudojimo sritys siejamos su klinicine terapija. Aptamerai naudojami virusų ir bakterijų detekcijai (Kiellerich-Pedersen et al. 2013; Rotherham et al. 2012), vėžinių žymenų

aptikimui (Chang, Donovan, ir Tan 2013), baltymų analizei Western blot būdu (Shin et al. 2010), mikrogardelių ir biojutiklių srityje (Jung et al. 2013; Sosic et al. 2013; Q. Wang et al. 2014), chromatografijoje ir paviršiaus plazmonų rezonanso technologijoje (Zhao et al. 2008; H. Chen et al. 2014), ar kaip *in vivo* vaizdinimo priemonės (Hong et al. 2011).

Modifikuotų aptamerų gavimui yra naudojamos trijų tipų nukleotidų modifikacijos: fosfodiesterinio karkaso, ribozės ar nukleobazės (Wilson ir Keefe 2006). Panašiai kaip ir terapijai naudojamų ON atveju, fosfodiesterinis karkasas modifikuojamas siekiant sukurti atsparumą nukleazėms. Tačiau pagrindinės aptamerų modifikavimo priežastys slypi aptamero erdvinėje struktūroje ir didesnės įvairovės kūrime. Yra naudojamos įvairios ribozės 2'- ir 4'-modifikacijos, pvz., 2'-F-, 2'-amino- ar 2'-O-MOE- (Keefe ir Cload 2008). Siekiant sukurti aptamerus, pasižyminčius labai plačiu giminingumo ir specifiškumo spektru bei unikalia erdvine struktūra, modifikuojamos nukleobazės. Dažniausiai literatūroje minimi C5-modifikuoti pirimidinai (5-pentinil-, 5-N-karbamoil-, 5-boro rūgštis-, 5-jodo-, 5-tirozil-, 5-imidazolo-, 5-karboksamido-, 5-naftilaminokarbonil-, 5-benzilaminokarbonil-), ir purinai, turintys pakaitus C7 ir C8 padėtyse (Pat. Nr. US20160215013; Lapa, Chudinov, ir Timofeev 2016). C5 ir C7 padėčių modifikacijos vykdomos dėl kelių priežasčių. Yra parodyta, kad C5 pirimidinų ir C7 purinų pozicijoje modifikuota grupė yra orientuojama į DNR spiralės didįjį griovį, todėl yra laikoma, kad tokiu būdu aptamero funkcinės savybės yra pažeidžiamos mažiausiai. Kita labai svarbi priežastis yra tai, kad tokius modifikuotus nukleotidų analogus panaudoja RNR ir DNR polimerazės. Tokiu būdu atsiranda galimybė pritaikyti amplifikacijos ir kitas metodikas SELEX metu.

Vieni iš dažniausiai aptamerų technologijoje naudojamų modifikuotų nukleotidų yra C5-padėtyje modifikuoti pirimidinai. SOMAmerai (angl. *Slow off-rate modified aptamer*) yra aptamerai, pasižymintys labai maža disociacijos konstanta bei turintys 5-padėtyje modifikuotus uracilus (J. C. Rohloff et al. 2014; Kuwahara et al. 2006). SOMAmerų peptidų šoninių grandinių funkcinės modifikacijos sukuria daugiau unikalių tarpmolekulinių sąveikų tiesiogiai su baltymais. Tokiu būdu galima gauti somamerą/aptamerą, specifiškai sąveikaujantį su itin hidrofobine ar įkrauta molekule, baltymu. Siekiant dar labiau padidinti C5 modifikuotų nukleobazių įvairovę yra naudojama vario(I) katalizuojama reakcija susidarant alkino-azido ciklui arba „click“ chemija (Tolle et al. 2015). „Click“ chemija remiasi 5-etinil-dUTP panaudojimu, kuris jau būnant ON sudėtyje gali būti modifikuotas labai įvairiomis cheminėmis grupėmis. Tokiu būdu išvengiama modifikuoto pakaito ir polimerazės nesuderinamumo.

Modifikuojamos nukleobazės pozicijos pasirinkimas yra ribojamas keliais aspektais. Svarbiausia yra tai, kad modifikuota nukleobazė išsaugotų Watson-Crick geometriją ir komplementariai sąveikautų su natūralia nukleobaze. Priešingai nei modifikuoti nukleotidai, kurie sąveikauja su natūraliais komplementariais nukleotidais, galima naudoti naujus ir visiškai nenatūralius nukleotidus, kurie sukuria atskirą „nenatūralią“ bazių porą. Tokiu būdu nenatūrali

bazių pora praplečia genetinę abėcėlę sukuriant papildomą trečią bazių porą (be A:T ir C:G) (Yamashige et al. 2012; Seo et al. 2011; Malyshev et al. 2012). Nenatūralios bazių poros gali padidinti aptamerų funkcionalumą bei įvairovę, kadangi aptamerai yra sudaryti iš 6 skirtingų nukleotidų, vietoj įprastų 4. Parodyta, kad į aptamerų biblioteką įterpus vos keletą nenatūralių nukleotidų ExSELEX metu (angl. *genetic alphabet Expansion for SELEX*) galima pagerinti aptamerų giminingumą taikinio baltymams (Kimoto et al. 2013; Georgiadis et al. 2015).

Atliekant SELEX yra būtina, kad modifikuoti nukleotidai ir ON būtų atrankos procese naudojamų polimerazių substratai (Obeid et al. 2010; Bergen et al. 2012; Lam, Hipolito, ir Perrin 2008). Tokie reikalavimai keliama ne tik modifikuotiems dNTP, tačiau ir modifikacijomis pasižyminčiai ON molekulei – cheminės modifikacijos neturi trukdyti polimerazei nuskaityti matricinės nukleorūgšties grandinės. Kadangi polimerazės yra vienas iš pagrindinių molekulinės biologijos įrankių, yra natūralu, kad ieškoma auksinio polimerazės standarto, pasižyminčio termostabilumu, efektyvumu, dideliu sintezės greičiu, tikslumu, procesyvumu ir gebėjimu panaudoti modifikuotus dNTP. Pradedant SELEX procesą su modifikuotais NTP ar dNTP, pirmiausia yra įprasta išbandyti komercines polimerazes. Žinoma, jog C5 ir C7 modifikuoti dNTP/NTP yra visiems prieinamų polimerazių, pvz., Vent, KOD Dash, KOD XL, Taq DNR ir T7 RNR polimerazių, substratai (Lipi et al. 2016). Vis dėlto, tokių polimerazių veikimas dažnai būna efektyvus tik optimaliomis sąlygomis. Struktūrinių ir funkcinių polimerazių tyrimų duomenys leidžia suprasti nukleotido sąveikas su polimerazės aktyviuoju centru bei polimerizacijos mechanizmą. Tokia informacija suteikia galimybę kurti mutantines polimerazes taikant racionalaus dizaino teoriją (Kries, Blomberg, ir Hilvert 2013; Khoury et al. 2014). Vis dėlto, racionalus dizainas yra kritinių aminorūgščių spėjimas, kuris nesuteikia garantijos pagerinti polimerazės savybes (Samish et al. 2011). Norint sukurti mutantinę polimerazę galima atkartoti Darvino evoliucijos principus – tuomet yra taikoma kryptingos baltymų evoliucijos strategija (Jackel, Kast, ir Hilvert 2008). Kryptinga baltymų evoliucija remiasi didžiulės molekulinės įvairovės sukūrimu bei baltymų, pasižyminčių norima savybe, atranka. Analogiškai natūraliai Darvino evoliucijai, kryptingos evoliucijos metu yra išlaikomas ryšys tarp genotipo ir fenotipo (Leemhuis, Kelly, ir Dijkhuizen 2009). Taigi evoliucijos *in vitro* metu yra sukuriamas evoliucinis spaudimas, pvz., naudojami modifikuoti nukleotidai vietoj natūralių.

Viena iš kryptingos baltymų evoliucijos strategijų ypač tinkančių polimerazių atrankai yra autoreplikacija erdvėskyriuose (angl. *compartmentalized self-replication*) (Pat. Nr. US7514210B2; Ghadessy, Ong, ir Holliger 2001). Sukūrus evoliucinį spaudimą, t.y., natūralius nukleotidus pakeitus jų analogais, galima atrinkti mutantines polimerazes, naudojančias modifikuotus NTP ir tinkančias SELEX (T. Chen ir Romesberg 2014; Laos, Thomson, ir Benner 2014). Šis atrankos būdas yra pagrįstas paprastu grįžtamoju ryšiu – aktyvi polimerazė padaugina savo geną, tuo tarpu mažiau aktyvūs ar neaktyvūs polimerazių mutantai replikacijos nevykdo, ir yra pašalinami iš mutantų bibliotekos. Taikant autoreplikacijos erdvėskyriuose yra

sukurtos įvairios mutantinės polimerazės, giminingos kitokiems substratams: DNR polimerazės naudojančios modifikuotus dNTP (Obeid et al. 2010; Bergen et al. 2012; Meek, Rangel, ir Heemstra 2016), RNR polimerazės naudojančios modifikuotus NTP (Chelliserrykattil ir Ellington 2004), DNR polimerazė veikianti kaip RNR polimerazė (Xia et al. 2002), polimerazė, pasižyminti DNR, RNR polimerazės ir atvirkštinės transkriptazės aktyvumu (Ong et al. 2006).

Nors autoreplikacija erdvėskyriuose yra ypač efektyvus metodas naujų polimerazių atrankai, tai yra sunkiai pritaikomas evoliucijos *in vitro* įrankis kitų baltymų kūrimui. Vis dėlto, autoreplikacijos erdvėskyriuose ciklą praplečiant papildomu etapu yra sukuriama galimybė atrinkti ne tik polimerazes, tačiau ir kitus baltymus. Įprastai, kooperatyvi replikacija erdvėskyriuose (angl. *cooperative/coupled compartmentalized self-replication* arba *compartmentalized partnered-replication*) remiasi tuo, kad tikslinio baltymo aktyvumas reguliuoja *Taq* DNR polimerazės baltymo sintezę: didesnis *Taq* polimerazės kiekis lemia geresnę aktyvių genų PGR išėigą (Ellefson et al. 2014). Nors sistema yra labai jautri, tokių pavyzdžių literatūroje yra labai mažai, kadangi yra sudėtinga sumodeliuoti tokią kooperatyvią sistemą, kurioje evoliucionuojamo baltymo aktyvumas būtų susietas su specifiniu jo geno padauginimu.

DNR surišantys baltymai kontroliuoja didelę ląstelinių procesų (replikacija, transkripcija, epigenetinis modifikavimas, DNR pažaidų taisymas) dalį, todėl DNR-baltymų sąveikos tyrimai yra labai svarbūs tiek fundamentiniais, tiek biotechnologiniais aspektais. Siekiant tirti DNR-baltymų sąveikas, taikoma susiuvimo/sujungimo (angl. *cross-linking*) strategija, t.y., silpnos nekovalentinės sąveikos paverčiamos kovalentinėmis jungtimis susidarant kovalentiniam heterokonjugatui. Tam, kad tokie heterokonjugatai galėtų būti tinkamai charakterizuoti, keliamos kelios taisyklės: DNR-baltymo kovalentinis kompleksas turi būti stabilus, cheminės jungtys turi susidaryti tik tarp nukleobazės ir baltymo aminorūgščių šoninių grandinių, esančių tam tikru nedideliu atstumu, bei susidaręs kovalentinis kompleksas turi išlaikyti natyvaus nekovalentinio komplekso erdvinę struktūrą (Steen ir Jensen 2002). Struktūrinė nukleorūgščių-baltymų heterokonjugatų analizė leidžia sužinoti susiuvimo reakcijos stecheometriją, nukleorūgštis rišančius baltymų domenų bei specifines baltymo aminorūgščių liekanas, sąveikaujančias su nukleorūgštimi.

Fotocheminis susiuvimas yra vienas iš dažniausiai taikomų metodų tiriant DNR-baltymų kompleksus bei sąveikos mechanizmus. Kadangi natyvūs baltymai ir nukleorūgštys pasižymi 250–280 nm UV šviesos absorbcija, jie gali būti fotochemiškai sujungti išlaikant komplekso erdvinę struktūrą. Vis dėlto, tokio susiuvimo išėigos yra nedidelės, bei dažnai stebimas kovalentinio komplekso suirimas (fotoskilimas arba oksidaciniai procesai). Siekiant išvengti tokių problemų, yra naudojama fotochemiškai aktyvi cheminė grupė, kuri absorbuoja >300 nm UV šviesą. Tokia fotochemiškai aktyvi cheminė grupė yra įvedama į nukleorūgšties arba baltymo molekulę taikant įvairias strategijas. Vienas iš būdų yra sujungti DNR-baltymo kompleksą

naudojant papildomą hetero-bifunkcinį fotochemiškai aktyvų susiuvimo reagentą, pvz., 2-iminotiolaną (Wower et al. 1981) ar 4-merkaptobutirimidatą (Traut et al. 1973). Tokiu atveju, reagentas yra įdedamas tik susiformavus ON-baltymo kompleksui, ir laisvos amino grupės dalyvauja susiuvimo reakcijoje. Po to, kompleksas yra sužadinamas 350–365 nm bangos ilgio UV šviesa ir stebimas kovalentinių ryšių susidarymas. Alternatyvus būdas DNR sujungti su baltymu yra panaudoti fotojautrius DNR ar baltymo analogus. ON sintezė *in vivo* bei *in vitro* yra pakankamai išvystyta technologija, todėl pastarieji yra dažniau žymimi fotoaktyvuojančia grupe. Yra didžiulis fotojautrių nukleotidų analogų bei fotojautrių modifikacijų pasirinkimas. Dažniausiai naudojami nukleotidų analogai yra azido-, tio-, bromo- ar jodo- pakeistas nukleobazės turintys nukleotidai (Meisenheimer ir Koch 1997). Kitas būdas yra panaudoti nukleotidus, turinčius fotojautrias modifikacijas, pvz., psoraleną (S. S. Sastry et al. 1993), diaziriną (Shigdel, Zhang, ir He 2008) ar benzofenoną (S. Sastry ir Ross 1998).

Benzofenonas yra universali molekulė, pasižyminti išskirtinėmis fotocheminėmis savybėmis bei yra dažniausiai naudojamas fotoforas organinėje chemijoje, bioorganinėje chemijoje ir medžiagotyroje (Sergentu et al. 2014). Fotojautrinimo efektyvumas priklauso nuo pagrindinių dviejų dalykų: reagento gebėjimo įgyti ir ilgai išsaugoti sužadintą tripleto būseną bei paskesnio energijos perdavimo, kuris yra stipriai susijęs su fotojautrios molekulės sąveika su aplinkoje esančiomis cheminėmis grupėmis. Yra nustatyta, kad ilgose UV bangose (365 nm) benzofenonas yra sužadinamas, įgyjant tripleto būseną, kuri pasižymi ilgu gyvavimo pusperiodžiu. Būtent dėl šios priežasties, benzofenonas yra labai plačiai naudojamas fotoiniciatorius (Gyorgy Dorman et al. 2016; Khanum, Shashikanth, ir Deepak 2004; Ranganatha et al. 2013). Benzofenono savybės pritaikomos biokonjugacijoje ir imobilizacijoje, proteomos ir interaktomos kartografavime, paviršiaus ir polimerų chemijoje, DNR fotojautrinime ir kt. (Gyorgy Dorman et al. 2016). Sugebėjus genetiškai užkoduoti benzofenoną-turinčią aminorūgštį, jo panaudojimo galimybės buvo dar labiau praplėstos iki *in vivo* baltymų žymėjimo (Chin et al. 2002; Lang ir Chin 2014; L. Wang et al. 2001). Taip pat, kadangi benzofenonas inicijuoja paviršinių C-H ryšių transformacijas, jis yra labai svarbus fotoforas, vystant funkcionalių paviršių technologijas, pritaikant biotechnologijoje, optikos, elektronikos ir fotonikos srityse (Turgeon, Harley, ir Bailey 2014; G. Dorman ir Prestwich 2000).

Kadangi benzofenonas yra aktyvuojamas 350–365 nm UV šviesos diapazone, ląstelės, baltymai ar nukleorūgštys nėra pažeidžiami. Benzofenonas fotochemiškai reaguoja su erdviškai prieinamais C-H ryšiais, esančiais DNR ar aminorūgščių šoninėse grandinėse. Tai suteikia galimybę benzofenoną panaudoti kartu su įvairiomis biomolekulėmis, pavyzdžiui, imobilizuojant ON ar peptidus ant paviršiaus, ir tokiu būdu sukuriant specifines ląstelių gaudykles (Herman et al. 2011), funkcionalizuotą paviršių antigenų ar patogeninių bakterijų detekcijai (Konry et al. 2005) ar generuojant antimikrobinę dangą tekstilės pramonei (Dhende et al. 2011). Neatsiejama biotechnologijos sritis yra DNR mikrogardelės, todėl ieškoma įvairių metodų siekiant imobilizuoti

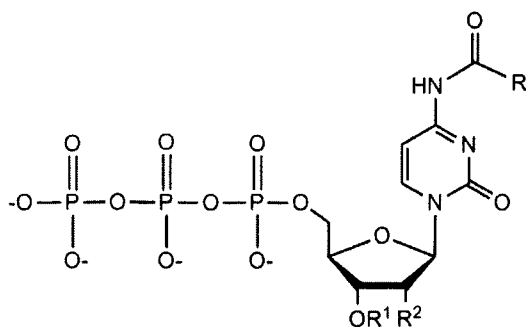
ON ant įvairių paviršių. Fotocheminė ON imobilizacija panaudojant benzofenono dariniais padengtus paviršius yra vienas iš pakankamai naujų ir inovatyvių imobilizacijos būdų (Renberg et al. 2009; Marcon et al. 2010). Vis dėlto, yra mažai duomenų apie ON, turinčių benzofenono modifikaciją, imobilizaciją ar susiuvimą su kitomis biomolekulėmis (Nakatani, Dohno, ir Saito 1999; Nakatani, Yoshida, ir Saito 2002). Tokie ON galėtų būti sintetinami cheminės sintezės būdu arba panaudojant fermentinę katalizę. Tokiu būdu, tik benzofenonu modifikuoti specifinės sekos ON galėtų būti imobilizuoti ant paviršiaus, ir skirti komplementarių nukleorūgščių paieškai įvairiuose mėginiuose.

Vystantis ON technologijoms išlieka didelis poreikis alternatyvioms nukleotidų modifikacijoms. C5/C7/C8 nukleotidų padėčių modifikacijos yra gana plačiai ištirtos, tačiau nedaug žinoma apie kitų nukleobazės pozicijų modifikacijas. Taip pat, vis dar trūksta polimerazių, kurios neprarasdamos efektyvumo, tikslumo ir našumo galėtų panaudoti modifikuotus nukleotidus PGR metu, ir patobulintų mod-SELEX technologiją. Nors autoreplikacijos erdvėskyriuose metodas yra plačiai naudojamas mutantinių polimerazių, naudojančių modifikuotus nukleotidus, atrankai, trūksta technologijos atmainų, tinkančių kitų baltymų evoliucijai *in vitro*. Taip pat, siekiant išsamiai tyrinėti baltymo-baltymo, baltymo-nukleorūgšties sąveikas ar pritaikyti naujas imobilizacijos technologijas, reikia tobulinti konjugacijos/susiuvimo strategijas. Šis išradimas suteikia žinių apie kitokias nukleotidų modifikacijas, pristatant *N*⁴-modifikuotus citidino analogus ir jų panaudojimo sritis.

Išradimo esmė

Pagrindinė šio išradimo idėja apima *N*⁴-modifikuotų citidino trifosfatų sintezę ir jų naudojimą.

Šis išradimas aprašo naujus *N*⁴-modifikuotus citidino nukleotidus, turinčius bendrąją struktūrinę Formulę I:

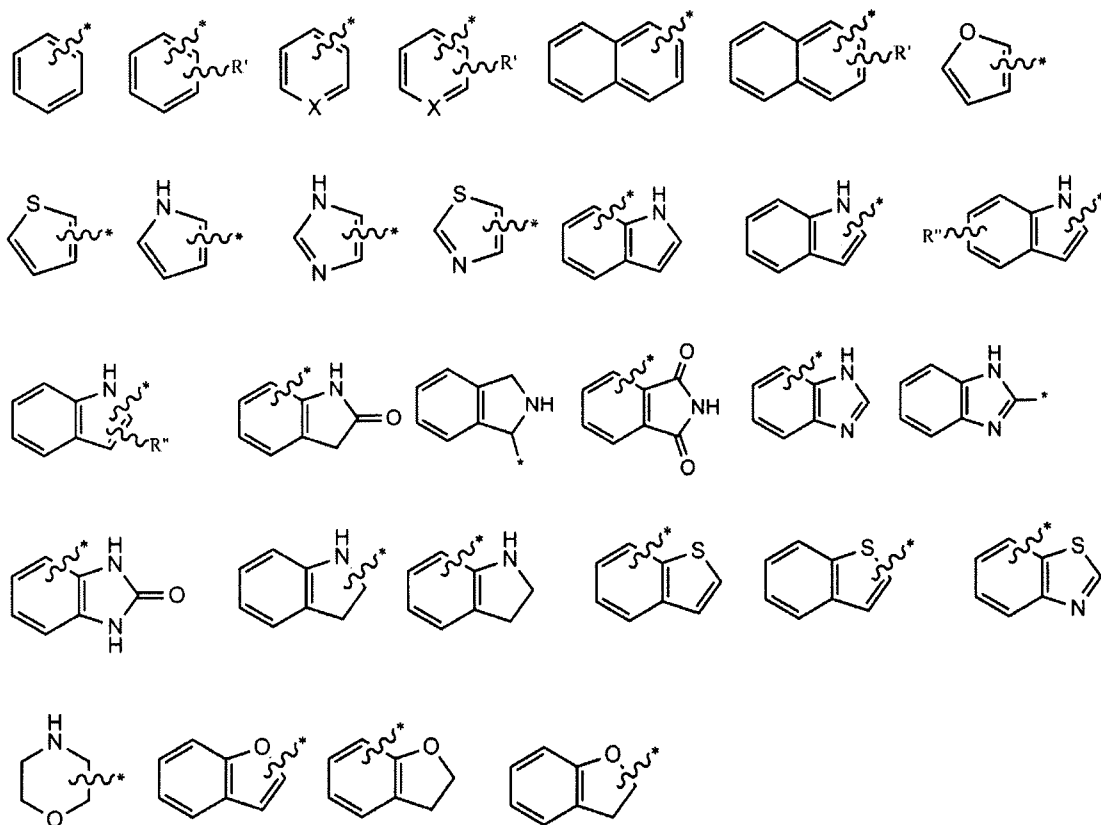


Formulė I

kur

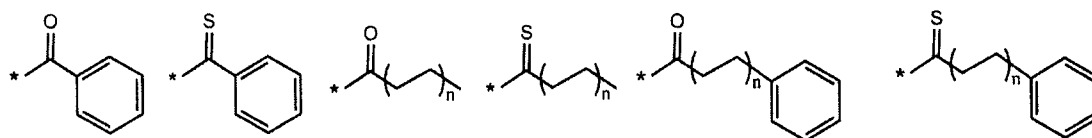
R yra nepriklausomai parinktas iš grupės, sudarytos iš:

$-(CH_2)_n-CH_3$, kur n yra 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 arba 10;



kur * nurodo R grupės prisijungimo vietą;

R' yra nepriklausomai parinktas iš grupės, sudarytos iš:



kur n yra 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 arba 10; ir * nurodo R' grupės prisijungimo prie R vietą;

R'' yra nepriklausomai parinktas iš grupės, sudarytos iš $-H$, $-CH_3$, $-NH_2$, $-OH$, $-Cl$ arba $-Br$;

X yra nepriklausomai parinktas iš $-CH=$ arba $-NH=$;

R¹ yra nepriklausomai parinktas iš grupės, sudarytos iš $-H$, $-OAc$, $-OBz$, $-Me$ arba $-Et$;

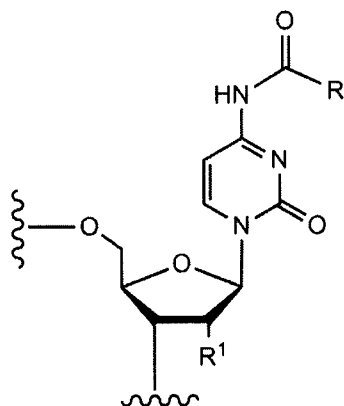
R² yra nepriklausomai parinktas iš grupės, sudarytos iš $-H$, $-OH$, $-OMe$ arba $-OEt$.

Išradimas aprašo ir nukleorūgščių molekules, kurių sudėtyje yra bent vienas iš šiame išradime minimų junginių. Tiksliau, nukleorūgšties molekulė gali būti viengrandė arba dvigrandė. Dar tiksliau, nukleorūgšties molekulė gali būti DNR, RNR arba mišrios sudėties (DNR-RNR) molekulė.

Išradime minimos nukleorūgšties molekulės ilgis gali svyruoti nuo 10 iki 4000 nukleotidų.

Išradimas aprašo nukleorūgšties molekules, kurias gali veikti kaip aptamerai.

Išradimas aprašo nukleorūgšties molekulę, kuri sudaryta iš struktūrinės Formulės IA:

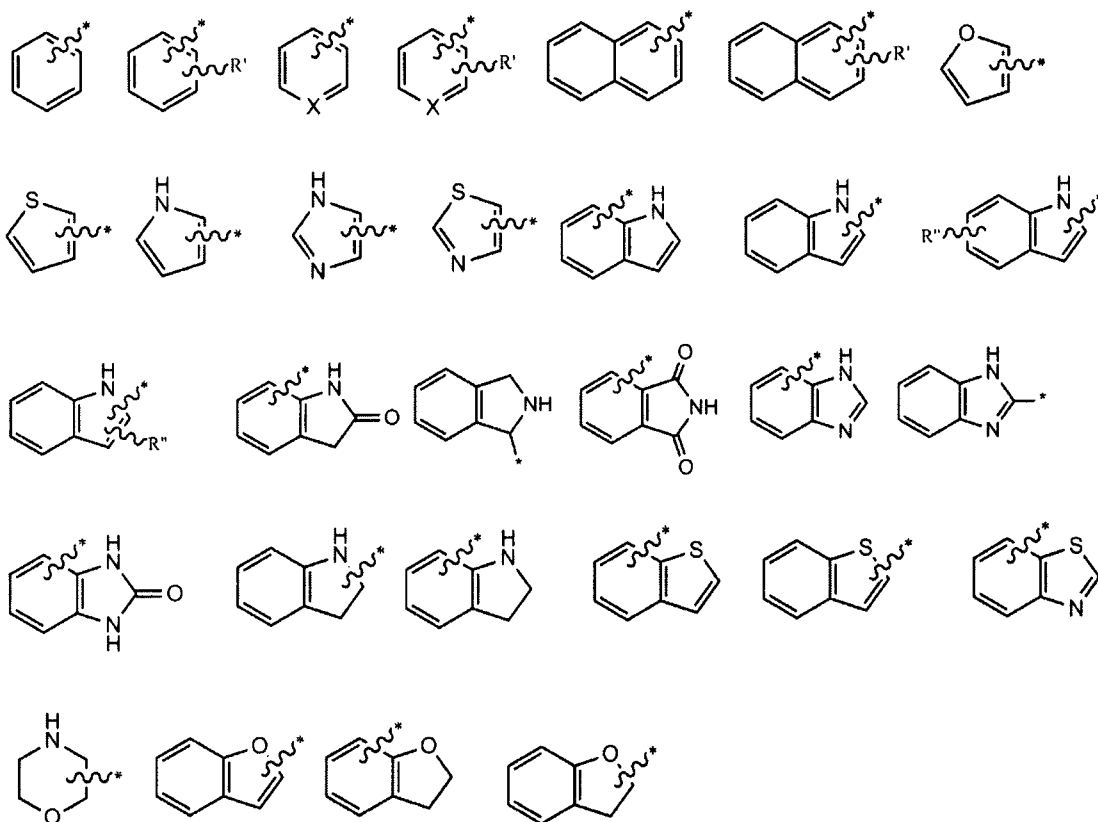


Formulė IA

kur

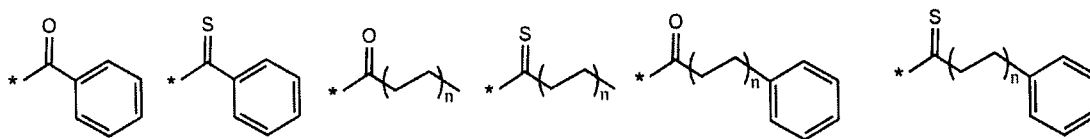
R yra nepriklausomai parinktas iš grupės, sudarytos iš:

$-(CH_2)_n-CH_3$, kur n yra 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 arba 10;



kur * nurodo R grupės prisijungimo vietą;

R' yra nepriklausomai parinktas iš grupės, sudarytos iš:



kur n yra 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 arba 10; ir * nurodo R' grupės prisijungimo prie R vietą;

R'' yra nepriklausomai parinktas iš grupės, sudarytos iš –H, –CH₃, –NH₂, –OH, –Cl arba –Br;

X yra nepriklausomai parinktas iš –CH= arba –NH=;

R¹ yra nepriklausomai parinktas iš grupės, sudarytos iš –H, –OH, –OMe arba –OEt.

Išradimas apima *N*⁴-modifikuotų citidino nukleotidų naudojimą modifikuotų oligonukleotidų sintezei. Tiksliau, modifikuotas oligonukleotidas gali būti viengrandis arba dvigrandis.

Išradimas aprašo modifikuotų oligonukleotidų sintezę pradmens ilginimo metodu.

Šis išradimas aprašo *N*⁴-modifikuotų citidino nukleotidų naudojimą fermentų atrankai. Fermentai gali būti dviejų tipų: i) modifikaciją pašalinantys, arba ii) panaudojantys modifikuotą nukleotidą modifikuoto oligonukleotido sintezei. Tiksliau, fermentas gali pasižymėti esteraziniu, amidaziniu, oksidoreduktaziniu, liaziniu, ligaziniu ar kitu fermentiniu aktyvumu, pasižyminčiu modifikuoto citidino hidrolize susidarant natūraliam citidino nukleotidui. Dar tiksliau, fermentas gali pakeisti modifikuotą nukleotidą, susidarant natūraliam nukleotidui ir i) modifikacijos liekanai, arba ii) suskaidytai modifikacijos liekanai, t.y., fermentas gali papildomai pakeisti modifikacijos grupę iki smulkesnių sudedamųjų dalių.

Išradimas apima fermentų, o tiksliau polimerazių atranką, kai atrenkamas fermentas vykdo nukleorūgščių polimerizaciją naudojant *N*⁴-modifikuotus citidino analogus. Tokio fermento aktyvumas pasižymi tuo, kad *N*⁴-modifikuotas citidino nukleotidas yra naudojamas vietoj natūralaus citidino nukleotido, ir reakcijos produktas yra nukleorūgšties molekulės, kuriose yra anksčiau minėtos modifikacijos.

Išradimas apima minėtų fermentų atranką vykdomą autoreplikacijos, t.y., kai atrenkamas fermentas yra polimerazė ir padaugina savo geną, ir kooperatyvios replikacijos, t.y., kai fermentas yra modifikaciją pašalinantis ar pakeičiantis, o papildoma polimerazė vykdo modifikaciją pašalinančio ar pakeičiančio fermento geno padauginimą erdvėsryrių būdu. Tiksliau, fermentų atranka (auto)replikacija erdvėsryrių būdu vyksta emulsijoje, o atrenkamą fermentą koduojantis genas yra padauginamas emulsinio PGR metu.

Šis išradimas taip pat apima modifikuotos biomolekulės tikslinį žymėjimą, apimant ir reporterinės grupės žymėjimą, kuri leidžia identifikuoti pažymėtą biomolekulę tarp kitų nežymėtų molekulių.

Taip pat, išradimas taikytinas ir tikslinei mutagenezei. Tiksliau, išradimas apima modifikuoto nukleotido tikslinį prijungimą prie oligonukleotido ar ilgesnio DNR fragmento, ir tokios modifikuotos nukleorūgšties molekulės padauginimą, kuomet modifikuoto nukleotido nukleobazė yra poruojama pagal komplementarumo principą ne su natūraliai priskirta nukleobaze, t.y., A su T ir C su G, o modifikuoto nukleotido nukleobazė sąveikauja su kita modifikuoto nukleotido nukleobaze arba, pvz., modifikuoto citidino nukleobazė sudaro sąveikas ne su guaninu, o su kita, bet kokia nukleorūgšties molekulėje esančia nukleobaze.

Išradimas taikytinas N^4 -modifikuotų citidino nukleotidų panaudojimui kaip „prisiuvimo“ (angl. *cross-linking*) komponentams. Taip pat, šis išradimas apima N^4 -modifikuotų citidino analogų įjungimą į oligonukleotidą ir tokių oligonukleotidų panaudojimą prisiuvant prie įvairių paviršių. Šiuo atveju, sąvoka paviršius apima tiek biomolekulių paviršių (pvz., baltymo ar nukleorūgšties), tiek įvairių specialiai paruoštų arba natūralių paviršių, pvz., polietilenas arba polistirenas, ir kiti.

Šis išradimas taip pat apima N^4 -modifikuotų citidino analogų pritaikymą DNR fragmentacijos aptikimui. Čia aprašomi modifikuoti nukleotidai, esantys ląstelės fragmentuotos DNR sudėtyje galėtų būti panaudojami papildomam žymėjimui su dažo molekule. Tiksliau, tokia detekcija leistų pažymėti tik tas ląsteles, kuriose buvo pradėtos apoptozės signalinės kaskados.

Brėžinių/paveikslų aprašymas

Siekiant iliustruoti pagrindinius šio išradimo požymius šis aprašymas apima du paveikslus:

1 pav. Pradmens ilginimo reakcijos su nuo matricos priklausoma Taq polimeraze PAGE. Jame pavaizduota pradmens ilginimo reakcijų, naudojant nuo matricos priklausomą Taq DNR polimerazę, PAGE analizė. Pradmens ilginimo reakcijų sąlygos nurodytos 8 pavyzdyje.

2 pav. Pradmens ilginimo reakcijos su nuo matricos nepriklausoma TdT PAGE. Jame pavaizduota pradmens ilginimo reakcijų naudojant nuo matricos nepriklausomą terminalinę deoksinukleotidiltransferazę PAGE analizė. Pradmens ilginimo reakcijų sąlygos nurodytos 9 pavyzdyje.

Detalus išradimo aprašymas

Tekste naudojamos santrumpos:

2'-OME – 2'-O-metil-

2'-OMOE – 2'-O-metoksietil-

Apo-B – apolipoproteinas B

B₀ – pradinė biblioteka

BMR – branduolių magnetinis rezonansas

DCC – *N,N*-dicikloheksilkarbodiimidaz

DEAE – dietilaminoetil

DMF – *N,N*-dimetilformamidas

DTT – ditionitritolis

EDTA – etilendiaminotetraacto rūgštis

EtOAc – etilacetatas

IPTG – izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozidas

iRNR – informacinė RNR

JSA – jaučio serumo albuminas

KFV – kolonijas formuojantys vienetai

LNR – užrakintos nukleorūgštys

NDS – natrio dodecilsulfatas

ON – oligonukleotidas

PAGE – poliakrilamidinio gelio elektroforezė

PEG – polietilenglikolis

PMO – fosforodiamidato-morfolino oligomeras

PNR – peptido nukleorūgštys

POCl₃ – fosforo oksichloridas

PS – fosforotioatas

RNRi – RNR interferencija

SELEX – aptamerų atrankos *in vitro* procesas (angl. *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*)

TBA – tributilaminas

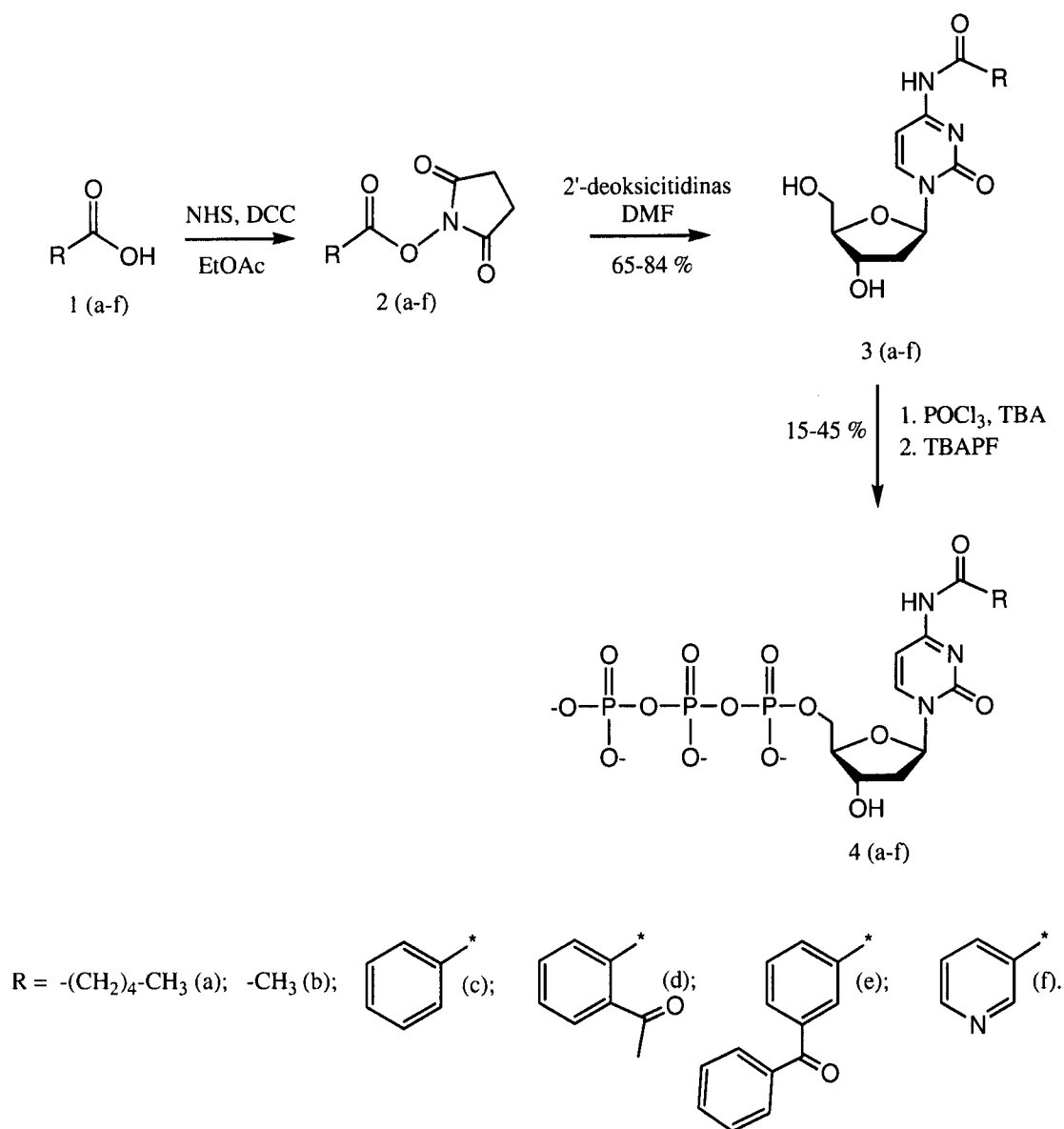
TBAPF – tributilamonio pirofosfato

TBE – Tris-boratinis-EDTA buferinis tirpalas

TdT – terminalinė deoksinukleotidil transferazė

TLC – plonasluoksnė chromatografija

Nauji išradimo junginiai sintetinami pagal sintezės Schema I:



Schema I. *N*⁴-Acil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfatų 4 (a-f) sintezė. Modifikuoti 4-toje heterociklinės bazės padėtyje 2'-deoksicitidinais buvo gauti acilinant atitinkamos karboksirūgšties aktyviu NHS esteriu 2'-deoksicitidiną. Išgryninus susintetintus nukleozidus kolonėlių chromatografijos metodu, *N*⁴-acil-2'-deoksicitidinais išskirti 65–84 % išeigomis. Susintetinti modifikuoti nukleozidai fosforinami fosforo oksichloridu, gauti monofosfatai neišskiriant iš reakcijos mišinio toliau veikiama tributilamonio pirofosfatu. Susintetinti modifikuoti nukleozidų trifosfatai išgryninami jonų mainų chromatografijos būdu naudojant DEAE-Sephadex A25 kolonėlę, eliuojant LiCl. Po jonų mainų chromatografijos nukleotidai gryninami dar kartą atvirkščių fazių chromatografijos metodu. *N*⁴-Acil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfatai susintetinti 15–45 % išeigomis. Junginių struktūros patvirtintos BMR spektroskopinės bei HPLC-MS analizių duomenimis.

Šiame aprašyme terminas „nukleotidas“ reiškia ribonukleozido arba deoksiribonukleozido trifosfatas, arba modifikuota jų formą, arba analogas. Nukleotidai gali būti sudaryti iš purino (pvz., adenino, guanino, hipoksantino arba jų darinių ir analogų) arba pirimidino (citozino, timino, uracilo arba jų darinių ir analogų) nukleobazių.

Terminas „nukleorūgštis“ reiškia DNR, RNR, DNR-RNR hibrido arba modifikuotos DNR ar RNR molekulę. Terminas „oligonukleotidas“ reiškia oligoribonukleotidą arba oligodeoksiribonukleotidą.

Terminai „modifikuotas“, „modifikacija“, „modifikuoti“ ir kiti žodžių dariniai, turintys tą pačią šaknį, ir naudojami kartu su terminu „nukleotidas“ arba „oligonukleotidas“ reiškia, kad nukleotidas turi papildomą cheminę grupę, kurios nėra natūraliuose nukleoziduose (t.y., adenzinas, guanozinas, citidinas, timidinas, uridinas), ir bent vienas iš ON sudarančių natūralių nukleozidų (t.y., adenzinas, guanozinas, citidinas, timidinas, uridinas) yra jo analogas. Taip pat modifikacijos gali apimti fosfodiesterinį karkasą, papildomas metil- grupes, neįprastas nukleobazių komplementarios sąveikos kombinacijas, 3' ir 5' galų modifikacijas (pvz., kepurinimas). Taip pat, bet kuri hidroksi- grupė, esanti ant nukleotido angliavandenio (pvz., ribozės, deoksiribozės ar kito monosacharido) dalies gali būti pakeista fosfonil ar fosforil grupe, apsaugota standartinėmis blokuojančiomis grupėmis arba aktyvuota papildomoms jungtims. 3' ir 5' galų hidroksi grupės gali būti fosforilintos, pakeistos amino grupėmis arba kitomis organinių junginių funkcinėmis grupėmis.

Taip pat ON gali būti sudaryti iš ribozei ir deoksiribozei alternatyvių monosacharidų, apimant 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-O-etil-, 2'-O-propil-, 2'-metoksietil-, 2'-O-fluoro-, 2'-O-amino-, 2'-O-azido- pentozes, α -anomerus, kitas aldopentozes (t.y., arabinozę, ksilozę, liksozę), piranozes, aciklinius analogus.

Gali būti modifikuojamas nukleotidas arba ON. ON gali būti papildomai modifikuojamas, pvz., konjuguojant su kitomis molekulėmis.

Terminas „aptameras“ reiškia natūraliai neegzistuojančią nukleorūgšties molekulę, kuri pasižymi pageidaujamu poveikiu taikinio molekulei. Pageidaujamas poveikis gali būti, bet nėra ribojamas, i) sąveika su taikiniu prisijungiant, ii) kataliziniu taikinio keitimu, iii) reakcija su taikiniu modifikuojant taikinį, keičiant taikinio sudėtį ar keičiant funkcinį taikinio aktyvumą, iv) kovalentinė sąveika su taikiniu (pvz., kaip savižudžiai slopikliai), v) reakcijos tarp taikinio ir kitos molekulės skatinimas.

Šiame aprašyme „autoreplikacija erdvėskyriuose“ (angl. *compartmentalized self-replication*) reiškia evoliucijos *in vitro* atrankos metodą, kai iš mutantinių polimerazių bibliotekos tik aktyvios polimerazės padaugina savo geną esant išoriniam spaudimui, ir padauginimas vyksta erdvėskyriuose. Terminas erdvėskyris (angl. *compartment*) reiškia mažus vandeninius lašelius esančius emulsijoje, t.y., vandeninio tirpalo ir aliejinio skysčio mišinyje. Emulsija gali

būti paruošiama iš įvairių vandeninių tirpalų ir aliejinių skysčių. Laikoma, kad vidutiniškai tokioje emulsijoje yra 10^{10} /mL vandeninių lašelių/erdvėskyrių. Taip pat yra laikoma, kad statistiškai į vieną tokį lašelį patenka tik viena ląstelė. Kartu su ląstele į lašelį patenka emulsinei PGR reikalingi reagentai, t.y., buferinis tirpalas, nukleotidai, polimerazę koduojantis genas, pradmenys, papildomi reagentai ar fermentai. Papildomi reagentai ir fermentai gali būti bet kokie komponentai reikalingi PGR ar kitoms atrankos metu vykdomoms reakcijoms. Išradimo pavyzdžiuose yra aprašyti papildomi atrankos žingsniai bei reikalingi papildomi komponentai, bet išradimas nėra ribojamas šiais pavyzdžiais ir papildomi atrankos žingsniai gali varijuoti.

Terminas „išorinis spaudimas“ reiškia atrankos metu naudojamą ypatingą eksperimento sąlygą, pvz., aukštesnę ar žemesnę temperatūrą, kitas reakcijos sudedamąsias dalis, praplovimo kiekį ir trukmę, kuri lemia tai, jog yra padauginami tik tie variantai, kurie išlieka aktyvūs esant ypatingoms sąlygoms. Šiame aprašyme terminai „išorinis spaudimas“ ir „evoliucijos spaudimas“ yra naudojami kaip sinonimai, ir turi tą pačią prasmę.

Šiame aprašyme „kooperatyvi replikacija erdvėskyriuose“, (angl. *compartmentalized partnered-replication*) reiškia evoliucijos *in vitro* atrankos arba paieškos metodą, kai iš baltymų bibliotekos esant išoriniam spaudimui tik aktyvūs variantai sukuria sąlygas papildomai polimerazei padauginti aktyvų baltymą koduojantį geną, ir padauginimas vyksta erdvėskyriuose.

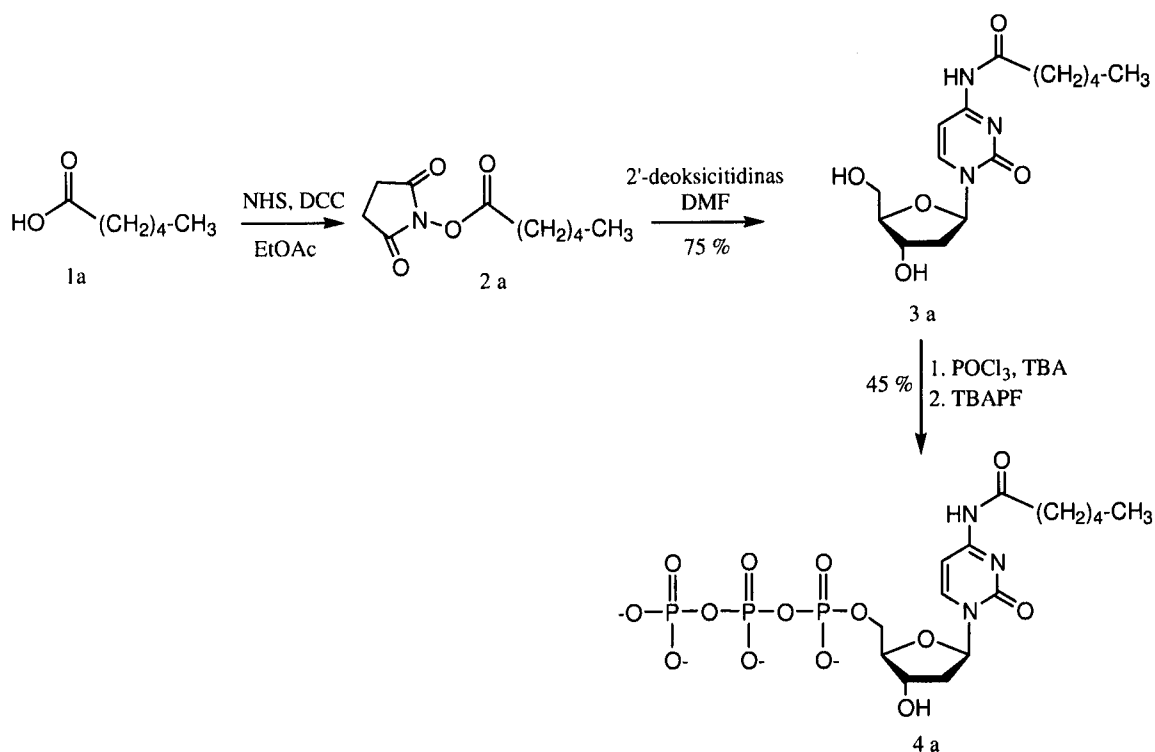
Terminas „fermentų biblioteka“ reiškia genų, įklonuotų į raiškos vektorius, rinkinį. Fermentų biblioteka gali būti metagenominė biblioteka arba mutantų biblioteka. Metagenominė biblioteka naudojama naujų nežinomų fermentų paieškai iš įvairių aplinkos mikroorganizmų šaltinių, pvz., dirvožemio, jūros vandens, dumblo ir t.t. Mutantų biblioteka naudojama žinomų fermentų, su naujomis mutacijomis, pagerinančiomis/pakeičiančiomis fermento savybes, atrankai.

Terminas „prisiuvimas“ (angl. *cross-linking*) reiškia kovalentinio ryšio susidarymą tarp dviejų polimerų. Čia, terminas „polimeras“ reiškia bet kokią biologinę molekulę (baltymas, nukleorūgštis, lipidai ir kt.) arba nebiologinius polimerus (pvz., poliesteris, polistirenas, polietilenas, poli(metilmetakrilatas) ir kt.).

Išradimo įgyvendinimo pavyzdžiai

Žemiau yra pateikti išradimo junginių sintezės ir pritaikymo pavyzdžiai. Šie pavyzdžiai yra pateikti kaip išradimo pavyzdžiai. Išradimas nėra ribojamas šiais pavyzdžiais.

Pavyzdys 1. *N*⁴-Heksanoil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfato (junginys 4a) gavimas. Junginys sintetinas pagal Schema II



Schema II. *N*⁴-Heksanoil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfato (4a) sintezė.

***N*⁴-Heksanoil-2'-deoksicitidino 3a sintezė.** Heksano rūgštis (58 mg, 0,5 mmol), *N*-hidroksisukcinimidas (NHS, 63 mg, 0,55 mmol) ir *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimididas (DCC, 113 mg, 0,55 mmol) ištirpinami 15 mL etilacetato (EtOAc) ir maišoma kambario temperatūroje 20 h. Susidariusios nuosėdos nufiltruojamos, filtrate lieka ištirpusi aktyvuota rūgštis 2a. Etilacetatas nugarinamas rotaciniu garintuvu. Aktyvuota heksano rūgštis tirpinama 1,5 mL *N,N*-dimetilformamido (DMF), sudedama 103 mg (0,45 mmol) 2'-deoksicitidino. Reakcijos mišinys maišomas 30–35 °C temperatūroje 24–48 valandas. Reakcijos eiga stebima plonasluoksne chromatografija (TLC, chloroformas/metanolis, 9/1). Reakcijai įvykus (TLC), DMF nugarinamas rotaciniu garintuvu. Likusios nuosėdos ištirpinamos chloroforme ir gryninamos kolonėlių chromatografijos būdu (silikagelis, chloroformas/metanolis, 10:0→10:1). Gauta 122 mg, (75 % išeiga). MS (ESI⁺): *m/z* 326,10 [M+H]⁺; 324,10 [M-H]⁻. UV λ_{max} 247; 298 nm. ¹H-BMR (DMSO-*d*₆): δ = 0,86 (t, 3H, *J* = 6,8 Hz, CH₃); 1,22 (m, 4H, CH₂); 1,52 (m, 2H, CH₂); 2,02 (m, 1H, CH₂); 2,29 (m, 1H, CH₂); 2,39 (t, 2H, *J* = 7,3 Hz, CH₂); 3,61 (m, 1H, CH₂); 3,74 (m, 1H, CH₂); 3,93 (m, 2H, CH); 5,04 (s, 1H, OH); 5,26 (s, 1H, OH); 6,11 (t, 1H, *J* = 6,0 Hz, CH); 7,23 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, CH=CH); 8,32 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, CH=CH); 10,83 (s, 1H, NH). ¹³C-BMR (DMSO-*d*₆): δ = 14,26; 22,29; 24,61; 25,69; 31,18; 36,24; 61,42; 70,40; 86,60; 88,37; 95,72; 145,41; 154,93; 162,77; 174,39.

***N*⁴-Heksanoil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfato 4a sintezė.** Susintetintas 3a *N*⁴-heksanoil-2'-deoksicitidinas (98 mg, 0,3 mmol), tributilaminas (TBA, 143 μL, 0,6 mmol) suspenduojami 1,5 mL trimetilfosfato ir atšaldoma iki 0–4 °C temperatūros. Į atšaldytą reakcijos mišinį sulašinamas

fosforo oksichloridas (POCl_3 , 56 μL , 0,6 mmol) ir maišoma 0–4 °C temperatūroje 60–120 min. Reakcijos eiga stebima atliekant TLC analizę, eliuentas 1,4-dioksan/2-propanolis/vanduo/ NH_4OH , 4/2/2/1. Susidarius N^4 -heksanoil-2'-deoksicitidino monofosfatui, į reakcijos mišinį įpilama 72 μL (0,3 mmol) TBA ir 3 mL 0,5 M tributilamonio pirofosfato tirpalo (TBAPF, 1,5 mmol) acetonitrile. Maišoma 10–15 min. Reakcija stabdoma pilant atšaldytą vandenį ir neutralizuojama sočiu natrio hidrokarbonato tirpalu iki pH 6–7.

Reakcijos mišinys gryninamas jonų mainų chromatografijos būdu naudojant DEAE-Sephadex A25 kolonėlę (30 mL), eliuojant LiCl gradientu (0,05–0,4 M). Produktas eliuojamas 0,25–0,3 M LiCl, frakcijų grynumas tikrinamas TLC (eliuentas 1,4-dioksan/2-propanolis/vanduo/ NH_4OH , 4/2/5/1). Frakcijos, kuriose yra grynas N^4 -heksanoil-2'-deoksicitidino trifosfatas, sujungiamos. Tirpalas nugarinamas rotaciniu garintuvu iki kelių mililitrų ir supilama į 30–40 mL acetono/metanolio, 4/1 mišinį. Susiformavusios nuosėdos centrifuguojamos (4000 rpm, 10 min.) ir du kartus plaunamos acetono/metanolio, 4/1 mišiniu. Nukleotidas tirpinamas 2–3 mL vandens, nugarinami tirpikliai likučiai ir neutralizuojama 1 M natrio hidroksido tirpalu iki pH 7,0.

Susintetintas nukleotidas, išgrynintas jonų mainų chromatografijos būdu, gryninamas dar kartą atvirkščių fazių chromatografijos metodu. Gryninimui naudota 12 g C18 kolonėlė, eliuentas vanduo/metanolis, 10:0→10:2. Trifosfatas eliuojamas 15–20 % metanolis/vanduo mišiniu, frakcijų grynumas tikrinamas TLC (eliuentas 1,4-dioksan/2-propanolis/vanduo/ NH_4OH , 4/2/5/1). Frakcijos, kuriose yra grynas N^4 -heksanoil-2'-deoksicitidino trifosfatas, sujungiamos. Nugarinus tirpiklius, trifosfatas ištirpinami 2–3 mL vandens, neutralizuojamas 1 M natrio hidroksido tirpalu iki pH 7,0 ir nufiltruojamas per 0,45 μm PTFE filtrą. Spektrofotometriškai išmatuojamos išgryninto trifosfato tirpalo absorbcijos, apskaičiuojama koncentracija bei medžiagos kiekis. Gauta 5,2 mL, 26 mM, 135 mmol (45 % išeiga). MS (ESI^+): m/z 566,05 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; 564,05 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$. UV λ_{max} 246; 298 nm. ^1H -BMR (D_2O): δ = 0,75 (t, 3H, J = 7,0 Hz, CH_3); 1,20 (m, 4H, CH_2); 1,54 (m, 2H, CH_2); 2,24 (m, 1H, CH_2); 2,38 (t, 2H, J = 7,4 Hz, CH_2); 2,40 (m, 1H, CH_2); 4,09 (m, 1H, CH); 4,14 (m, 2H, CH_2); 4,54 (m, 1H, CH); 6,15 (t, 1H, J = 6,2 Hz, CH); 7,26 (d, 1H, J = 7,5 Hz, CH=CH); 8,28 (d, 1H, J = 7,5 Hz, CH=CH). ^{31}P -BMR (D_2O): δ = –20,54 (t, J = 19,7 Hz, P β); –9,23 (d, J = 18,7 Hz, P α), –7,19 (d, J = 19,8 Hz, P γ).

Pavyzdys 2. N^4 -Acetil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfato (junginys 4b) gavimas. Junginys sintetinamas kaip aprašyta pavyzdyje 1 (junginys 4a) iš acto rūgšties 1b.

N^4 -Acetil-2'-deoksicitidinas, 3b. Gauta 105 mg, (78 % išeiga). MS (ESI^+): m/z 270,10 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; 268,10 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$. UV λ_{max} 246; 298 nm. ^1H -BMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ = 2,04 (m, 3H, CH_3); 2,11 (m, 1H, CH_2); 2,41 (m, 1H, CH_2); 4,12 (m, 3H, CH, CH_2); 4,46 (m, 1H, CH); 5,04 (s, 1H, OH); 5,27 (s, 1H, OH); 6,12 (t, 1H, J = 6,0 Hz, CH); 7,20 (d, 1H, J = 7,5 Hz, CH=CH); 8,26 (d, 1H, J = 7,5 Hz, CH=CH); 10,81 (s, 1H, NH). ^{13}C -BMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ = 23,98; 39,72; 63,59; 69,73; 85,35; 87,10; 98,35; 145,57; 156,96; 162,57; 173,34.

N⁴-Acetil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfatas, 4b. Gauta 3,2 mL, 23 mM, 74 mmol (25 % išeiga). MS (ESI⁺): m/z 510,00 [M+H]⁺; 508,00 [M-H]⁻. UV $\lambda_{\max}$ 243; 296 nm. ¹H-BMR (D₂O): δ = 2,08 (m, 3H, CH₃); 2,21 (m, 1H, CH₂); 2,40 (m, 1H, CH₂); 4,11 (m, 3H, CH, CH₂); 4,47 (m, 1H, CH); 6,11 (t, 1H, J = 6,0 Hz, CH); 7,20 (d, 1H, J = 7,5 Hz, CH=CH); 8,26 (d, 1H, J = 7,5 Hz, CH=CH). ³¹P-BMR (D₂O): δ = -20,61 (t, J = 18,8 Hz, P β); -10,94 (d, J = 18,7 Hz, P α); -5,24 (d, J = 18,9 Hz, P γ).

Pavyzdys 3. N⁴-Benzoil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfato (junginys 4c) gavimas.

Junginys sintetinamas kaip aprašyta pavyzdyje 1 (junginys 4a) iš benzoinės rūgšties 1c.

N⁴-Benzoil-2'-deoksicitidinas, 3c. Gauta 132 mg, (80 % išeiga). MS (ESI⁺): m/z 332,10 [M+H]⁺; 330,10 [M-H]⁻. UV $\lambda_{\max}$ 256; 303 nm. ¹H-BMR (DMSO-*d*₆): δ = 2,34 (m, 2H, CH₂); 3,74 (m, 2H, CH₂); 4,05 (m, 1H, CH); 4,54 (m, 1H, CH); 5,03 (s, 1H, OH); 5,26 (s, 1H, OH); 6,12 (t, 1H, J = 6,1 Hz, CH); 7,26 (d, 1H, J = 7,5 Hz, CH=CH); 7,40 (t, 2H, J = 7,6 Hz, CH); 7,65 (t, 1H, J = 7,5 Hz, CH); 7,87 (dd, 2H, J = 8,4; 1,2 Hz, CH); 8,29 (d, 1H, J = 7,5 Hz, CH=CH); 10,64 (s, 1H, NH). ¹³C-BMR (DMSO-*d*₆): δ = 38,77; 61,78; 70,31; 85,90; 86,86; 96,25; 128,13; 128,60; 131,75; 135,04; 143,10; 155,02; 168,20; 169,17.

N⁴-Benzoil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfatas, 4c. Gauta 6,5 mL, 17 mM, 110 mmol (37 % išeiga). MS (ESI⁺): m/z 572,05 [M+H]⁺; 570,00 [M-H]⁻. UV $\lambda_{\max}$ 257; 303 nm. ¹H-BMR (D₂O): δ = 2,28 (m, 1H, CH₂); 2,50 (m, 1H, CH₂); 4,18 (m, 3H, CH, CH₂); 4,54 (m, 1H, CH); 6,19 (t, 1H, J = 6,3 Hz, CH); 7,39 (d, 1H, J = 7,5 Hz, CH=CH); 7,48 (t, 2H, J = 7,8 Hz, CH); 7,61 (t, 1H, J = 7,5 Hz, CH); 7,82 (dd, 2H, J = 8,4; 1,2 Hz, CH); 8,34 (d, 1H, J = 7,5 Hz, CH=CH). ³¹P-BMR (D₂O): δ = -20,69 (t, J = 19,1 Hz, P β); -10,95 (d, J = 18,7 Hz, P α); -5,33 (d, J = 19,1 Hz, P γ).

Pavyzdys 4. N⁴-Benzoil-2-acetil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfato (junginys 4d) gavimas.

Junginys sintetinamas kaip aprašyta pavyzdyje 1 (junginys 4a) iš 2-acetil-benzoinės rūgšties 1d.

N⁴-Benzoil-2-acetil-2'-deoksicitidinas, 3d. Gauta 121 mg, (65 % išeiga). MS (ESI⁺): m/z 374,05 [M+H]⁺; 372,10 [M-H]⁻. UV $\lambda_{\max}$ 265; 307 nm. ¹H-BMR (DMSO-*d*₆): δ = 2,09 (s, 3H, CH₃); 2,35 (m, 2H, CH₂); 3,63 (m, 2H, CH₂); 3,90 (m, 1H, CH); 4,25 (m, 1H, CH); 5,09 (s, 1H, OH); 5,30 (s, 1H, OH); 6,16 (t, 1H, J = 6,2 Hz, CH); 6,85 (d, 1H, J = 7,5 Hz, CH=CH); 7,53 (m, 2H, CH); 7,62 (m, 1H, CH); 7,80 (m, 1H, CH); 8,44 (d, 1H, J = 7,5 Hz, CH=CH); 10,57 (s, 1H, NH). ¹³C-BMR (DMSO-*d*₆): δ = 28,25; 39,10; 61,67; 70,32; 86,07; 86,86; 96,25; 127,18; 131,68; 131,98; 135,50; 142,76; 154,60; 168,40; 171,88; 177,60.

N⁴-Benzoil-2-acetil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfatas, 4d. Gauta 2,8 mL, 17 mM, 48 mmol (16 % išeiga). MS (ESI⁺): m/z 614,00 [M+H]⁺; 612,00 [M-H]⁻. UV $\lambda_{\max}$ 267; 307 nm. ¹H-BMR (D₂O): δ = 1,97 (s, 3H, CH₃); 2,29 (m, 1H, CH₂); 2,49 (m, 1H, CH₂); 4,14 (m, 3H, CH, CH₂); 4,32 (m, 1H, CH); 6,19 (t, 1H, J = 6,0 Hz, CH); 7,39 (d, 1H, J = 7,6 Hz, CH=CH); 7,57 (m, 1H, CH); 7,66 (m, 2H, CH); 7,78 (m, 1H, CH); 8,33 (d, 1H, J = 7,6 Hz, CH=CH). ³¹P-BMR (D₂O): δ = -20,26 (t, J = 18,5 Hz, P β); -10,80 (d, J = 18,5 Hz, P α); -4,91 (d, J = 18,2 Hz, P γ).

Pavyzdys 5. *N*⁴-Benzoil-3-benzoil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfato (junginys 4e) gavimas. Junginys sintetinamas kaip aprašyta pavyzdyje 1 (junginys 4a) iš 3-benzoil-benzoinės rūgšties 1e.

***N*⁴-Benzoil-3-benzoil-2'-deoksicitidinas, 3e.** Gauta 152 mg, (70 % išeiga). MS (ESI⁺): *m/z* 436,10 [M+H]⁺; 434,10 [M-H]⁻. UV $\lambda_{\max}$ 255; 303 nm. ¹H-BMR (DMSO-*d*₆): δ = 2,07 (m, 1H, CH₂); 2,33 (m, 1H, CH₂); 3,63 (m, 2H, CH₂); 3,89 (m, 1H, CH); 4,25 (m, 1H, CH); 5,06 (s, 1H, OH); 5,29 (s, 1H, OH); 6,15 (t, 1H, *J* = 6,3 Hz, CH); 7,38 (d, 1H, *J* = 7,0 Hz, CH=CH); 7,60 (m, 2H, CH); 7,73 (m, 1H, CH); 7,77 (m, 2H, CH); 7,83 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz, CH); 8,16 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz, CH); 8,44 (d, 1H, *J* = 7,0 Hz, CH=CH); 11,45 (s, 1H, NH). ¹³C-BMR (DMSO-*d*₆): δ = 41,10; 61,42; 70,39; 86,78; 88,45; 107,18; 129,12; 129,22; 129,84; 130,19; 133,62; 136,96; 140,46; 145,21; 163,02; 168,56; 188,32; 195,80.

***N*⁴-Benzoil-3-benzoil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfatas, 4e.** Gauta 6 mL, 20 mM, 120 mmol (40 % išeiga). MS (ESI⁺): *m/z* 676,05 [M+H]⁺; 674,05 [M-H]⁻. UV $\lambda_{\max}$ 257; 302 nm. ¹H-BMR (D₂O): δ = 2,25 (m, 1H, CH₂); 2,45 (m, 1H, CH₂); 4,17 (m, 3H, CH, CH₂); 4,53 (m, 1H, CH); 6,15 (t, 1H, *J* = 6,0 Hz, CH); 7,31 (d, 1H, *J* = 7,0 Hz, CH=CH); 7,47 (m, 2H, CH); 7,63 (m, 4H, CH); 7,90 (m, 1H, CH); 8,06 (m, 2H, CH); 8,31 (d, 1H, *J* = 7,0 Hz, CH=CH). ³¹P-BMR (D₂O): δ = -20,58 (t, *J* = 18,5 Hz, P β); -10,91 (d, *J* = 18,4 Hz, P α); -5,28 (d, *J* = 18,4 Hz, P γ).

Pavyzdys 6. *N*⁴-Nikotinoil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfato (junginys 4f) gavimas. Junginys sintetinamas kaip aprašyta pavyzdyje 1 (junginys 4a) iš nikotino rūgšties 1f.

***N*⁴-Nikotinoil-2'-deoksicitidinas, 3f.** Gauta 140 mg, (84 % išeiga). MS (ESI⁺): *m/z* 333,05 [M+H]⁺; 331,05 [M-H]⁻. UV $\lambda_{\max}$ 253; 307 nm. ¹H-BMR (DMSO-*d*₆): δ = 2,07 (m, 1H, CH₂); 2,33 (m, 1H, CH₂); 3,62 (m, 2H, CH₂); 3,89 (m, 1H, CH); 4,25 (m, 1H, CH); 5,09 (t, 1H, *J* = 5,1 Hz, OH); 5,30 (d, 1H, *J* = 4,2 Hz, OH); 6,14 (t, 1H, *J* = 6,3 Hz, CH); 7,33 (s, 1H, CH=CH); 7,55 (dd, 1H, *J* = 7,9; 4,9 Hz, CH); 8,33 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, CH); 8,42 (d, 1H, *J* = 7,3 Hz, CH=CH); 8,77 (d, 1H, *J* = 4,9 Hz, CH); 9,11 (s, 1H, CH); 11,50 (s, 1H, NH). ¹³C-BMR (DMSO-*d*₆): δ = 41,39; 49,06; 61,41; 70,38; 86,73; 88,45; 96,53; 128,89; 129,68; 136,61; 145,58; 149,84; 158,38; 163,17; 173,48.

***N*⁴-Nikotinoil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfatas, 4f.** Gauta 3 mL, 15 mM, 45 mmol (15 % išeiga). MS (ESI⁺): *m/z* 573,00 [M+H]⁺; 571,00 [M-H]⁻. UV $\lambda_{\max}$ 256; 305 nm. ¹H-BMR (D₂O): δ = 2,26 (m, 1H, CH₂); 2,47 (m, 1H, CH₂); 4,42 (m, 4H, CH₂, CH); 6,16 (t, 1H, *J* = 6,1 Hz, CH); 7,37 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, CH=CH); 7,51 (dd, 1H, *J* = 7,8; 5,1 Hz, CH); 8,22 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz, CH); 8,35 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, CH=CH); 8,64 (s, 1H, CH); 8,89 (s, 1H, CH). ³¹P-BMR (D₂O): δ = -20,67 (t, *J* = 18,5 Hz, P β); -10,92 (d, *J* = 18,5 Hz, P α); -6,06 (d, *J* = 18,2 Hz, P γ).

Pavyzdys 7. Fermentų, skaidančių amidinį modifikuoto dNTP ryšį, atranka

Šis išradimas aprašo metodą, kurio metu vykdoma fermentų atranka *in vitro*. Fermentų atranka *in vitro* vykdoma emulsijoje, replikacijos erdvėskyriuose būdu. Atrankami fermentai katalizuoja

modifikuoto dNTP (4 a-e) amidinio ryšio hidrolizę, susidarant natūraliam dNTP. Po hidrolizės, emulsijoje esančiuose vandens lašeliuose (erdvėskyriuose) susidaro visi keturi natūralūs dNTP, reikalingi PGR. Papildoma DNR polimerazė padaugina atrenkamą fermentą koduojantį geną.

Atrankai naudojama metagenominė fermentų biblioteka (B_0) buvo sudaryta iš plazmidžių, kurias sudaro į pET28b raiškos vektorių įklonuoti DNR fragmentai, gauti paveikus chromosominę DNR atitinkamomis restrikcijos endonukleazėmis. B_0 buvo transformuojamos *E. coli* BL21(DE3) bakterijos ir nustatomas ląstelių kiekis, kuris prilyginamas B_0 dydžiui. Nustatytas B_0 dydis $\sim 5 \times 10^7$ skirtingų variantų.

Toliau metagenominė biblioteka yra paruošiama fermentų paieškai. Į 50 mL LB terpės su atitinkamu antibiotiku užsėjama 5×10^9 metagenominės bibliotekos ląstelių. *E. coli* BL21(DE3) bakterijos auginamos 37 °C temperatūroje aeruojant, kol optinis tankis esant 600 nm bangos ilgiui (A_{600}) pasieka 0,7. Tuomet vykdoma genų raiškos indukcija IPTG, galutinei jo koncentracijai esant 0,5 mM. Po indukcijos ląstelės auginamos 2 val., tuomet atšaldomos ledo vonioje. Bakterijų tankis (kolonijas sudarantys vienetai (KSV)/mL) nustatomas spektrofotometriškai. Ląstelių suspensija išpilstoma po 1 mL, ląstelės surenkamos centrifuguojant šaldant (1 min. 3300g). Tuomet ląstelės suspenduojamos 1 mL 0,9 % NaCl tirpalo ir dar kartą centrifuguojamos šaldant. Po to, ląstelės vėl suspenduojamos 0,5 mL 1 x PGR buferinio tirpalo. Į paruoštą ląstelių suspensiją dedama 10 μ L šviežiai paruošto 20 μ g/ μ L lizocimo tirpalo ir inkubuojama 10 min. 37 °C temperatūroje. Lizocimu paveikta ląstelių suspensija naudojama PGR emulsijoje.

Ruošiama aliejinė fazė (50 mL), sudaryta iš 97,95 % mineralinės alyvos, 2 % ABIL EM 90, 0,05 % Triton X-100. Aliejinė fazė gerai suplakama.

Ruošiamas PGR mišinys (300 μ L), sudarytas iš 1 x komercinio HF PGR buferinio tirpalo, 0,33 μ M T7prom pradmens, 0,33 μ M T7ter pradmens, po 2 mM natūralių dNTP (dATP, dTTP, dGTP), 3 mM modifikuoto dCTP, 0,5 μ g/mL JSA, 0,6 vnt. Phusion DNR polimerazės (Thermo Fisher Scientific). Pradmenų sekos: tiesioginis pradmuo (T7prom) SEQ ID Nr. 8: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGA-3'; atvirkštinis pradmuo (T7ter) SEQ ID Nr. 9: 5'-CTAGTTATTGCTCAGCGGTG-3'. Į paruoštą PGR mišinį dedama po 1×10^7 lizocimu paveiktų ląstelių ir mišinys plakamas į emulsiją šaldant, pagal modifikuotą Williams metodiką (Williams et al. 2006). PGR mišinys sulašinamas į aliejinį tirpalą maišant ant magnetinės maišyklės, esant 1700 aps./min. greičiui. Per 2 min. į 700 μ L aliejinio tirpalo sulašinama 300 μ L PGR mišinio, ir emulsija maišoma dar 5 min.

Ląstelių, esančių emulsijoje, ardymas vykdomas atliekant keturis šildymo (10 min. 37 °C) ir šaldymo (10 min. -70 °C) ciklus. Po to, emulsija išpilstoma po 50 μ L ir vykdoma PGR. Papildomai atliekama vandeninio mišinio PGR kontrolė. PGR programa: 30 sek. 98 °C, 35 ciklai – 10 sek. 98 °C, 15 sek. 55 °C, 45 sek. 72°C, 3 min. 72 °C.

Po PGR vykdomas emulsijos ardymas pagal modifikuotą Williams metodiką (Williams et al. 2006). Emulsija centrifuguojama (10 min. 16000g) 37 °C temperatūroje. Vykdomi trys ekstrakcijos žingsniai: su dietileteriu, su vandeniu prisotintu etilacetatu, ir vėl su dietileteriu. Tirpiklio likutis nugarinamas.

Nukleorūgštys gryninamos naudojant „GeneJET™ PCR Purification Kit“ (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo rekomendacijas. Po gryninimo, siekiant pašalinti pradinę plazmidinę DNR, mišinys veikiamas dvigrandinę DNR hidrolizuojančia deoksiribonukleaze (dsDNaze). Reakcija vykdoma 5 min. 37 °C temperatūroje. Po to, vykdoma PGR produktų analizė elektroforezės būdu.

Gautas PGR produktų mišinys hidrolizuojamas atitinkamomis restrikcijos endonukleazėmis ir klonuojamas į paruoštą pET28b vektorių. Ligatu transformuojamos *E. coli* DH5α bakterijos, skiriama pavienių kolonijų plazmidinė DNR ir identifikuojamos atrinkta(-os) DNR seka(-os). Tokiu būdu buvo atrinkti trys DNR fragmentai – EST, D6 ir YqfB.

Toliau rekombinantiniai baltymai (EST, D6 ir YqfB), turintys 6xHis žymą baltymo N-gale, buvo išgryninti giminingumo chromatografijos būdu, bei buvo nustatyti jų aktyvumai. EST, D6 ir YqfB hidrolizuoja modifikuotų dCTP amidinį ryšį (amidazinis aktyvumas), taip pat pasižymi ir esteraziniu aktyvumu.

Visi trys atrasti baltymai pasižymi amidinio ryšio, esančio N4-modifikuotuose citidino nukleotiduose, hidrolize. Hidrolizės reakcija vyksta įvairiuose buferiniuose tirpaluose, 37 °C temperatūroje. Priklausomai nuo išgryninto baltymo koncentracijos, fermentinė reakcija trunka nuo keliasdešimt minučių iki kelių valandų. Baltymo N-gale esanti 6xHis žyma netrukdo fermentiniam aktyvumui. Taip pat, šie baltymai geba hidrolizuoti tiek modifikuoto citidino, tiek citidino trifosfato amidinį ryšį.

N4-modifikuotų citidino nukleotidų hidrolizė iki natyvaus nukleotido yra svarbi keliais aspektais. Vienas iš įvairių modifikuotų nukleotidų panaudojimų yra pritaikymas aptamerų technologijoje. Kuriant modifikuotus aptamerus gali prireikti pašalinti modifikacijos grupes, pvz., norint padauginti aptamerų sekas naudojant polimerazes, kurios neatpažįsta modifikuotų grupių. Tokiu būdu, turint selektyvius fermentus hidrolizuojančius amidinį ryšį (tačiau lygiai toks pats principas galiotų ir kitokiam ryšiui bei atitinkančiam fermentui), galima gauti aptamerus, sudarytus iš natyvių nukleotidų. Apamerai, sudaryti iš natyvių nukleotidų, galėtų būti padauginti įprastomis sąlygomis. Tokiu būtu atsikratoma būtinybės ieškoti polimerazės arba kurti mutantinę polimerazę, gebančią padauginti modifikuotą seką.

Viena iš daug žadančių šių baltymų panaudojimo sričių yra detoksifikacija. Jau kurį laiką chroniniai uždegimai buvo siejami su įvairiomis senatvės ligomis, tačiau iki šiol nebuvo žinomos uždegimų priežastys. Inflamasoma, viduląstelinis multiproteininis oligomeras, yra atsakinga už uždegiminių procesų aktyvavimą. Inflamasoma skatina uždegiminio citokino interleukino 1β (IL-

1 β) susidarymą, kuris kartu su kitomis molekulėmis bei baltymais, dalyvauja imuniniame bei uždegiminiame atsake. Neseniai nustatyta, kad N4-acetil-citidinas, viduląstelinė pirimidinų metabolizmo tarpinė molekulė, yra aptinkama kraujyje pacientų, kuriems būdinga nukleotidų metabolizmo disfunkcija, padidėjęs oksidacinis stresas bei kraujospūdis, aterosklerozė ir biologinio senėjimo požymiai (Furman et al. 2017). Parodyta, kad N4-acetil-citidinas aktyvuoja NLRC4 inflamamosos susidarymą, indukuoja IL-1 β sintezę, aktyvuoja trombocitus bei neutrofilus ir padidina kraujospūdį pelėse. Taip pat, >85 metų individai pasižymi padidėjusia inflamamosos genų modulių sinteze, kuri siejama su visų priežasčių mirtingumu. Taigi vienas iš būdų kovoti su chroniniais uždegiminiais procesais, būdingais senatvėje, yra veikti prieš signalines ar kitas molekules, kurios skatina šių procesų veikimą bei plitimą. Žinant, kad N4-acetil-citidinas yra viena iš tokių molekulių, galima panaudoti vaistus, pagrįstus rekombinantiniais baltymais, kurie N4-acetil-citidiną paverčia natyviu citidinu. Taigi naujos čia aprašomos esterazės galėtų būti panaudojamos senyvų pacientų detoksifikacijai.

Atrastų fermentų aminorūgščių sekos:

EST (SEQ ID Nr. 1):

MSSSLFIGQVFAKTPEVQTSDLTGNTTCSNLVGMVIPADEIGLPTSGATITSATLKIVEDGAIKDAE
YCEVLGAIHPVDPTAPDINFQVNLPTNWNKKFLQFGGGYFNGTVRTGLGNPPAGDRKLGKNTPL
LAQQYVTFGSDSGNSTAPLDASFGMNDEALKNFAGDQLKKT KDVALALANVRYNAVDPDQVYF
AGGSEGGREGLFIVQNFPDEYDGVISVYPVLNWIPKALKDNRDAQALYKNDGEGWISPEENDLI
NETVFKACDSL DGVKDGIISNTSECAEKEDKILDTLSESLSEKQIEVIKSFNGPMEFDIQLANDFT
TMPGYSQLQGADIGRLFGTRPIPGVPPVSVSESVGHVIDEQDALMGVYSDQVIRYKITRNPDFNT
LTFDPNEYREEILKASNLLDVTDPNISEFRENGGKLILVHGTEDEM VAPQGTSDYYSKLVNEFG
QESLDEFAQYYLVPGFSHG GGNFTMSANLLGALDAWVVNGDVPSNLVAEDQNSATFGTRRPL
CEYPTYPQYNGSGDVNSAASF TCLKADKDKDISASDIQKLEKFEVDGEFANHGTARSLQAHL D
ILIKLESQERETVDQIVKHTQKFILLDNHKKN GKITDHAYNTLKELAESYIKQIK

D6 (SEQ ID Nr. 2):

MEQLKFQKNWNNKCS CDFFTTIRLKGPKYTVGKELEMRIYKGGVFQNHGMIRVASLRPIQLHQI
NEWISRLDSGLSPEELRSELFYMYKDKVADV NKVDFYLILCERVKSKPIQNALFSTESTPAHD

YqfB (SEQ ID Nr. 3):

MQPNDITFFQRFQDDILAGRKTITIRDESESHFKTGDVLRVGRFEDDGYFCTIEVTATSTVTLDT
LTEKHAEQENMTLTELKKVIADIYPGQTQFYVIEFKCL

Pavyzdys 8. Pradmens ilginimo reakcija su nuo matricos priklausoma polimeraze

Šis pavyzdys aprašo metodiką, kurios metu sintetinamos nukleorūgštys, turinčios išradime aprašomas nukleotido modifikacijas sekos viduryje.

Pradmens ilginimo reakcijos buvo atliekamos naudojant modifikuotus nukleozido trifosfatus (4 a-f) bei DNR polimerazes: *Taq* DNR polimerazę (Thermo Scientific), Klenow (exo⁻) polimerazę (Thermo Scientific), Pfu DNR polimerazę (Thermo Scientific), KOD DNR polimerazę (Merck Millipore), KOD XL DNR polimerazę (Merck Millipore), Bsm DNR polimerazę (Thermo Scientific). Buvo naudojamos keturios skirtingos DNR matricos, turinčios keturis iš eilės natūralius nukleotidus (A, G, C, T). DNR matricų sekos:

MatrA: 5'-CCGGAATTAAAAAtctccctatagtgagtcgtatta-3' (SEQ ID Nr. 4) (Metabion)

MatrG: 5'-CCGGAATTGGGGtctccctatagtgagtcgtatta-3' (SEQ ID Nr.5) (Metabion)

MatrC: 5'-CCGGAATTCCCCtctccctatagtgagtcgtatta-3' (SEQ ID Nr.6) (Metabion)

MatrT: 5'-CCGGAATTTTTTtctccctatagtgagtcgtatta-3' (SEQ ID Nr.7) (Metabion)

Pradmens seka:

T7pr: 5'-taatacgactcactataggaga-3' (SEQ ID Nr. 8) (Metabion)

Pradmuo buvo žymimas 5'-gale naudojant ³³P-γATP (TriLink Biotechnologies). 20 pmol pradmens buvo žymima su 20 pmol ³³P-γATP naudojant T4 polinukleotidkinazę (Thermo Scientific). Reakcija vykdoma 20 min. 37 °C temperatūroje, 50 mM Tris-HCl (pH 7,6 25 °C), 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0,1 mM spermidino buferiniame tirpale. Reakcija stabdoma įdėjus 1 μL 0,5 M EDTA (pH 8,0) ir pakaitinus 10 min. 80 °C temperatūroje. Reakcijoms su DNR polimerazėmis žymėtas pradmuo buvo sulydomas su viengrandininėmis DNR matricomis. 5 pmol pradmens buvo sulydoma su 5 pmol DNR matricos pakaitinus 1 min. 95 °C temperatūroje ir lėtai atvėsinus iki kambario temperatūros. Pradmens ir DNR matricos hibridas gryninamas naudojant Zeba™ Spin 7K MWCO kolonėles (Thermo Scientific).

Pradmens ilginimo reakcija naudojant DNR polimerazes buvo atliekama 20 mM glutamato (pH 8,2 25 °C), 10 mM DTT, 0,5 % Triton X-100, 20 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ buferiniame tirpale arba specialiuose tik tai polimerazei pritaikytuose buferiniuose tirpaluose, naudojant 5 nM žymėto pradmens sulydyto su matrica (MatrA, MatrT, MatrG arba MatrC), 50 nM DNR polimerazės, 0,01 vnt neorganinės pirofosfatazės (Thermo Scientific) ir po 10 μM nukleotidų (dATP, dGTP, dCTP, dTTP/dUTP arba jų modifikuotų analogų). Reakcija vykdoma 5–60 min. 37 °C temperatūroje (*Taq*, Klenow (exo⁻), Pfu, KOD, KOD XL polimerazėms) arba 60 °C temperatūroje (Bsm polimerazei). Reakcija slopinama įdėjus STOP tirpalo (95 % (v/v), 0,5 M EDTA, 0,6 % (w/v) bromfenolio mėlio ir ksileno cianolio) santykiu 1:2.

Po reakcijos, reakcijų mėginiai inkubuojami 2–5 min. 95 °C temperatūroje ir atvėsunami ledo–vandens vonioje. Tada frakcionuojami 15 % poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis (8 M karbamido) TBE buferiniame tirpale (89 mM Tris, 89 mM boro rūgšties, 2 mM EDTA (pH 8,3)). Po elektroforezės gelis 15 min. mirkomas 10 % acto rūgšties tirpale, po to 15 min. plaunamas po tekančiu krano vandeniu. Gelis dedamas ant 3 MM CHR Whatman™

chromatografinio popieriaus (GE, Healthcare Life Sciences) ir džiovinamas vakuuminėje džiovyklėje. Išdžiuvęs gelis eksponuojamas ant foto ekrano (~16 val.) ir rezultatai vizualizuojami fotovaizdintuvu Fujifilm FLA-5100.

Pavyzdys 9. Pradmens ilginimo reakcija su nuo matricos nepriklausoma polimeraze

Šis pavyzdys aprašo metodiką, kurios metu sintetinės nukleorūgštys, 3'-gale turinčios išradime aprašomas nukleotido modifikacijas.

Pradmens ilginimo reakcijos buvo atliekamos naudojant modifikuotus nukleozido trifosfatus (4 a-f) bei terminalinę deoksinukleotidiltransferazę (TdT) (Thermo Scientific). Buvo naudojamas DNR pradmuis, kurio seka:

T7pr: 5'-taatacgactcactatagggaga-3' (SEQ ID Nr. 8) (Metabion)

Pradmuis buvo žymimas 5'-gale naudojant ^{33}P - γ ATP (TriLink Biotechnologies). 20 pmol pradmens buvo žymima su 20 pmol ^{33}P - γ ATP naudojant T4 polinukleotidkinazę (Thermo Scientific). Reakcija vykdoma 20 min. 37 °C temperatūroje, 50 mM Tris-HCl (pH 7,6 25 °C), 10 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 0,1 mM spermidino buferiniame tirpale. Reakcija stabdoma įdėjus 1 μL 0,5 M EDTA (pH 8,0) ir pakaitinus 10 min. 80 °C temperatūroje. Reakcijoms su TdT žymėtas pradmuis praskiedžiamas iki 100 nM koncentracijos ir gryninamas naudojant Zeba™ Spin 7K MWCO kolonėles (Thermo Scientific).

Pradmens ilginimo reakcija naudojant TdT buvo atliekama 20 mM glutamato (pH 8,2 25 °C), 10 mM DTT, 0,5 % Triton X-100, 20 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 buferiniame tirpale arba specialiai TdT pritaikytame buferiniame tirpale (200 mM kalio kakodilato (pH 7,2 25 °C), 25 mM Tris, 0,01 % Triton X-100, 1 mM MgCl_2), naudojant 5 nM žymėto pradmens, 50 nM TdT ir 10 μM trifosfato (dATP, dGTP, dCTP, dTTP/dUTP arba jų modifikuotų analogų). Reakcija vykdoma 5–15 min. 37 °C temperatūroje. Reakcija slopinama įdėjus STOP tirpalo (95 % (v/v), 0,5 M EDTA, 0,6 % (w/v) bromfenolio mėlio ir ksileno cianolio) santykiu 1:2.

Po reakcijos, reakcijų mėginiai inkubuojami 2–5 min. 95 °C temperatūroje ir atvėsunami ledo–vandens vonioje. Tada frakcionuojami 15 % poliakrilamidiniame gelyje (PAGE) denatūruojančiomis sąlygomis (8 M karbamido) TBE buferiniame tirpale (89 mM Tris, 89 mM boro rūgšties, 2 mM EDTA (pH 8,3)). Po elektroforezės gelis 15 min. mirkomas 10 % acto rūgšties tirpale, po to 15 min. plaunamas po tekančiu krano vandeniu. Gelis dedamas ant 3 MM CHR Whatman™ chromatografinio popieriaus (GE, Healthcare Life Sciences) ir džiovinamas vakuuminėje džiovyklėje. Išdžiuvęs gelis eksponuojamas ant foto ekrano (~16 val.) ir rezultatai vizualizuojami fotovaizdintuvu Fujifilm FLA-5100.

Pavyzdys 10. Oligonukleotidų, turinčių benzofenono grupės modifikacijas, prisiuvimas prie baltymo

Šis išradimo pavyzdys parodo, kaip oligonukleotidai, turintys benzofenono modifikacijas, gali būti kovalentiškai prisiuvami prie baltymo, sąveikaujančio su modifikuota oligonukleotido dalimi, bei panaudoti DNR-baltymų sąveikų tyrimams.

Pirmiausia vykdoma 3'-gale modifikuotų oligonukleotidų sintezė, kurie 5'-gale yra pažymėti radioaktyvia žyme (^{33}P). Sintezė vykdoma naudojant *N*⁴-benzoil-3-benzoil-dCTP (4e) ir TdT kaip nurodyta 9 pavyzdyje. Po reakcijos TdT yra slopinama karščiu, pagal gamintojo rekomendacijas.

Surenkama UV susiuvimo aparatūra, pagal modifikuotą Sontheimer metodiką (Sontheimer 1994). Susiuvimo aparatas sudarytas iš vandens–ledo vonelės, į kurią patalpinama 96-šulinėlių plokštelė. Ant plokštelės uždedama parafilmo plėvelė, ties šulinėliais suformuojant duobutes. Tuomet 10 μL reakcijos mišinys buvo perkeliamas į suformuotas duobutes. Susiuvimo aparatas talpinamas po UV lempa, 1 cm atstumu. Mėginiai apšvitinami UV šviesa (300–320 nm) 5 min.

Tuomet mėginiai (su NDS dažų) kaitinami 5 min. 95 °C temperatūroje ir analizuojami 14 % SDS-PAGE būdu. Baltymai dažomi su Coomassie Brilliant Blue dažymo tirpalu. Tam, kad aptikti oligonukleotido-TdT susiūtus kompleksus, gelis dedamas ant 3 MM CHR Whatman™ chromatografinio popieriaus (GE, Healthcare Life Sciences) ir džiovinamas vakuuminėje džiovyklėje. Išdžiuvęs gelis eksponuojamas ant foto ekrano (~16 val.) ir rezultatai vizualizuojami fotovaizdintuvu Fujifilm FLA-5100.

PAGE analizė parodė naują juostelę, kurios molekulinė masė atitiko TdT ir modifikuoto oligonukleotido molekulinę masių sumą.

Literatūra

1. Alberti, Patrizia, Paola B. Arimondo, Jean-Louis Mergny, Thérèse Garestier, Claude Hélène, ir Jian-Sheng Sun. 2002. „A Directional Nucleation-Zipping Mechanism for Triple Helix Formation“. *Nucleic Acids Research* 30 (24): 5407–15.
2. Avino, Anna, Carme Fabrega, Maria Tintore, ir Ramon Eritja. 2012. „Thrombin Binding Aptamer, More than a Simple Aptamer: Chemically Modified Derivatives and Biomedical Applications.“ *Current Pharmaceutical Design* 18 (14): 2036–47.
3. Balzarini, J., M. Baba, R. Pauwels, P. Herdewijn, S. G. Wood, M. J. Robins, ir E. de Clercq. 1988. „Potent and Selective Activity of 3'-Azido-2,6-Diaminopurine-2',3'-Dideoxyriboside, 3'-Fluoro-2,6-Diaminopurine-2',3'-Dideoxyriboside, and 3'-Fluoro-2',3'-Dideoxyguanosine against Human Immunodeficiency Virus.“ *Molecular Pharmacology* 33 (3): 243–49.
4. Beigelman, L., J. A. McSwiggen, K. G. Draper, C. Gonzalez, K. Jensen, A. M. Karpeisky, A. S. Modak, J. Matulic-Adamic, A. B. DiRenzo, ir P. Haeberli. 1995. „Chemical Modification of Hammerhead Ribozymes. Catalytic Activity and Nuclease Resistance.“ *The Journal of Biological Chemistry* 270 (43): 25702–8.
5. Bergen, Konrad, Anna-Lena Steck, Stefan Strutt, Anna Baccaro, Wolfram Welte, Kay Diederichs, ir Andreas Marx. 2012. „Structures of KlenTaq DNA Polymerase Caught While Incorporating C5-Modified Pyrimidine and C7-Modified 7-Deazapurine Nucleoside Triphosphates.“ *Journal of the American Chemical Society* 134 (29): 11840–43. doi:10.1021/ja3017889.
6. Braasch, D. A., ir D. R. Corey. 2001. „Locked Nucleic Acid (LNA): Fine-Tuning the Recognition of DNA and RNA.“ *Chemistry & Biology* 8 (1): 1–7.
7. Bryant, M. L., E. G. Bridges, L. Placidi, A. Faraj, A. G. Loi, C. Pierra, D. Dukhan, et al. 2001. „Antiviral L-Nucleosides Specific for Hepatitis B Virus Infection.“ *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (1): 229–35. doi:10.1128/AAC.45.1.229-235.2001.
8. Buhr, C. A., R. W. Wagner, D. Grant, ir B. C. Froehler. 1996. „Oligodeoxynucleotides Containing C-7 Propyne Analogs of 7-Deaza-2'-Deoxyguanosine and 7-Deaza-2'-Deoxyadenosine.“ *Nucleic Acids Research* 24 (15): 2974–80.
9. Bumcrot, David, Muthiah Manoharan, Victor Koteliansky, ir Dinah W. Y. Sah. 2006. „RNAi Therapeutics: A Potential New Class of Pharmaceutical Drugs.“ *Nature Chemical Biology* 2 (12): 711–19. doi:10.1038/nchembio839.

10. Chang, Yun Min, Michael J. Donovan, ir Weihong Tan. 2013. „Using Aptamers for Cancer Biomarker Discovery.“ *Journal of Nucleic Acids* 2013: 817350. doi:10.1155/2013/817350.
11. Chelliserrykattil, Jijumon, ir Andrew D. Ellington. 2004. „Evolution of a T7 RNA Polymerase Variant That Transcribes 2'-O-Methyl RNA.“ *Nature Biotechnology* 22 (9): 1155–60. doi:10.1038/nbt1001.
12. Chen, Hongxia, Yafei Hou, Fangjie Qi, Jiangjiang Zhang, Kwangnak Koh, Zhongming Shen, ir Genxi Li. 2014. „Detection of Vascular Endothelial Growth Factor Based on Rolling Circle Amplification as a Means of Signal Enhancement in Surface Plasmon Resonance.“ *Biosensors & Bioelectronics* 61 (lapkričio): 83–87. doi:10.1016/j.bios.2014.05.005.
13. Chen, Tingjian, ir Floyd E. Romesberg. 2014. „Directed Polymerase Evolution.“ *FEBS Letters* 588 (2): 219–29. doi:10.1016/j.febslet.2013.10.040.
14. Chery, Jessica. 2016. „RNA Therapeutics: RNAi and Antisense Mechanisms and Clinical Applications.“ *Postdoc Journal: A Journal of Postdoctoral Research and Postdoctoral Affairs* 4 (7): 35–50.
15. Chin, Jason W., Andrew B. Martin, David S. King, Lei Wang, ir Peter G. Schultz. 2002. „Addition of a Photocrosslinking Amino Acid to the Genetic Code of Escherichiacoli.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (17): 11020–24. doi:10.1073/pnas.172226299.
16. Craig, M. E., D. M. Crothers, ir P. Doty. 1971. „Relaxation Kinetics of Dimer Formation by Self Complementary Oligonucleotides.“ *Journal of Molecular Biology* 62 (2): 383–401.
17. Darmostuk, Mariia, Silvie Rimpelova, Helena Gbelcova, ir Tomas Ruml. 2015. „Current Approaches in SELEX: An Update to Aptamer Selection Technology.“ *Biotechnology Advances* 33 (6 Pt 2): 1141–61. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.008.
18. De Clercq, E., E. Eckstein, ir T. C. Merigan. 1969. „[Interferon Induction Increased through Chemical Modification of a Synthetic Polyribonucleotide].“ *Science (New York, N.Y.)* 165 (3898): 1137–39.
19. De Clercq, Erik, ir Hugh J. Field. 2006. „Antiviral Prodrugs - the Development of Successful Prodrug Strategies for Antiviral Chemotherapy.“ *British Journal of Pharmacology* 147 (1): 1–11. doi:10.1038/sj.bjp.0706446.
20. Dhende, Vikram P., Satyabrata Samanta, David M. Jones, Ian R. Hardin, ir Jason Locklin. 2011. „One-Step Photochemical Synthesis of Permanent, Nonleaching, Ultrathin Antimicrobial Coatings for Textiles and Plastics.“ *ACS Applied Materials & Interfaces* 3 (8): 2830–37. doi:10.1021/am200324f.

21. Dorman, Gyorgy, Hiroyuki Nakamura, Abigail Pulsipher, ir Glenn D. Prestwich. 2016. „The Life of Pi Star: Exploring the Exciting and Forbidden Worlds of the Benzophenone Photophore.“ *Chemical Reviews* 116 (24): 15284–398. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00342.
22. Dorman, G., ir G. D. Prestwich. 2000. „Using Photolabile Ligands in Drug Discovery and Development.“ *Trends in Biotechnology* 18 (2): 64–77.
23. Elion, G. B., P. A. Furman, J. A. Fyfe, P. de Miranda, L. Beauchamp, ir H. J. Schaeffer. 1977. „Selectivity of Action of an Antiherpetic Agent, 9-(2-Hydroxyethoxymethyl) Guanine.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12): 5716–20.
24. Ellefson, Jared W., Adam J. Meyer, Randall A. Hughes, Joe R. Cannon, Jennifer S. Brodbelt, ir Andrew D. Ellington. 2014. „Directed Evolution of Genetic Parts and Circuits by Compartmentalized Partnered Replication.“ *Nature Biotechnology* 32 (1): 97–101. doi:10.1038/nbt.2714.
25. Ellington, A. D., ir J. W. Szostak. 1990. „In Vitro Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands.“ *Nature* 346 (6287): 818–22. doi:10.1038/346818a0.
26. Flanagan, W. M., A. Kothavale, ir R. W. Wagner. 1996. „Effects of Oligonucleotide Length, Mismatches and mRNA Levels on C-5 Propyne-Modified Antisense Potency.“ *Nucleic Acids Research* 24 (15): 2936–41.
27. Frank Bennett, C. 2007. „Pharmacological Properties of 2'-O-Methoxyethyl-Modified Oligonucleotides“. *Antisense Drug Technology*, 273–303. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780849387951.pta>.
28. Furman, David, Junlei Chang, Lydia Lartigue, Christopher R. Bolen, Francois Haddad, Brice Gaudilliere, Edward A. Gancio, et al. 2017. „Expression of Specific Inflammasome Gene Modules Stratifies Older Individuals into Two Extreme Clinical and Immunological States.“ *Nature Medicine* 23 (2): 174–84. doi:10.1038/nm.4267.
29. Gao, Shunxiang, Xin Zheng, Binghua Jiao, ir Lianghua Wang. 2016. „Post-SELEX Optimization of Aptamers.“ *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408 (17): 4567–73. doi:10.1007/s00216-016-9556-2.
30. Georgiadis, Millie M., Isha Singh, Whitney F. Kellett, Shuichi Hoshika, Steven A. Benner, ir Nigel G. J. Richards. 2015. „Structural Basis for a Six Nucleotide Genetic Alphabet.“ *Journal of the American Chemical Society* 137 (21): 6947–55. doi:10.1021/jacs.5b03482.
31. Ghadessy, F. J., J. L. Ong, ir P. Holliger. 2001. „Directed Evolution of Polymerase Function by Compartmentalized Self-Replication.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (8): 4552–57. doi:10.1073/pnas.071052198.

32. Herdewijn, P., J. Balzarini, E. De Clercq, R. Pauwels, M. Baba, S. Broder, ir H. Vanderhaeghe. 1987. „3'-Substituted 2',3'-Dideoxynucleoside Analogues as Potential Anti-HIV (HTLV-III/LAV) Agents.“ *Journal of Medicinal Chemistry* 30 (8): 1270–78.
33. Herman, Christine T., Gregory K. Potts, Madeline C. Michael, Nicole V. Tolan, ir Ryan C. Bailey. 2011. „Probing Dynamic Cell-Substrate Interactions Using Photochemically Generated Surface-Immobilized Gradients: Application to Selectin-Mediated Leukocyte Rolling.“ *Integrative Biology : Quantitative Biosciences from Nano to Macro* 3 (7): 779–91. doi:10.1039/c0ib00151a.
34. Hippel, P. H. von, ir O. G. Berg. 1986. „On the Specificity of DNA-Protein Interactions.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (6): 1608–12.
35. Hong, H., S. Goel, Y. Zhang, ir W. Cai. 2011. „Molecular Imaging with Nucleic Acid Aptamers.“ *Current Medicinal Chemistry* 18 (27): 4195–4205.
36. Hurwitz, Selwyn J., ir Raymond F. Schinazi. 2013. „Prodrug Strategies for Improved Efficacy of Nucleoside Antiviral Inhibitors.“ *Current Opinion in HIV and AIDS* 8 (6): 556–64. doi:10.1097/COH.0000000000000007.
37. Yamashige, Rie, Michiko Kimoto, Yusuke Takezawa, Akira Sato, Tsuneo Mitsui, Shigeyuki Yokoyama, ir Ichiro Hirao. 2012. „Highly Specific Unnatural Base Pair Systems as a Third Base Pair for PCR Amplification.“ *Nucleic Acids Research* 40 (6): 2793–2806. doi:10.1093/nar/gkr1068.
38. Yu, RosieZ, RichardS Geary, Andrew Siwkowski, ir ArthurA Levin. 2007. „Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Properties ofPhosphorothioate 2'-O-(2-Methoxyethyl)-ModifiedAntisense Oligonucleotides in Animals and Man“. *Antisense Drug Technology*, 305–26. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780849387951.ch11>.
39. Jackel, Christian, Peter Kast, ir Donald Hilvert. 2008. „Protein Design by Directed Evolution.“ *Annual Review of Biophysics* 37: 153–73. doi:10.1146/annurev.biophys.37.032807.125832.
40. Jung, Yun Kyung, Taemin Lee, Eeseul Shin, ir Byeong-Su Kim. 2013. „Highly Tunable Aptasensing Microarrays with Graphene Oxide Multilayers.“ *Scientific Reports* 3 (lapkričio): 3367. doi:10.1038/srep03367.
41. Keefe, Anthony D., ir Sharon T. Cload. 2008. „SELEX with Modified Nucleotides.“ *Current Opinion in Chemical Biology* 12 (4): 448–56. doi:10.1016/j.cbpa.2008.06.028.
42. Khanum, Shaukath A., Sheena Shashikanth, ir A. V. Deepak. 2004. „Synthesis and Anti-Inflammatory Activity of Benzophenone Analogues.“ *Bioorganic Chemistry* 32 (4): 211–22. doi:10.1016/j.bioorg.2004.04.003.

43. Khoury, George A., James Smadbeck, Chris A. Kieslich, ir Christodoulos A. Floudas. 2014. „Protein Folding and de Novo Protein Design for Biotechnological Applications.“ *Trends in Biotechnology* 32 (2): 99–109. doi:10.1016/j.tibtech.2013.10.008.
44. Kiilerich-Pedersen, Katrine, Johannes Dapra, Solene Cherre, ir Noemi Rozlosnik. 2013. „High Sensitivity Point-of-Care Device for Direct Virus Diagnostics.“ *Biosensors & Bioelectronics* 49 (lapkričio): 374–79. doi:10.1016/j.bios.2013.05.046.
45. Kimoto, Michiko, Rie Yamashige, Ken-ichiro Matsunaga, Shigeyuki Yokoyama, ir Ichiro Hirao. 2013. „Generation of High-Affinity DNA Aptamers Using an Expanded Genetic Alphabet.“ *Nature Biotechnology* 31 (5): 453–57. doi:10.1038/nbt.2556.
46. Konry, T., A. Novoa, Y. Shemer-Avni, N. Hanuka, S. Cosnier, Arielle Lepellec, ir R. S. Marks. 2005. „Optical Fiber Immunosensor Based on a Poly(pyrrole-Benzophenone) Film for the Detection of Antibodies to Viral Antigen.“ *Analytical Chemistry* 77 (6): 1771–79. doi:10.1021/ac048569w.
47. Koshland, Daniel E. 1995. „The Key–Lock Theory and the Induced Fit Theory“. *Angewandte Chemie International Edition in English* 33 (23-24): 2375–78. doi:10.1002/anie.199423751.
48. Kries, Hajo, Rebecca Blomberg, ir Donald Hilvert. 2013. „De Novo Enzymes by Computational Design.“ *Current Opinion in Chemical Biology* 17 (2): 221–28. doi:10.1016/j.cbpa.2013.02.012.
49. Kröger, K., A. Jung, S. Reder, ir G. Gauglitz. 2002. „Versatile biosensor surface based on peptide nucleic acid with label free and total internal reflection fluorescence detection for quantification of endocrine disruptors“. *Analytica Chimica Acta* 469 (1): 37–48. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00470-1.
50. Kusser, W. 2000. „Chemically Modified Nucleic Acid Aptamers for in Vitro Selections: Evolving Evolution.“ *Journal of Biotechnology* 74 (1): 27–38.
51. Kuwahara, Masayasu, Jun-ichi Nagashima, Masatoshi Hasegawa, Takehiro Tamura, Rina Kitagata, Kazuo Hanawa, Shin-ichi Hososhima, Toshiyuki Kasamatsu, Hiroaki Ozaki, ir Hiroaki Sawai. 2006. „Systematic Characterization of 2'-Deoxynucleoside- 5'-Triphosphate Analogs as Substrates for DNA Polymerases by Polymerase Chain Reaction and Kinetic Studies on Enzymatic Production of Modified DNA“. *Nucleic Acids Research* 34 (19): 5383–94. doi:10.1093/nar/gkl637.
52. Lam, Curtis, Christopher Hipolito, ir David M. Perrin. 2008. „Synthesis and Enzymatic Incorporation of Modified Deoxyadenosine Triphosphates“. *European Journal of Organic Chemistry* 2008 (29): 4915–23. doi:10.1002/ejoc.200800381.

53. Lang, Kathrin, ir Jason W. Chin. 2014. „Cellular Incorporation of Unnatural Amino Acids and Bioorthogonal Labeling of Proteins.“ *Chemical Reviews* 114 (9): 4764–4806. doi:10.1021/cr400355w.
54. Langkjaer, Niels, Anna Pasternak, ir Jesper Wengel. 2009. „UNA (unlocked Nucleic Acid): A Flexible RNA Mimic That Allows Engineering of Nucleic Acid Duplex Stability.“ *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17 (15): 5420–25. doi:10.1016/j.bmc.2009.06.045.
55. Laos, Roberto, J. Michael Thomson, ir Steven A. Benner. 2014. „DNA Polymerases Engineered by Directed Evolution to Incorporate Non-Standard Nucleotides.“ *Frontiers in Microbiology* 5: 565. doi:10.3389/fmicb.2014.00565.
56. Lapa, Sergey A., Alexander V. Chudinov, ir Edward N. Timofeev. 2016. „The Toolbox for Modified Aptamers.“ *Molecular Biotechnology* 58 (2): 79–92. doi:10.1007/s12033-015-9907-9.
57. Leemhuis, Hans, Ronan M. Kelly, ir Lubbert Dijkhuizen. 2009. „Directed Evolution of Enzymes: Library Screening Strategies.“ *IUBMB Life* 61 (3): 222–28. doi:10.1002/iub.165.
58. Lescrinier, E., R. Esnouf, J. Schraml, R. Busson, H. Heus, C. Hilbers, ir P. Herdewijn. 2000. „Solution Structure of a HNA-RNA Hybrid.“ *Chemistry & Biology* 7 (9): 719–31.
59. Lipi, Farhana, Suxiang Chen, Madhuri Chakravarthy, Shilpa Rakesh, ir Rakesh N. Veedu. 2016. „In Vitro Evolution of Chemically-Modified Nucleic Acid Aptamers: Pros and Cons, and Comprehensive Selection Strategies.“ *RNA Biology* 13 (12): 1232–45. doi:10.1080/15476286.2016.1236173.
60. Lomakin, A., ir M. D. Frank-Kamenetskii. 1998. „A Theoretical Analysis of Specificity of Nucleic Acid Interactions with Oligonucleotides and Peptide Nucleic Acids (PNAs).“ *Journal of Molecular Biology* 276 (1): 57–70. doi:10.1006/jmbi.1997.1497.
61. Malyshev, Denis A., Kirandeep Dhami, Henry T. Quach, Thomas Lavergne, Phillip Ordoukhanian, Ali Torkamani, ir Floyd E. Romesberg. 2012. „Efficient and Sequence-Independent Replication of DNA Containing a Third Base Pair Establishes a Functional Six-Letter Genetic Alphabet.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (30): 12005–10. doi:10.1073/pnas.1205176109.
62. Marcon, Lionel, Mei Wang, Yannick Coffinier, Francois Le Normand, Oleg Melnyk, Rabah Boukherroub, ir Sabine Szunerits. 2010. „Photochemical Immobilization of Proteins and Peptides on Benzophenone-Terminated Boron-Doped Diamond Surfaces.“ *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 26 (2): 1075–80. doi:10.1021/la903012v.
63. Marwick, C. 1998. „First ‚Antisense‘ Drug Will Treat CMV Retinitis.“ *JAMA* 280 (10): 871.
64. McGowan, Mary P., Jean-Claude Tardif, Richard Ceska, Lesley J. Burgess, Handrean Soran, Ioanna Gouni-Berthold, Gilbert Wagener, ir Scott Chasan-Taber. 2012. „Randomized,

Placebo-Controlled Trial of Mipomersen in Patients with Severe Hypercholesterolemia Receiving Maximally Tolerated Lipid-Lowering Therapy." *PloS One* 7 (11): e49006. doi:10.1371/journal.pone.0049006.

65. Meek, Kirsten N., Alexandra E. Rangel, ir Jennifer M. Heemstra. 2016. „Enhancing Aptamer Function and Stability via in Vitro Selection Using Modified Nucleic Acids." *Methods (San Diego, Calif.)* 106 (rugpjūčio): 29–36. doi:10.1016/j.ymeth.2016.03.008.

66. Meisenheimer, K. M., ir T. H. Koch. 1997. „Photocross-Linking of Nucleic Acids to Associated Proteins." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 32 (2): 101–40. doi:10.3109/10409239709108550.

67. Monn, Selina T. M., ir Stefan Schurch. 2007. „New Aspects of the Fragmentation Mechanisms of Unmodified and Methylphosphonate-Modified Oligonucleotides." *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 18 (6): 984–90. doi:10.1016/j.jasms.2007.02.006.

68. Moulds, C., J. G. Lewis, B. C. Froehler, D. Grant, T. Huang, J. F. Milligan, M. D. Matteucci, ir R. W. Wagner. 1995. „Site and Mechanism of Antisense Inhibition by C-5 Propyne Oligonucleotides." *Biochemistry* 34 (15): 5044–53.

69. Nakatani, Kazuhiko, Chikara Dohno, ir Isao Saito. 1999. „Synthesis of DNA Oligomers Containing Modified Uracil Possessing Electron-Accepting Benzophenone Chromophore." *The Journal of Organic Chemistry* 64 (18): 6901–4.

70. Nakatani, Kazuhiko, Takashi Yoshida, ir Isao Saito. 2002. „Photochemistry of Benzophenone Immobilized in a Major Groove of DNA: Formation of Thermally Reversible Interstrand Cross-Link." *Journal of the American Chemical Society* 124 (10): 2118–19.

71. Obeid, Samra, Anna Baccaro, Wolfram Welte, Kay Diederichs, ir Andreas Marx. 2010. „Structural Basis for the Synthesis of Nucleobase Modified DNA by *Thermus Aquaticus* DNA Polymerase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (50): 21327–31. doi:10.1073/pnas.1013804107.

72. Ong, Jennifer L., David Loakes, Szymon Jaroslawski, Kathleen Too, ir Philipp Holliger. 2006. „Directed Evolution of DNA Polymerase, RNA Polymerase and Reverse Transcriptase Activity in a Single Polypeptide." *Journal of Molecular Biology* 361 (3): 537–50. doi:10.1016/j.jmb.2006.06.050.

73. Patel, D. J., ir A. K. Suri. 2000. „Structure, Recognition and Discrimination in RNA Aptamer Complexes with Cofactors, Amino Acids, Drugs and Aminoglycoside Antibiotics." *Journal of Biotechnology* 74 (1): 39–60.

74. Petersen, Michael, ir Jesper Wengel. 2003. „LNA: A Versatile Tool for Therapeutics and Genomics." *Trends in Biotechnology* 21 (2): 74–81. doi:10.1016/S0167-7799(02)00038-0.

75. Pokorski, Jonathan K., Mark A. Witschi, Bethany L. Purnell, ir Daniel H. Appella. 2004. „(S,S)-trans-Cyclopentane-Constrained Peptide Nucleic Acids. A General Backbone Modification that Improves Binding Affinity and Sequence Specificity“. *Journal of the American Chemical Society* 126 (46): 15067–73. doi:10.1021/ja046280q.
76. Rahman, S. M. Abdur, Takeshi Baba, Tetsuya Kodama, Md Ariful Islam, ir Satoshi Obika. 2012. „Hybridizing Ability and Nuclease Resistance Profile of Backbone Modified Cationic Phosphorothioate Oligonucleotides.“ *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20 (13): 4098–4102. doi:10.1016/j.bmc.2012.05.009.
77. Rayburn, Elizabeth R., ir Ruiwen Zhang. 2008. „Antisense, RNAi, and Gene Silencing Strategies for Therapy: Mission Possible or Impossible?“ *Drug Discovery Today* 13 (11-12): 513–21. doi:10.1016/j.drudis.2008.03.014.
78. Rakesh N. Veedu, ir Jesper Wengel. 2010. „Locked Nucleic Acids: Promising Nucleic Acid Analogs for Therapeutic Applications.“ *Chemistry & Biodiversity* 7 (3): 536–42. doi:10.1002/cbdv.200900343.
79. Ranganatha, V Lakshmi, BR Vijay Avin, Prabhu Thirusangu, T Prashanth, BT Prabhakar, ir Shaukath Ara Khanum. 2013. „Synthesis, angiopreventive activity, and in vivo tumor inhibition of novel benzophenone-benzimidazole analogs“. *Life sciences* 93 (23): 904–911. doi:10.1016/j.lfs.2013.10.001.
80. Ratilainen, T., A. Holmen, E. Tuite, P. E. Nielsen, ir B. Norden. 2000. „Thermodynamics of Sequence-Specific Binding of PNA to DNA.“ *Biochemistry* 39 (26): 7781–91.
81. Renberg, Bjorn, Kae Sato, Kazuma Mawatari, Naokazu Idota, Takehiko Tsukahara, ir Takehiko Kitamori. 2009. „Serial DNA Immobilization in Micro- and Extended Nanospace Channels.“ *Lab on a Chip* 9 (11): 1517–23. doi:10.1039/b823436a.
82. Renneberg, Dorte, ir Christian J. Leumann. 2002. „Watson-Crick Base-Pairing Properties of Tricyclo-DNA.“ *Journal of the American Chemical Society* 124 (21): 5993–6002.
83. Rohloff, John C., Amy D. Gelinas, Thale C. Jarvis, Urs A. Ochsner, Daniel J. Schneider, Larry Gold, ir Nebojsa Janjic. 2014. „Nucleic Acid Ligands With Protein-like Side Chains: Modified Aptamers and Their Use as Diagnostic and Therapeutic Agents.“ *Molecular Therapy. Nucleic Acids* 3 (spalio): e201. doi:10.1038/mtna.2014.49.
84. Rotherham, Lia S., Charlotte Maserumule, Keertan Dheda, Jacques Theron, ir Makobetsa Khati. 2012. „Selection and Application of ssDNA Aptamers to Detect Active TB from Sputum Samples.“ *PloS One* 7 (10): e46862. doi:10.1371/journal.pone.0046862.

85. Rougee, M., B. Faucon, J. L. Mergny, F. Barcelo, C. Giovannangeli, T. Garestier, ir C. Helene. 1992. „Kinetics and thermodynamics of triple-helix formation: effects of ionic strength and mismatched“. *Biochemistry* 31 (38): 9269–78. doi:10.1021/bi00153a021.
86. Samish, Ilan, Christopher M. MacDermaid, Jose Manuel Perez-Aguilar, ir Jeffery G. Saven. 2011. „Theoretical and Computational Protein Design.“ *Annual Review of Physical Chemistry* 62: 129–49. doi:10.1146/annurev-physchem-032210-103509.
87. Sastry, S., ir B. M. Ross. 1998. „RNA-Binding Site in T7 RNA Polymerase.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (16): 9111–16.
88. Sastry, S. S., H. P. Spielmann, Q. S. Hoang, A. M. Phillips, A. Sancar, ir J. E. Hearst. 1993. „Laser-Induced Protein-DNA Cross-Links via Psoralen Furanside Monoadducts.“ *Biochemistry* 32 (21): 5526–38.
89. Schaeffer, H. J., L. Beauchamp, P. de Miranda, G. B. Elion, D. J. Bauer, ir P. Collins. 1978. „9-(2-Hydroxyethoxymethyl) Guanine Activity against Viruses of the Herpes Group.“ *Nature* 272 (5654): 583–85.
90. Seo, Young Jun, Denis A. Malyshev, Thomas Lavergne, Phillip Ordoukhanian, ir Floyd E. Romesberg. 2011. „Site-Specific Labeling of DNA and RNA Using an Efficiently Replicated and Transcribed Class of Unnatural Base Pairs.“ *Journal of the American Chemical Society* 133 (49): 19878–88. doi:10.1021/ja207907d.
91. Sergentu, Dumitru-Claudiu, Remi Maurice, Remco W. A. Havenith, Ria Broer, ir Daniel Roca-Sanjuan. 2014. „Computational Determination of the Dominant Triplet Population Mechanism in Photoexcited Benzophenone.“ *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP* 16 (46): 25393–403. doi:10.1039/c4cp03277b.
92. Sharma, Vivek K., Pallavi Rungta, ir Ashok K. Prasad. 2014. „Nucleic acid therapeutics: basic concepts and recent developments“. *RSC Adv.* 4 (32): 16618–31. doi:10.1039/C3RA47841F.
93. Sharma, Vivek K., Raman K. Sharma, ir Sunil K. Singh. 2014. „Antisense oligonucleotides: modifications and clinical trials“. *Med. Chem. Commun.* 5 (10): 1454–71. doi:10.1039/C4MD00184B.
94. Shigdel, Uddhav Kumar, Junliang Zhang, ir Chuan He. 2008. „Diazirine-Based DNA Photo-Cross-Linking Probes for the Study of Protein-DNA Interactions.“ *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 47 (1): 90–93. doi:10.1002/anie.200703625.
95. Shin, Seonmi, Il-Hyun Kim, Wonchull Kang, Jin Kuk Yang, ir Sang Soo Hah. 2010. „An Alternative to Western Blot Analysis Using RNA Aptamer-Functionalized Quantum Dots.“ *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20 (11): 3322–25. doi:10.1016/j.bmcl.2010.04.040.

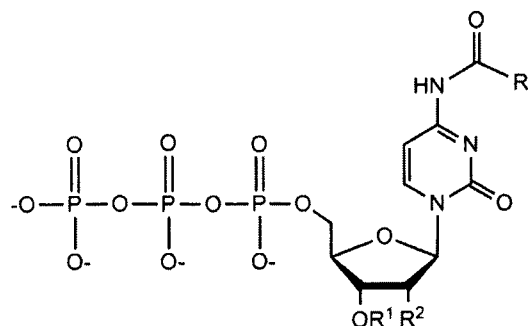
96. Shoji, Y., S. Akhtar, A. Periasamy, B. Herman, ir R. L. Juliano. 1991. „Mechanism of Cellular Uptake of Modified Oligodeoxynucleotides Containing Methylphosphonate Linkages.“ *Nucleic Acids Research* 19 (20): 5543–50.
97. Sontheimer, E. J. 1994. „Site-Specific RNA Crosslinking with 4-Thiouridine.“ *Molecular Biology Reports* 20 (1): 35–44.
98. Sosic, Alice, Anna Meneghello, Agnese Antognoli, Erica Cretaio, ir Barbara Gatto. 2013. „Development of a Multiplex Sandwich Aptamer Microarray for the Detection of VEGF165 and Thrombin.“ *Sensors (Basel, Switzerland)* 13 (10): 13425–38. doi:10.3390/s131013425.
99. Steen, Hanno, ir Ole Norregaard Jensen. 2002. „Analysis of Protein-Nucleic Acid Interactions by Photochemical Cross-Linking and Mass Spectrometry.“ *Mass Spectrometry Reviews* 21 (3): 163–82. doi:10.1002/mas.10024.
100. Summerton, James. 1989. „Uncharged nucleic acid analogs for therapeutic and diagnostic applications: Oligomers assembled from ribosederived subunits“. *Discoveries in Antisense Nucleic Acids*, 71–80.
101. Sun, Hongguang, ir Youli Zu. 2015. „A Highlight of Recent Advances in Aptamer Technology and Its Application.“ *Molecules (Basel, Switzerland)* 20 (7): 11959–80. doi:10.3390/molecules200711959.
102. Tolle, Fabian, Gerhard M. Brandle, Daniel Matzner, ir Gunter Mayer. 2015. „A Versatile Approach Towards Nucleobase-Modified Aptamers.“ *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 54 (37): 10971–74. doi:10.1002/anie.201503652.
103. Tombelli, S., M. Minunni, ir M. Mascini. 2005. „Analytical Applications of Aptamers.“ *Biosensors & Bioelectronics* 20 (12): 2424–34. doi:10.1016/j.bios.2004.11.006.
104. Traut, R. R., A. Bollen, T. T. Sun, J. W. Hershey, J. Sundberg, ir L. R. Pierce. 1973. „Methyl 4-Mercaptobutyrimidate as a Cleavable Cross-Linking Reagent and Its Application to the Escherichia Coli 30S Ribosome.“ *Biochemistry* 12 (17): 3266–73.
105. Tucker, C. E., L. S. Chen, M. B. Judkins, J. A. Farmer, S. C. Gill, ir D. W. Drolet. 1999. „Detection and Plasma Pharmacokinetics of an Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Oligonucleotide-Aptamer (NX1838) in Rhesus Monkeys.“ *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications* 732 (1): 203–12.
106. Tuerk, C., ir L. Gold. 1990. „Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase.“ *Science (New York, N.Y.)* 249 (4968): 505–10.

107. Turgeon, Aurora J., Brendan A. Harley, ir Ryan C. Bailey. 2014. „Benzophenone-Based Photochemical Micropatterning of Biomolecules to Create Model Substrates and Instructive Biomaterials.“ *Methods in Cell Biology* 121: 231–42. doi:10.1016/B978-0-12-800281-0.00015-4.
108. Veedu, Rakesh N., ir Jesper Wengel. 2009. „Locked Nucleic Acid as a Novel Class of Therapeutic Agents.“ *RNA Biology* 6 (3): 321–23.
109. Wang, L., A. Brock, B. Herberich, ir P. G. Schultz. 2001. „Expanding the Genetic Code of Escherichia Coli.“ *Science (New York, N.Y.)* 292 (5516): 498–500. doi:10.1126/science.1060077.
110. Wang, Qing, Wei Liu, Yuqian Xing, Xiaohai Yang, Kemin Wang, Rui Jiang, Pei Wang, ir Qing Zhao. 2014. „Screening of DNA Aptamers against Myoglobin Using a Positive and Negative Selection Units Integrated Microfluidic Chip and Its Biosensing Application.“ *Analytical Chemistry* 86 (13): 6572–79. doi:10.1021/ac501088q.
111. Weiler, J., H. Gausepohl, N. Hauser, O. N. Jensen, ir J. D. Hoheisel. 1997. „Hybridisation Based DNA Screening on Peptide Nucleic Acid (PNA) Oligomer Arrays.“ *Nucleic Acids Research* 25 (14): 2792–99.
112. Williams, Richard, Sergio G. Peisajovich, Oliver J. Miller, Shlomo Magdassi, Dan S. Tawfik, ir Andrew D. Griffiths. 2006. „Amplification of Complex Gene Libraries by Emulsion PCR.“ *Nature Methods* 3 (7): 545–50. doi:10.1038/nmeth896.
113. Wilson, Charles, ir Anthony D. Keefe. 2006. „Building Oligonucleotide Therapeutics Using Non-Natural Chemistries.“ *Current Opinion in Chemical Biology* 10 (6): 607–14. doi:10.1016/j.cbpa.2006.10.001.
114. Wower, I., J. Wower, M. Meinke, ir R. Brimacombe. 1981. „The Use of 2-Iminothiolane as an RNA-Protein Cross-Linking Agent in Escherichia Coli Ribosomes, and the Localisation on 23S RNA of Sites Cross-Linked to Proteins L4, L6, L21, L23, L27 and L29.“ *Nucleic Acids Research* 9 (17): 4285–4302.
115. Xia, Gang, Liangjing Chen, Takashi Sera, Ming Fa, Peter G. Schultz, ir Floyd E. Romesberg. 2002. „Directed Evolution of Novel Polymerase Activities: Mutation of a DNA Polymerase into an Efficient RNA Polymerase.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (10): 6597–6602. doi:10.1073/pnas.102577799.
116. Xie, Xinqiang, Jingdan Liang, Tianning Pu, Fei Xu, Fen Yao, Yan Yang, Yi-Lei Zhao, et al. 2012. „Phosphorothioate DNA as an Antioxidant in Bacteria.“ *Nucleic Acids Research* 40 (18): 9115–24. doi:10.1093/nar/gks650.

117. Zhao, Qiang, Xing-Fang Li, Yuanhua Shao, ir X. Chris Le. 2008. „Aptamer-Based Affinity Chromatographic Assays for Thrombin.“ *Analytical Chemistry* 80 (19): 7586–93. doi:10.1021/ac801206s.
118. Patentas US20130142796
119. Patentas US5595978
120. Patentas US20140243389
121. Patentas US5270163
122. Patentas US20160215013
123. Patentas US7514210

Išradimo apibrėžtis

1. Junginys, kurio struktūrinė Formulė I:

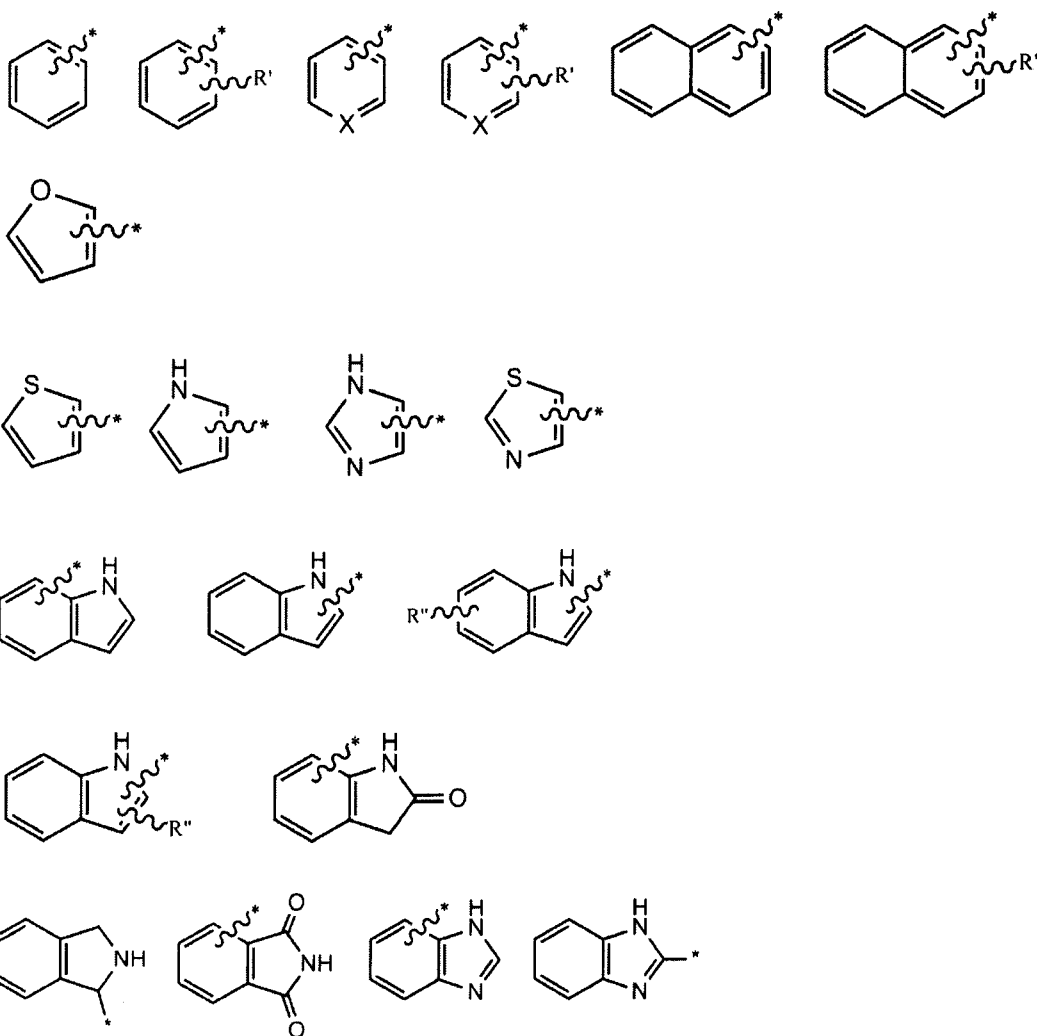


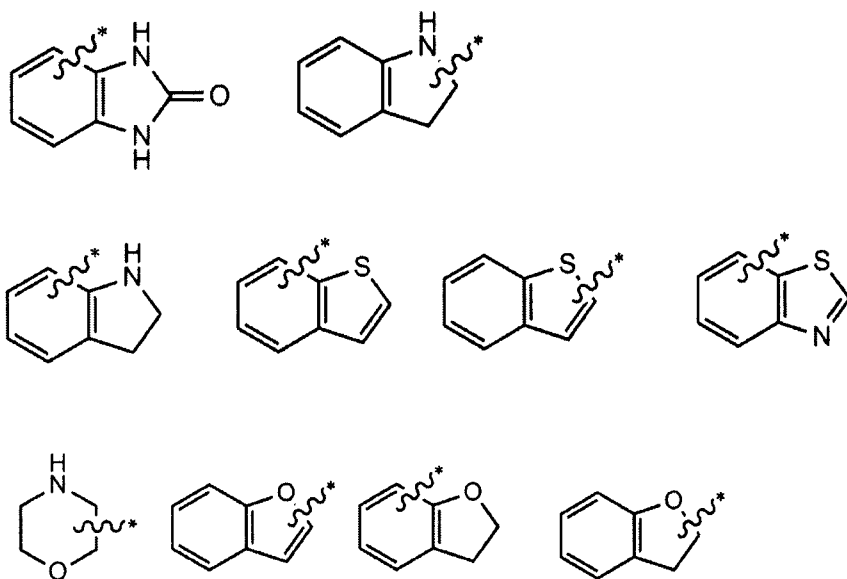
Formulė I

kur

R nepriklausomai parinktas iš grupės susidedančios iš:

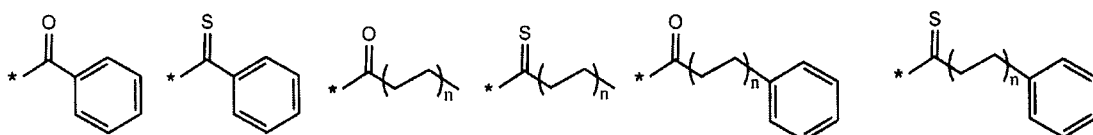
$-(CH_2)_n-CH_3$, kur n yra 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 arba 10;





kur * nurodo R grupės prisijungimo vietą;

R' yra nepriklausomai parinktas iš grupės susidedančios iš:



kur n yra 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 arba 10; ir kur * nurodo R' grupės prisijungimo prie R vietą;

R'' yra nepriklausomai parinktas iš grupės susidedančios iš –H, –CH₃, –NH₂, –OH, –Cl arba –Br;

X yra nepriklausomai parinktas iš –CH= arba –NH=;

R¹ yra nepriklausomai parinktas iš grupės susidedančios iš –H, –OAc, –OBz, –Me arba –Et;

R² yra nepriklausomai parinktas iš grupės susidedančios iš –H, –OH, –OMe arba –OEt.

2. Junginio pagal 1 punktą panaudojimas fermentų atrankai.

3. Rekombinantinis baltymas atrinktas fermentų atrankos būdu pagal 2 punktą, kurio aminorūgščių seka pasižymi bent 70 % sekos tapatumu su SEQ ID Nr. 1.

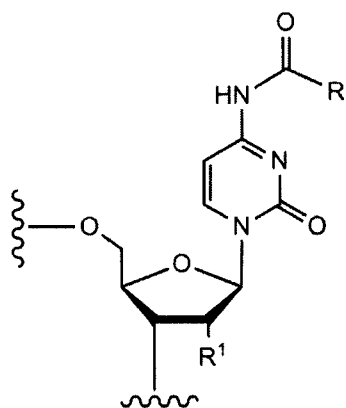
4. Rekombinantinis baltymas atrinktas fermentų atrankos būdu pagal 2 punktą, kurio aminorūgščių seka pasižymi bent 70 % sekos tapatumu su SEQ ID Nr. 2.

5. Rekombinantinis baltymas atrinktas fermentų atrankos būdu pagal 2 punktą, kurio aminorūgščių seka pasižymi bent 70 % sekos tapatumu su SEQ ID Nr. 3.

6. Nukleorūgštis, apimanti junginį pagal 1 punktą.

7. Nukleorūgštis pagal 6 punktą, besiskirianti tuo, kad nukleorūgštis sudaryta iš DNR, RNR ar DNR/RNR kombinacijos.

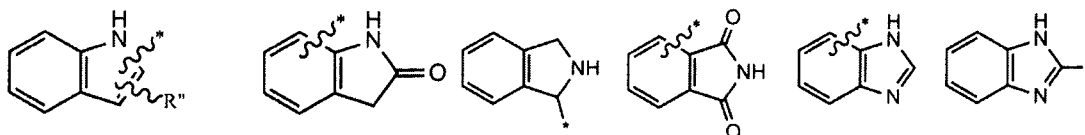
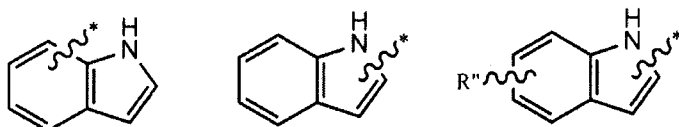
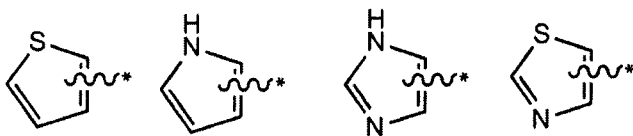
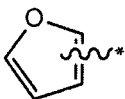
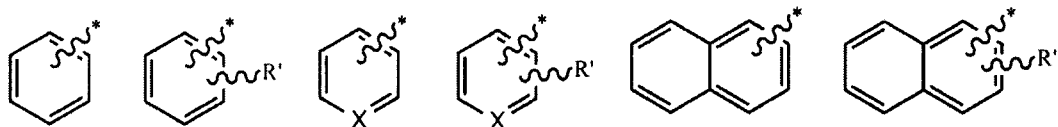
8. Nukleorūgštis pagal 6 punktą, besiskirianti tuo, kad nukleorūgštis ilgis yra nuo 10 iki 4000 nukleotidų.
9. Nukleorūgštis pagal 6 punktą, besiskirianti tuo, kad nukleorūgštis yra aptameras.
10. Nukleorūgštis pagal 6 - 9 punktus panaudojimas fermentų atrankai.
11. Nukleorūgštis, apimanti junginį, kurio struktūrinė Formulė IA:

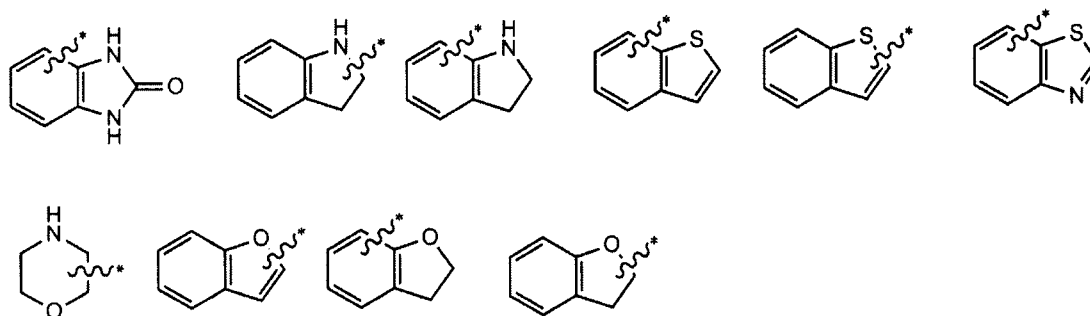


Formulė IA

kur

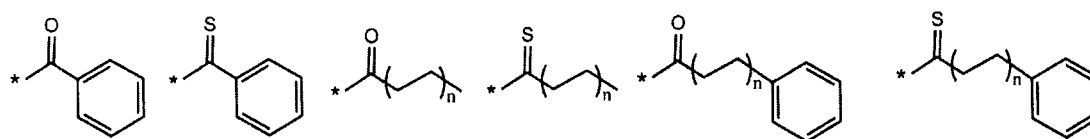
R nepriklausomai yra parinktas iš grupės susidedančios iš:

 $-(CH_2)_n-CH_3$, kur n yra 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 arba 10;




kur * nurodo R grupės prisijungimo vietą;

R' yra nepriklausomai parinktas iš grupės susidedančios iš:



kur n yra 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 arba 10; ir * nurodo R' grupės prisijungimo prie R vietą;

R'' yra nepriklausomai parinktas iš grupės susidedančios iš $-H$, $-CH_3$, $-NH_2$, $-OH$, $-Cl$ arba $-Br$;

X yra nepriklausomai parinktas iš $-CH=$ arba $-NH=$;

R' yra nepriklausomai parinktas iš grupės susidedančios iš $-H$, $-OH$, $-OMe$ arba $-OEt$.

12. Junginio pagal 11 punktą panaudojimas fermentų atrankai.

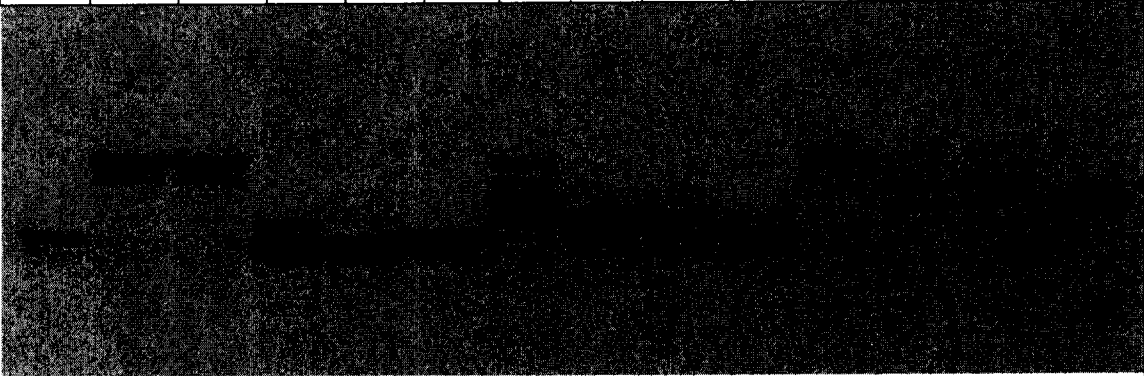
13. Nukleorūgštis, apimanti junginį pagal 11 punktą.

14. Nukleorūgštis pagal 13 punktą, besiskirianti tuo, kad nukleorūgštis sudaryta iš DNR, RNR ar DNR/RNR kombinacijos.

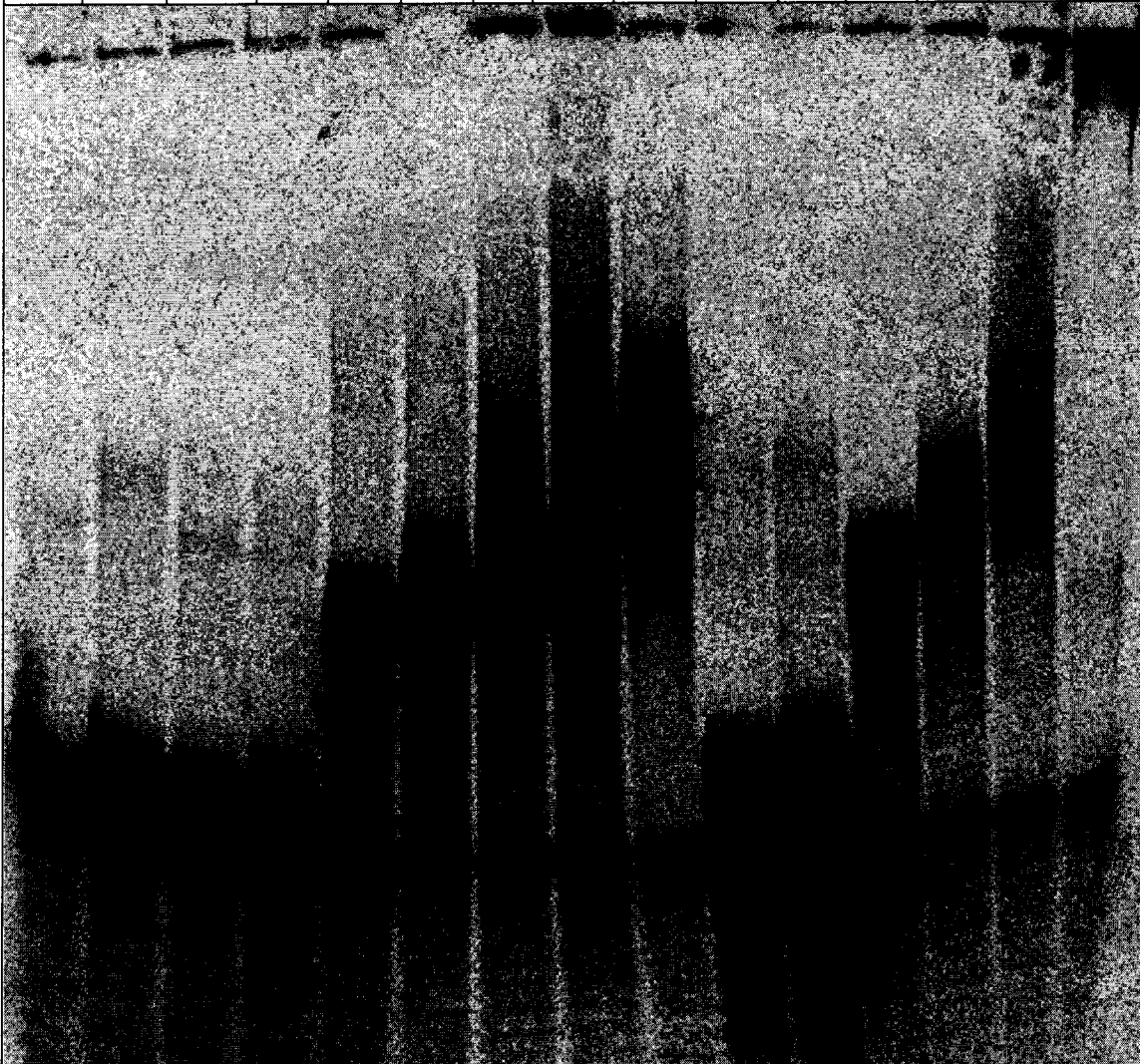
15. Nukleorūgštis pagal 13 punktą, besiskirianti tuo, kad nukleorūgštis ilgis yra nuo 10 iki 4000 nukleotidų.

16. Nukleorūgštis pagal 13 punktą, besiskirianti tuo, kad nukleorūgštis yra aptameras.

17. Nukleorūgštis pagal 13 – 16 punktus panaudojimas fermentų atrankai.

	Taq DNR pol													
	MatrAAAA													
	0	dTTP		dCTP			Bz-dCTP		BzAc-dCTP		Nik-dCTP		Hex-dCTP	
μM		1	0,1	10	1	0,1	10	1	10	1	10	1	10	1
														

1 pav.

	Glu buferis								TdT buferis							
NK	dCTP	<i>o</i> -BzBz		<i>m</i> -BzBz		<i>p</i> -BzBz		dCTP	<i>o</i> -BzBz		<i>m</i> -BzBz		<i>p</i> -BzBz			
min		5	15	5	15	5	15	5	5	15	5	15	5	15		
																

2 pav.