

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ БИОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

Объект авторского права

УДК 577.113.3 + 577.113.4 + 577.113.6

УЛАЩИК
ЕГОР АЛЕКСАНДРОВИЧ

**СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОЗИДОВ
И ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫХ
ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Минск, 2025

Научная работа выполнена в Государственном научном учреждении «Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси».

Научный руководитель:

Шманай Вадим Владимирович,
кандидат химических наук, доцент,
заведующий лабораторией химии
биоконъюгатов Института физико-
органической химии НАН Беларуси

Официальные оппоненты:

Михайлопуло Игорь Александрович,
член-корреспондент, доктор химических
наук, профессор, главный научный
сотрудник лаборатории химии нуклеотидов
и полинуклеотидов Института
биоорганической химии НАН Беларуси

Бабенко Андрей Сергеевич,
кандидат химических наук, доцент, биолог
клинико-диагностической лаборатории
Республиканского научно-практического
центра «Кардиология»

Оппонирующая организация:

Белорусский государственный
технологический университет

Защита состоится «10» апреля 2025 г. в 13.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 01.21.01 в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 220084,

г. Минск, ул. Академика В.Ф. Купревича, 5/2, зал заседаний Учёного совета, e-mail: tbozhok@iboch.by, тел. +375(29)5697164.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Я. Коласа НАН Беларуси.

Автореферат разослан «7» марта 2025 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций Д 01.21.01
кандидат химических наук

Т.С. Божок

ВВЕДЕНИЕ

Модифицированные нуклеозиды играют важную роль в биотехнологии и медицине. Их производные позволяют создавать как низкомолекулярные препараты, так и сложные лекарства на основе нуклеиновых кислот. Они участвуют в ключевых биологических процессах и важны для разработки противовирусных средств. Успехи в лечении ВИЧ и гепатита С, например, препаратами абакавир и софосбувир, подтверждают их потенциал. Сейчас активно ищут новые производные для борьбы с SARS-CoV-2, вызывающим COVID-19.

Модифицированные нуклеозиды модулируют активность ДНК и РНК, что подтверждается разработкой препаратов на основе усовершенствованных нуклеиновых кислот. Они применяются в РНК-интерференции, микроРНК, антомомирах, аптамерах, антисмысловых олигонуклеотидах, а также для создания РНК-вакцин и редактирования генома CRISPR-Cas.

Помимо разработки терапевтических средств, большое внимание уделяется их доставке в клетку. Исследуются конъюгаты нуклеиновых кислот с лигандами, обеспечивающими транспорт в целевые клетки. Наиболее популярны конъюгаты с фолиевой кислотой, холестерином, жирными кислотами, маннозой и N-ацетилгалактозамином. Последний особенно перспективен и входит в состав препаратов, таких как гивосиран, люмасиран, инклизирин и вутрисиран.

Таким образом, получение новых производных нуклеозидов и модифицированных нуклеиновых кислот является чрезвычайно важной задачей и открывает широкие перспективы в разработке новых эффективных терапевтических агентов. Синтез новых нуклеозидов пиримидинового ряда и производных N-ацетилгалактозамина, получение модифицирующих реагентов на их основе, а также синтез ДНК- и РНК-олигонуклеотидов и их конъюгатов с улучшенными функциональными характеристиками являются объектами исследования данной диссертационной работы.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами. Диссертационная работа соответствует приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь на 2016-2020 гг., п. 2. Химический синтез и продукты и п. 3. Биологические системы и технологии (Постановление Совета Министров Республики Беларусь от 12 марта 2015 г. № 190), а также приоритетным направлениям научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2016-2020 гг., п. 5. Химические технологии, нефтехимия: производство новых химических продуктов (Указ Президента Республики Беларусь от 22 апреля 2015 г. № 166). Диссертационная работа соответствует приоритетному направлению научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021-2025 гг., п. 2. Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии

и производства: тонкий химический синтез (Указ Президента Республики Беларусь от 7 мая 2020 г. № 156).

Диссертационная работа выполнена в рамках следующих заданий (мероприятий) государственных программ научных исследований (ГПНИ), государственных программ (ГП), государственных научно-технических программ (ГНТП) и грантов:

– задания 2.05 «Разработка методов синтеза реагентов для сайт-специфической модификации белков, липидов и нуклеиновых кислот» подпрограммы «Биологически активные вещества» ГПНИ «Химические технологии и материалы», 2016-2020 гг. (№ гос.рег. 20160516 от 01.04.2016);

– задания 3.04 «Разработка методов функционализации и биоконъюгирования неорганических наночастиц и поверхностей» подпрограммы «Объединение» ГПНИ «Конвергенция – 2020», 2016-2020 гг. (№ гос.рег. 20160515 от 01.04.2016);

– задания 1 «Синтез биологически активных соединений и реагентов для модификации биомолекул» подпрограммы «Биорегуляторы» ГПНИ «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия», 2021-2025 гг. (№ гос.рег. 20210470);

– задания 4-12 «Разработать и внедрить технологию получения наноструктурированных твёрдофазных носителей (модифицированных СРГ) для синтеза ДНК-зондов и модифицированных нуклеиновых кислот» ГНТП «Промышленные био- и нанотехнологии-2020» (№ гос.рег. 20171550 от 24.08.2017);

– задания 2/10 «Разработать технологию синтеза и организовать производство амидофосфитных реагентов на основе конформационно блокированных нуклеозидов» ГНТП «Малотоннажная химия» (№ гос.рег. 20171807 от 24.10.2017);

– мероприятия 22 «Разработать технологию и организовать производство синтетических РНК» подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии – 2020» (раздел 1 «Геномные и постгеномные биотехнологии») ГП «Научоемкие технологии и техника» на 2016-2020 гг. (№ гос.рег. 20170148 от 07.02.2017);

– мероприятия 43 «Разработать и внедрить технологию производства модифицированных нуклеиновых кислот для терапии онкологических и гематологических заболеваний» подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии – 2020» ГП «Научоемкие технологии и техника» на 2016-2020 гг. (№ гос.рег. 20180750 от 25.05.2018);

– мероприятия 25⁵ «Разработать технологию и организовать производство синтетических направляющих РНК для технологии геномного редактирования CRISPR» подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии – 2020» ГП «Научоемкие технологии и техника» на 2016-2020 гг. (№ гос.рег. 20192830 от 21.10.2019);

– мероприятия 8 «Разработать технологию и организовать производство модифицированных нуклеозидтрифосфатов» подпрограммы 5 «Химические продукты и молекулярные технологии» ГП «Научно-технологические технологии и техника» на 2021-2025 гг. (№ гос.рег. 20213187 от 25.08.2021);

– мероприятия 18(19) «Разработать технологию и организовать производство реагентов для введения модификаций N-ацетилгалактозамина в синтетические олигонуклеотиды» подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии» ГП «Научно-технологические технологии и техника» на 2021-2025 гг. (№ гос.рег. 20221353 от 05.08.2022);

– гранта БРФФИ X23РНФ-041 «Оптимизация системы CRISPR-Cas для эффективного редактирования генома митохондрий человека» (№ гос.рег. 20221830 от 12.12.2022).

Цель и задачи исследования. Целью работы является разработка методов структурной модификации нуклеозидов и олигонуклеотидов для установления влияния этих модификаций на активность биомолекул, а также усовершенствование технологий получения синтетических миРНК и направляющих РНК-олигонуклеотидов для генной терапии и редактирования генома.

В соответствии с поставленной целью выполнение работы сводилось к решению следующих задач:

1. Разработать методы синтеза новых 5-перилен-3-илэтиниловых производных нуклеозидов уридинового ряда, в том числе конформационно заблокированных по углеводному фрагменту, для тестирования на противовирусную активность.

2. Разработать методику синтеза нового 2'-дезоксцитидинового амидофосфитного реагента, дейтерированного по атомам С-5 и С-6, и получить модифицированные дейтерием олигонуклеотиды для изучения процессов метилирования ДНК.

3. Разработать методы синтеза моно-N-ацетилгалактозаминовых (моно-GalNAc) реагентов и продемонстрировать возможность постсинтетической модификации олигонуклеотидов при их использовании по реакции [3+2]-циклоприсоединения. С использованием синтезированных реагентов разработать новый метод получения конъюгатов миРНК с моно- и три-GalNAc лигандами.

4. Разработать схему синтеза трис-GalNAc(ТЭГ) твердофазного носителя и на его основе синтезировать модифицированные миРНК для исследования их биологической активности.

5. Разработать методы синтеза новых моно-GalNAc реагентов, предназначенных для модификации олигонуклеотидов непосредственно в процессе твердофазного синтеза. С использованием синтезированных реагентов отработать способ получения новых конъюгатов миРНК с три-GalNAc лигандом.

6. Оптимизировать технологию синтеза направляющих РНК, применяемых для редактирования генома, при использовании автоматического олигонуклеотидного синтезатора ASM-2000 с целью увеличения выхода РНК. Получить направляющие CRISPR РНК (полноразмерные, усеченные и в сплит-формате) для тестирования их в комплексе с нуклеазами Cas12a.

Объектом исследования являются нуклеозиды пиримидинового ряда, в том числе конформационно заблокированные по углеводному фрагменту, производные N-ацетилгалактозамина, синтетические ДНК- и РНК-олигонуклеотиды с улучшенными функциональными характеристиками.

Предметом исследования является разработка методов синтеза модифицированных нуклеозидов пиримидинового ряда, в том числе конформационно заблокированных по углеводному фрагменту, и производных N-ацетилгалактозамина, а также применение синтезированных соединений для получения модифицированных нуклеиновых кислот. Кроме того, предметом исследования является усовершенствование технологии получения синтетических направляющих РНК и миРНК-олигонуклеотидов.

Научная новизна:

1. Осуществлен синтез новых 5-перилен-3-илэтиниловых производных нуклеозидов уридинового ряда на основе защищенных 5-иодуридиновых блоков. Полученные соединения проявили высокую активность против вирусов простого герпеса (ВПГ-1), гриппа А (IVA), парагриппа человека типа 3 (PIV-3), респираторно-синцитиального вируса (RSV) и вируса клещевого энцефалита.

2. Впервые синтезирован дейтерированный по атомам С-5 и С-6 2'-дезоксцитидиновый амидофосфитный реагент для введения атомов дейтерия в олигонуклеотиды. Показано, что синтезированные олигонуклеотиды, содержащие дейтерий, снижают активность метилтрансфераз M.NhaI и DNMT 3Ac за счет кинетического изотопного эффекта.

3. Разработаны методики постсинтетической модификации 2'-F и 2'-OMe РНК-олигонуклеотидов методом [3+2]-диполярного циклоприсоединения в растворе и на твердой фазе с использованием синтезированных азидных и алкиновых моно-GalNAc производных.

4. Получены новые моно-GalNAc амидофосфитный реагент, моно-GalNAc носитель и трис-GalNAc(ТЭГ) носитель для модификации нуклеиновых кислот по 3'-, 5'-положениям и в середине цепи в процессе автоматического твердофазного олигонуклеотидного синтеза.

5. Разработан эффективный метод получения конъюгатов 2'-F и 2'-OMe миРНК с три- и трис-GalNAc лигандами. Синтезированы новые конъюгаты, предназначенные для адресной доставки миРНК в гепатоциты.

6. Усовершенствована технология синтеза направляющих РНК с использо-

ванием автоматического олигонуклеотидного синтезатора ASM-2000, с помощью которой получены направляющие CRISPR РНК-олигонуклеотиды, действующие в комплексе с эндонуклеазой Cas12a в формате сплит-системы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Синтез новых 5-перилен-3-илэтиниловых производных нуклеозидов уридинового ряда, в том числе конформационно блокированного по углеводному фрагменту, с использованием защищенных 5-иодуридиновых блоков.

2. Первый синтез дейтерированного по атомам С-5 и С-6 2'-дезокситидинового амидофосфитного реагента исходя из 2'-дезокситидина и получение содержащих дейтерий олигонуклеотидов.

3. Метод получения конъюгатов 2'-F и 2'-OMe миРНК с GalNAc лигандом посредством [3+2]-диполярного циклоприсоединения, катализируемого комплексом $\text{CuI} \cdot \text{P}(\text{OEt})_3$, на твердой фазе с использованием синтезированных азидных и алкиновых моно-GalNAc производных.

4. Синтез новых GalNAc производных исходя из D-галактозамина гидрохлорида для модификации олигонуклеотидов в процессе твердофазного синтеза. Оптимизация методики получения 2'-F и 2'-OMe GalNAc-миРНК с использованием синтезированных реагентов.

5. Оптимизированная технология синтеза направляющих РНК длиной 40 оснований с использованием автоматического олигонуклеотидного синтезатора ASM-2000 и ее применение для получения направляющих CRISPR РНК-олигонуклеотидов, действующих в комплексе с эндонуклеазой Cas12a в формате сплит-системы.

Личный вклад соискателя ученой степени. Проведение экспериментальной части работы, разработка методик, химический синтез соединений и установление их структуры, разработка методик модификации нуклеиновых кислот и получения конъюгатов с РНК, а также анализ научной и патентной литературы по теме диссертации выполнены автором самостоятельно. Общее планирование работы, постановка задач, обсуждение и оформление результатов для опубликования в виде статей выполнялось совместно с научным руководителем к.х.н. В.В. Шманаем. Биологические испытания выполнены проф. Л.М. Шангом (Альбертский университет, Эдмонтон, Канада), к.б.н. А.А. Штро (Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург), к.х.н. Д.И. Осолодкиным (Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва), проф. Н.О. Райхом (факультет химии и биохимии Калифорнийского университета, США), проф. А. Хворовой (Медицинская школа Массачусетского университета, Массачусетс, США), к.б.н. И.О. Мазуниным («Сколтех», Москва).

Апробация результатов диссертации. Материалы диссертационной работы были представлены на Международной конференции «XXII International

roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids» (Париж, Франция, 2016), Международной конференции, посвященной 90-летию академика Д.Г. Кнорре (Новосибирск, Россия, 2016), 9-й Международной конференции по химии и химическому образованию «Свиридовские чтения – 2021» (Минск, Беларусь, 2021), XIX Международной научной конференции «Молодежь в науке – 2022» (Минск, Беларусь, 2022), Форуме молодых исследователей «ХимБиоSeasons 2022» (Калининград, Россия, 2022), Всероссийском форуме молодых исследователей «ХимБиоSeasons 2023» (Калининград, Россия, 2023), Международном форуме «China-Belarus-Russia International Forum of Innovative Nanomedicine» (онлайн форум Китай-Беларусь-Россия, 2023), Международной конференции «3rd China-Belarus International Conference On Biomedical Materials» (Чанчунь, Китай, 2023), 6-й Российской конференции по медицинской химии «МЕДХИМ 2024» (Нижний Новгород, Россия, 2024).

Результаты диссертации вошли в цикл научных работ, включенный в ТОП-10 результатов деятельности ученых НАН Беларуси в области фундаментальных и прикладных исследований за 2016 г.

Опубликованность результатов диссертации. Основные результаты диссертации опубликованы в 18 научных работах, в том числе 10 статьях в рецензируемых научных изданиях общим объемом 11,5 авторского листа, и тезисах 8 докладов конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из содержания, перечня сокращений и обозначений, введения, общей характеристики работы, трех глав, заключения и списка использованных источников. Полный текст диссертации составляет 178 стр., в том числе 103 иллюстрации на 43 стр., 12 таблиц на 5 стр.; список использованных источников состоит из библиографического списка, который включает 234 наименования на 22 стр., и списка публикаций соискателя ученой степени (18 наименований на 3 стр.); 12 приложений на 16 стр.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Глава 1 Модифицирующие реагенты для получения терапевтических олигонуклеотидов (обзор литературы)

Обобщены литературные данные, касающиеся применения терапевтических олигонуклеотидов в качестве альтернативы нуклеозидным препаратам, обсуждены литературные данные по получению и применению реагентов, предназначенных для модификации терапевтических олигонуклеотидов.

Глава 2 Синтез физиологически активных нуклеозидов и реагентов для модификации нуклеиновых кислот (результаты и обсуждение)

Представлены собственные результаты по дизайну и синтезу новых физиологически активных нуклеозидов и реагентов для модификации нуклеиновых

кислот, результаты, касающиеся разработки и усовершенствования подходов к получению модифицированных РНК-олигонуклеотидов.

2.1 Нуклеозидные производные и реагенты

Нуклеозиды являются ключевым классом соединений, который используется для получения множества полезных производных, находящих широкое применение в биотехнологии и медицине. С учетом постоянной потребности в синтезе новых эффективных лекарственных средств, а также необходимости в улучшении свойств уже существующих препаратов поиск новых нуклеозидных производных и реагентов на их основе является важной задачей.

2.1.1 Новые периленилэтинильные производные нуклеозидов уридинового ряда как противовирусные агенты

Известно, что периленилэтинильные производные **1** и **2** (рисунок 1) обладают широким спектром противовирусной активности. Поэтому было решено синтезировать новые производные с изменённой углеводной частью и проверить их как противовирусные агенты. Были выбраны нуклеозиды двух типов: с бициклической углеводной частью, блокированные нуклеозиды (LNA) - структура **3**, и с рибофуранозным остатком - структура **4**.

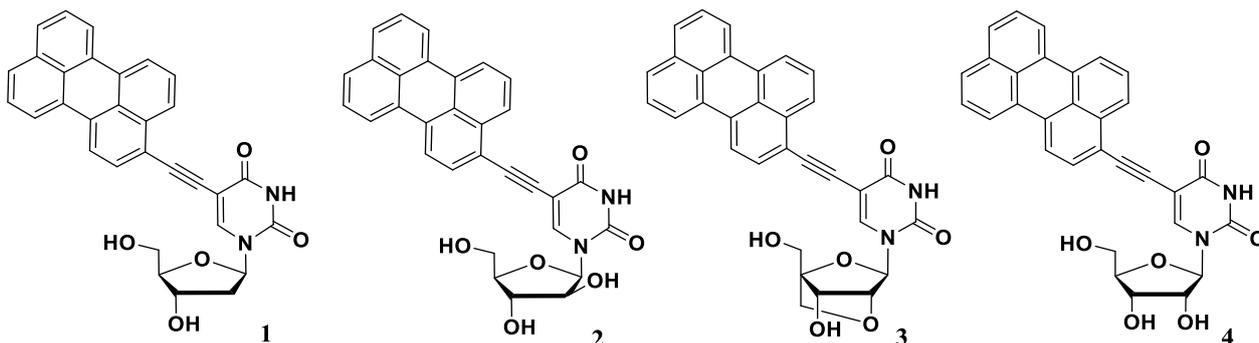
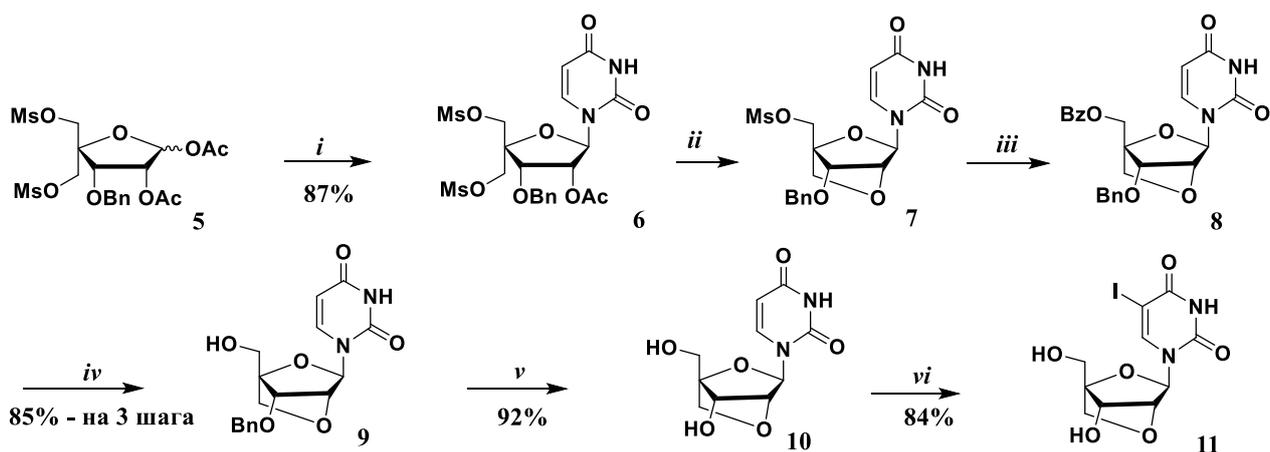


Рисунок 1 – Периленилэтинильные производные нуклеозидов

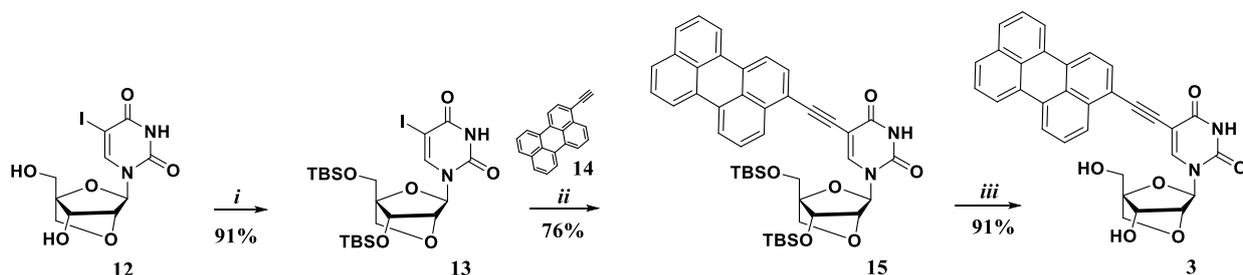
Оригинальность углеводной части в структуре **3** и рибофуранозный остаток в структуре **4**, присутствующий в ряде известных препаратов, таких как рибавирин и азациитидин, послужили достаточным основанием для их синтеза и тестирования. Блокированные структуры могут также повысить стабильность и биодоступность соединений, что делает их более эффективными в терапевтическом применении.

Для получения блокированного производного **3** нами была оптимизирована и масштабирована методика получения ключевого блока **11**, необходимого для синтеза модифицированных нуклеозидов по 5-му положению. Оптимизация на стадии гидрирования позволила сократить в 2 раза количество используемого $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ и масштабировать синтез до 17,5 г продукта **10**, который трансформировали в иодпроизводное **11**. Методики синтеза соединений **10** и **11** были оптимизированы и масштабированы более чем в 2 раза.



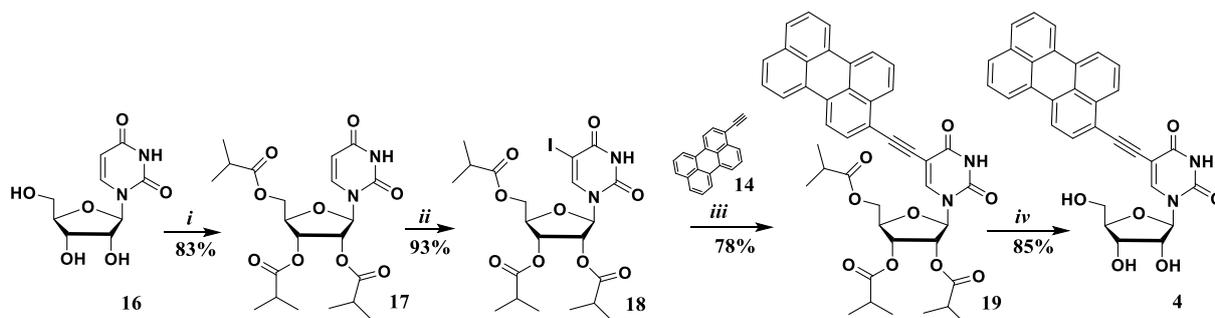
i, урацил, бис(триметилсилил)ацетамид, MeCN, кипячение с обратным холодильником 1 ч, затем TMSOTf, 16 ч; *ii*, NaOH, диоксан-вода, 3 ч; *iii*, NaOBz, ДМФА, 90 °С, 16 ч; *iv*, NaOH, ТГФ-вода, 3 ч; *v*, Pd(OH)₂/C, HCOOH, MeOH, 55 °С, 7 ч; *vi*, I₂, аммоний-церий(IV) нитрат, AcOH, 75 °С, 1 ч

Для синтеза целевого нуклеозида **3** использовали липофильные защитные группы; TBS-защиты существенно повышали растворимость промежуточных продуктов **13** и **15**, что упрощало их хроматографическую очистку. Такой подход позволил эффективно очищать нуклеозид **15** от побочных продуктов, которые образуются при реакции кросс-сочетания по Соногашире. Удаление защитных групп в **15** под действием триэтиламина тригидрофторида давало целевой нуклеозид **3**.



i, TBS-Cl, имидазол, ДМФА, 40 °С, 15 ч; *ii*, Pd(PPh₃)₄, CuI, Et₃N, ДМФА, 35 °С, 12 ч; *iii*, Et₃N·3HF, ТГФ, 40 °С, 20 ч

В случае синтеза нуклеозида **4** применяли изобутирильные защитные группы, которые являются более экономичными по стоимости постановки. Это позволило не только повысить растворимость промежуточных соединений **17–19** в органических растворителях, но и значительно упростить их хроматографическую очистку. Стадию иодирования проводили на защищенном субстрате **17**, что упростило выделение и очистку иодпроизводного **18**. Соединение **19** получали из **18** по реакции Соногаширы. Деблокирование **19** под действием карбоната калия в метаноле давало целевой нуклеозид **4**. Таким образом, по ранее не описанной методике выполнен синтез двух новых 5-перилен-3-илэтиниловых производных нуклеозидов уридинового ряда – **3** и **4**. Структуры всех полученных соединений были подтверждены методами ЯМР и масс-спектрометрии.



i, изомасляный ангидрид, ДМАП, пиридин, 12 ч; *ii*, I₂, аммоний-церий(IV) нитрат, MeCN, 80 °С, 1 ч; *iii*, Pd(PPh₃)₄, CuI, Et₃N, ДМФА, 35 °С, 12 ч; *iv*, K₂CO₃, MeOH, 45 °С, 10 ч

Синтезированные нуклеозиды были проверены на противовирусную активность и оказались эффективными против вируса простого герпеса (ВПГ-1), вируса гриппа А (IVA), вируса парагриппа человека типа 3 (PIV-3), респираторно-синцитиального вируса (RSV) и вируса клещевого энцефалита.

2.1.2 Модифицированный дейтерием нуклеозидный реагент для синтеза олигонуклеотидов при исследовании процесса метилирования ДНК

Процесс метилирования ДНК играет значительную роль в жизнедеятельности млекопитающих, влияя на старение, онкогенез, мутации и другие заболевания. Поэтому изучение и поиск методов регулирования метилирования ДНК являются важными задачами. Ниже показан механизм действия метилтрансферазы (рисунок 2). Мы предложили использовать дейтерированный субстрат для замедления активности метилтрансфераз за счёт кинетического изотопного эффекта.

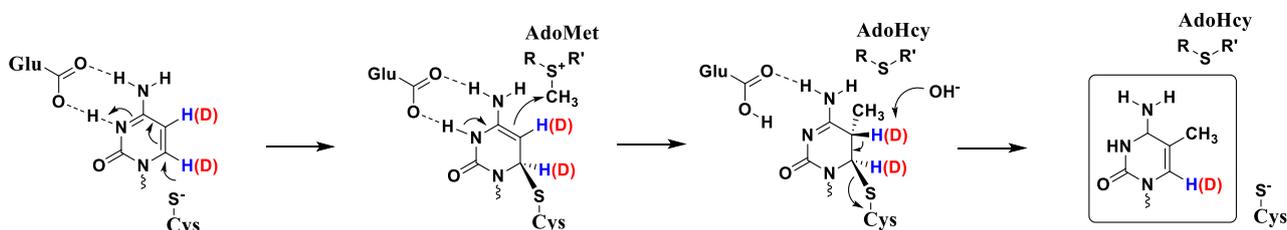
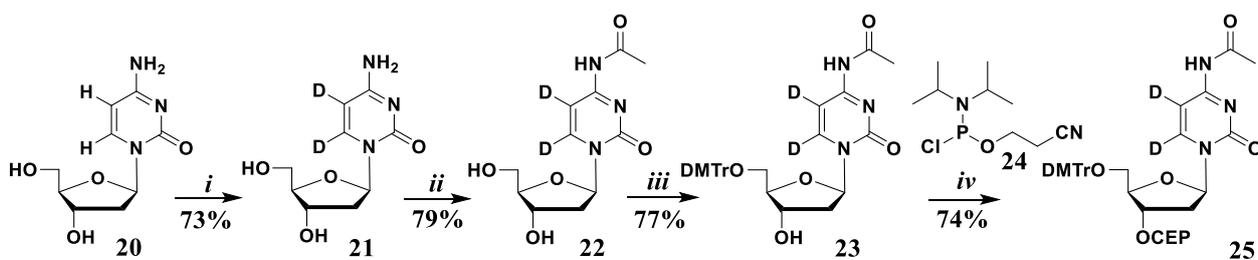


Рисунок 2 – Механизм действия метилтрансфераз

Синтез нового дейтерированного по атомам С-5 и С-6 2'-дезоксцитидинового амидофосфитного реагента **25** начинали исходя из 2'-дезоксцитидина (**20**). Под действием раствора метилата-*d*₃ натрия в CD₃OD получали дейтерированное производное **21**. Далее посредством селективного ацилирования аминогруппы уксусным ангидридом в диметилформамиде получали защищенную структуру **22**. Последующая реакция с 4,4'-диметокситритилхлоридом приводила к производному **23**. Амидофосфитный реагент **25** получали под действием фосфитирующего реагента **24**. Дейтерирование по 5- и 6-положениям гетероцикла подтверждено методом ЯМР-спектроскопии. В спектре **21** наблюдаются лишь остаточные сигналы протонов при 7,79 и 5,73 м.д., интегральная интенсивность которых соответствует 92% дейтерирования по атому С-5, и 97% по атому С-6.



i, CD₃ONa, ДМСО-*d*₆, CD₃OD, 50 °С, 60 ч; *ii*, Ac₂O, ДМФА, 24 ч; *iii*, 4,4'-диметокситритил хлорид, ДМАП, пиридин, 7 ч; *iv*, реагент **24**, основание Хунига, CH₂Cl₂, 2 ч

Характерная картина наблюдается и для ¹³С спектра – вместо одиночных интенсивных сигналов 141,0 и 94,0 (С6 и С5) у 5,6-дидейтеро-2'-дезоксцитозина (**21**) наблюдаются небольшие мультиплеты, что связано с эффектом Оверхаузера и щеплением на дейтерии для ядер ¹³С. Масс-спектры высокого разрешения также подтверждают наличие дейтерия в структурах **21–23**, **25**.

С использованием реагента **25** были получены дейтерированные олигонуклеотиды **ON1**, **ON2**, **ON4** и **ON5** (таблица 1). Для исследования стабильности дейтерированных олигонуклеотидов в водном растворе использовали пентануклеотид **ON1**, который имеет разницу в массе по сравнению со своим протиевым аналогом 4,61 Да (при замещении одного атома дейтерия на 1 атом протия) и 9,21 Да (при замещении двух атомов дейтерия на 2 атома протия). В масс-спектрах **ON1**, хранившегося в течение четырех недель, не наблюдали масс соответствующих продуктам обмена атомов дейтерия на протий, что свидетельствует о хорошей стабильности **ON1** в водных растворах. Олигонуклеотиды **ON2 – ON5** в составе дуплексов были протестированы в качестве субстратов метилтрансфераз M.HhaI и DNMT 3Ac. Для дейтерированных субстратов **ON2** и **ON4** наблюдалось замедление метилирования по сравнению со скоростью процесса в присутствии **ON3** и **ON5**.

Таблица 1 – Модельные олигонуклеотиды

| Олиго- нуклеотид | Последовательность, 5'-3' | Масса, Да | |
|---------------------|--|-----------|----------|
| | | Теор. | Эксп. |
| ON1 | [2D-C][2D-C][2D-C][2D-C][2D-C] | 1393,34 | 1393,16 |
| ON2 | TGGATATCTAGGGG[2D-C]GCTGCTATGATATCG | 9294,91 | 9295,07 |
| ON3 | TGGATATCTAGGGGCGCTGCTATGATATCG | 9293,07 | 9293,67 |
| ON4 | GCTGG[2D-C]GCTAG[2D-C]GCATG[2D-C]GCTGCTG[2D-C]GCTATCTG | 10450,14 | 10450,46 |
| ON5 | GCTGGCGCTAGCGCATGCGCTGCTGCGCTATCTG | 10442,77 | 10443,11 |

Классическим ингибиторам метилтрансфераз (например, 5-азациитидин) свойственны повышенная токсичность и мутагенный эффект. Управление процессами метилирования ДНК с использованием менее токсичных дейтерированных олигонуклеотидов, действие которых основано на кинетическом изотопном эффекте, может открыть новые подходы к исследованию механизмов развития клеток.

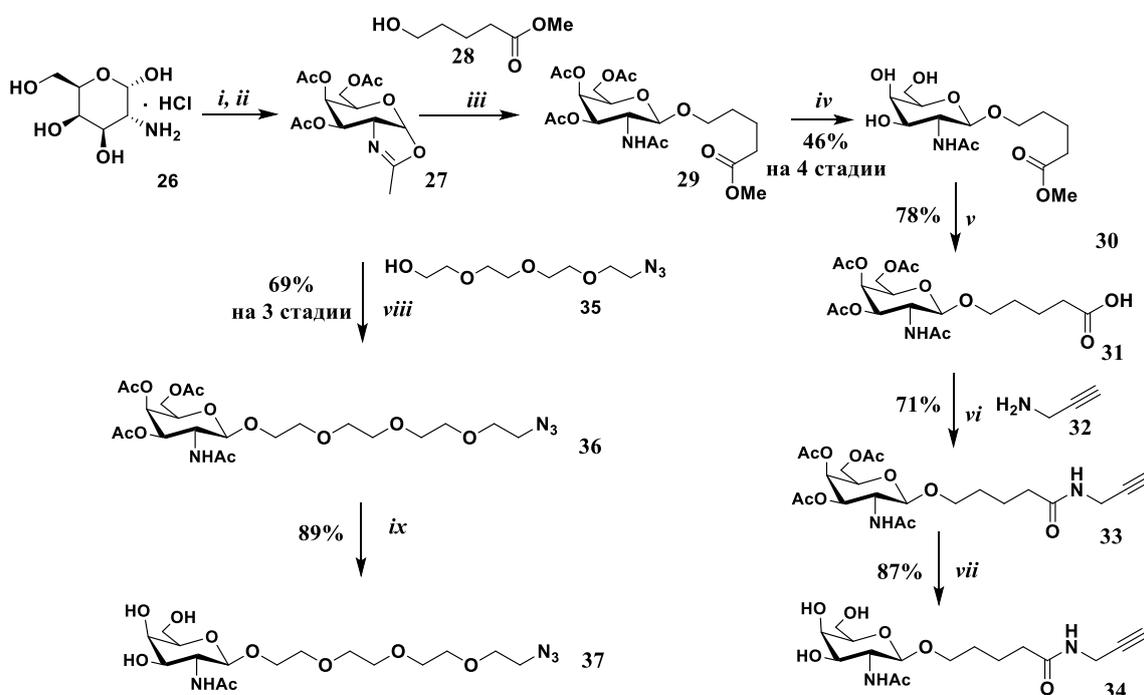
2.2 Модифицированные РНК-олигонуклеотиды

Синтетические РНК-олигонуклеотиды широко используются в биотехнологии и медицине. Активно исследуются миРНК, аптамеры, антисмысловые олигонуклеотиды, антогомиры и направляющие РНК в системе CRISPR-Cas. Для повышения их эффективности часто требуется химическая модификация, улучшение стабильности РНК-цепей, увеличение сродства к мишеням, обеспечение адресной доставки и поиск путей выхода из эндосом.

2.2.1 РНК-олигонуклеотиды, постсинтетически модифицированные лигандами адресной доставки

Одним из самых востребованных конъюгатов РНК с лигандом доставки являются миРНК, модифицированные N-ацетилгалактозамином. Они активно исследуются, проходят клинические испытания, а некоторые уже входят в состав одобренных РНК-препаратов. Поскольку синтез таких лигандов сложен, а выход при автоматическом олигонуклеотидном синтезе составляет лишь 30-50%, перспективной считается постсинтетическая модификация РНК-олигонуклеотидов. Особый интерес вызывают азидные и алкиновые производные, подходящие для модификации методом [3+2]-диполярного циклоприсоединения, в т.ч. катализируемого медью (CuAAC-модификация).

Для синтеза азидных и алкиновых производных **33**, **34**, **36**, **37** нами был оптимизирован способ их получения. При синтезе ранее описанных соединений **27**, **29** и **36** использовали дихлорметана вместо токсичного дихлорэтана, что позволило увеличить выход целевых соединений по сравнению с литературными методиками.

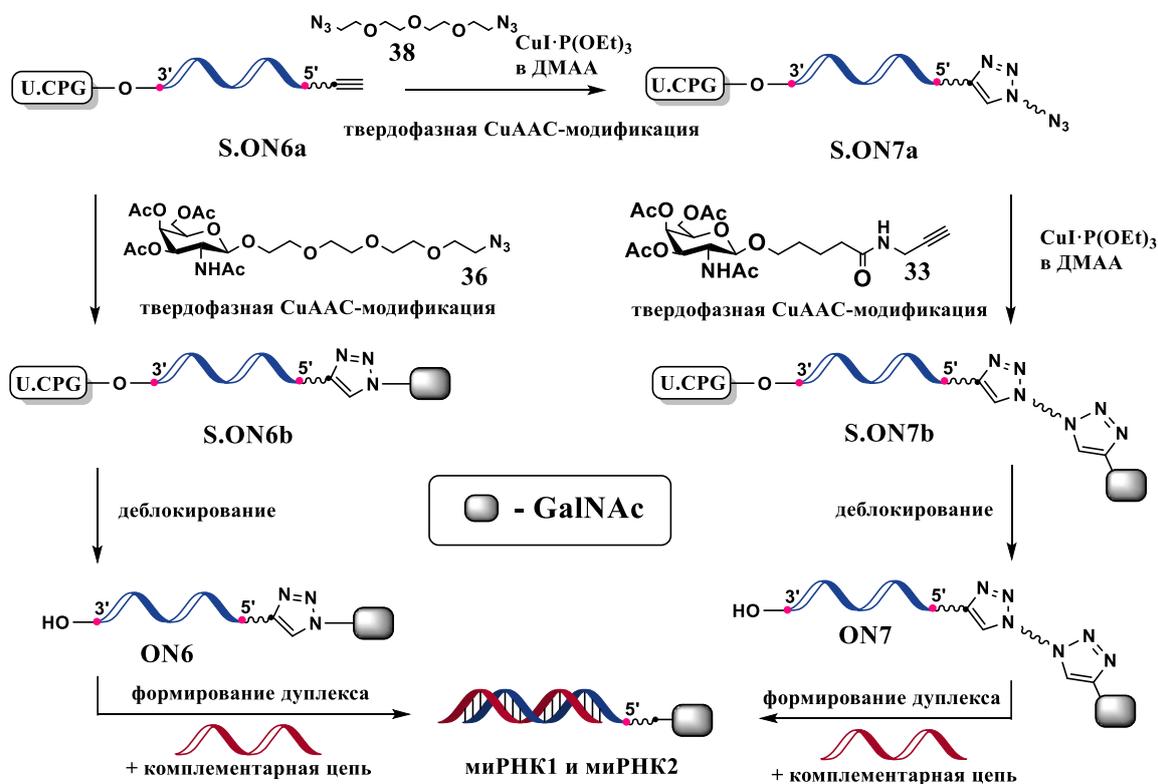


i, Ac₂O, Et₃N, ДМАП, пиридин, 15 ч; *ii*, TMSOTf, CH₂Cl₂, 12 ч; *iii*, TMSOTf, **28**, CH₂Cl₂, 12 ч; *iv*, Et₃N в MeOH, 50 °С, 48 ч; *v*, NaOH, MeOH – вода, 10 ч, затем Ac₂O, пиридин, 15 ч; *vi*, пропаргиламин (**32**), НОВТ, EDC·HCl, CH₂Cl₂, 0 °С, 1 ч, затем перемешивали при к.т. 10 ч; *vii*, K₂CO₃, MeOH, 15 ч; *viii*, TMSOTf, **35**, CH₂Cl₂, 12 ч; *ix*, K₂CO₃, MeOH, 15 ч

Алкиновое производное **33** получали из кислоты **31** конденсацией с пропаргиламином (**32**) под действием EDC·HCl. Дальнейшее мягкое деблокирование под действием карбоната калия в метаноле давало алкин **34** из **33** и азид **37** из **36**.

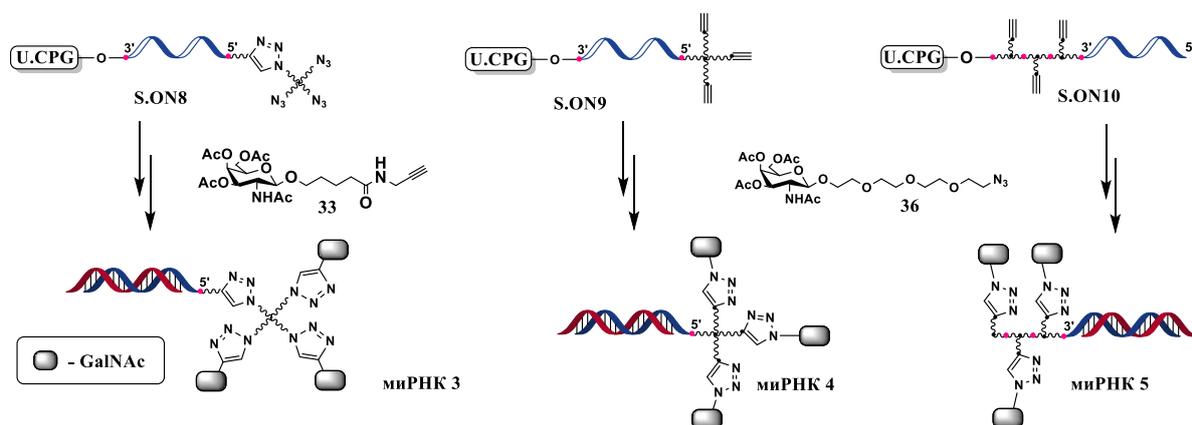
С использованием азида **36** и алкина **33** был разработан метод получения конъюгатов 2'-F и 2'-OMe миРНК с GalNAc посредством [3+2]-диполярного циклоприсоединения на твердой фазе. На универсальном твердофазном носителе (U.CPG) в процессе олигонуклеотидного синтеза был получен твердофазный носитель, несущий 2'-F и 2'-OMe РНК-олигонуклеотидную цепь, модифицированную по 5'-положению алкиновой функцией **S.ON6a**. Носитель с азидной функцией **S.ON7a** получали из **S.ON6a** и диазида **38** посредством [3+2]-диполярного присоединения на твердой фазе.

В качестве каталитических систем испытывали 10, 50 и 100 мМ растворы CuBr·ТБТА и CuI·P(OEt)₃ в разных растворителях. Высокие выходы и оптимальные условия модификации были получены при использовании 100 мМ раствора CuI·P(OEt)₃ в N,N-диметилацетамиде (ДМАА). Твердофазная CuAAC-модификация **S.ON6a** и **S.ON7a** 0,01 М растворами **36** и **33** в ДМАА, содержащими 100 мМ CuI·P(OEt)₃ в ДМАА приводила к GalNAc-модифицированным РНК, закрепленным на твердой фазе (**S.ON6b** и **S.ON7b**). Дальнейшее деблокирование давало модифицированные РНК **ON6** и **ON7**, которые позволяли получить 2'-F и 2'-OMe миРНК **1** и миРНК **2**.



Для получения три- и трис-GalNAc-модифицированных РНК-олигонуклеотидов использовались иммобилизованные олигонуклеотиды **S.ON8** – **S.ON10**, содержащие по три азидные или алкиновые группы. Твердофазная

CuAAC-модификация, деблокирование и последующее формирование дуплекса приводили к 2'-F и 2'-ОМе миРНК 3 – миРНК 5.



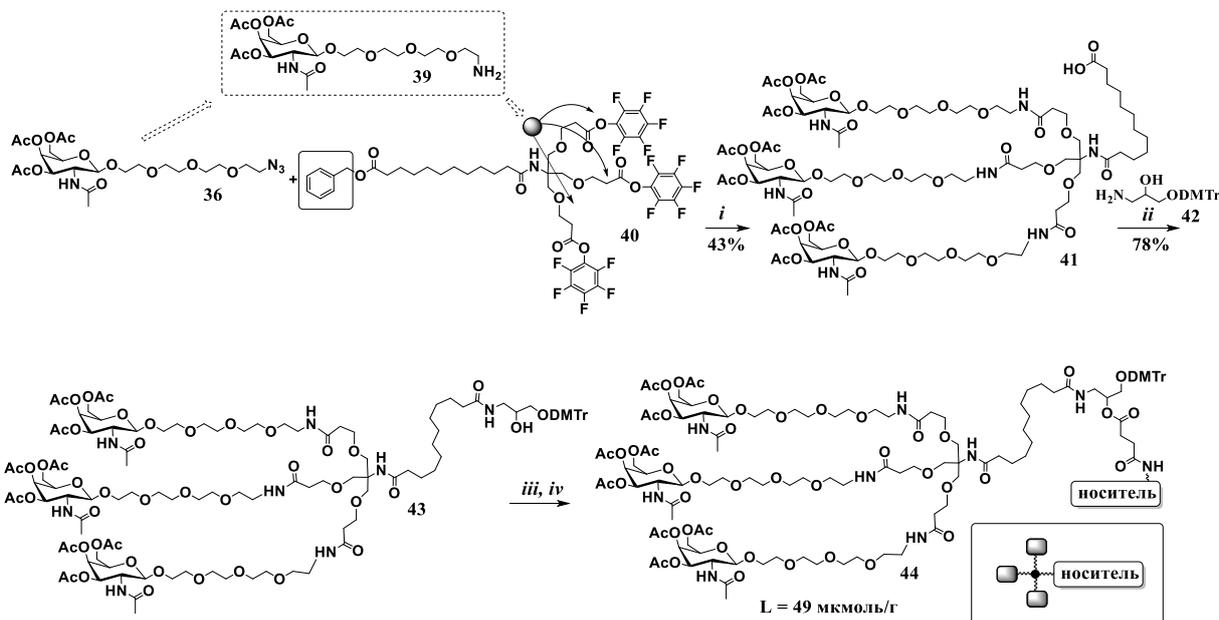
Разработанный подход и реагенты позволяют быстро и эффективно вводить как мономерные, так и кластерные N-ацетилгалактозаминовые модификации в миРНК для тестирования как *in vitro*, так и *in vivo*. Этот подход является перспективным благодаря своей универсальности, т. к. не только имеет большой потенциал в получении кластерных модификаций, но и позволяет комбинировать различные лиганды, тем самым увеличивая селективность действия модифицированных миРНК.

2.2.2 РНК-олигонуклеотиды, модифицированные лигандами адресной доставки непосредственно в процессе синтеза

Использование заранее синтезированных реагентов и материалов для автоматического олигонуклеотидного синтеза упрощает и удешевляет процесс. Стандартные автоматические операции легче масштабировать, а отсутствие промежуточных этапов постсинтетической модификации и дополнительных очисток делает синтез целевых олигонуклеотидов проще, быстрее и эффективнее. Новые твердофазные носители и амидофосфитные реагенты, позволяющие вводить лиганды адресной доставки непосредственно в процессе синтеза, необходимы для получения терапевтических олигонуклеотидов.

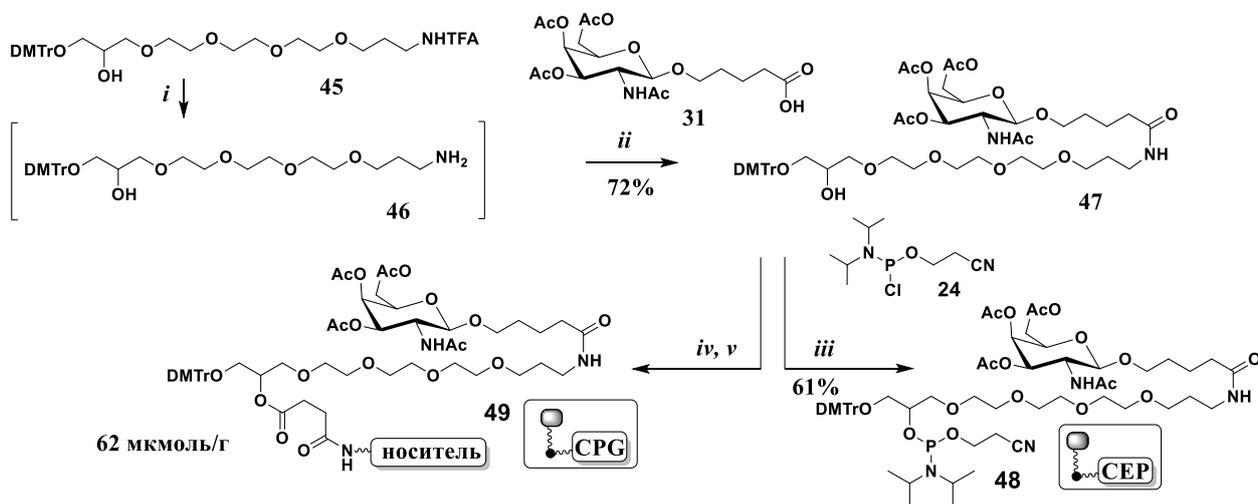
Выполнен синтез новых производных N-ацетилгалактозамина для модификации олигонуклеотидов в процессе твердофазного синтеза. Оптимизация условий синтеза трис-GalNAc твердофазного носителя **44** позволила избежать проблемы образования ряда побочных продуктов и при этом сделать схему более удобной. Ниже представлен подход, позволяющий проводить сразу несколько превращений за одну стадию. При восстановлении водородом на Pd/C происходит снятие бензильной группы с соединения **40**, восстановление азида **36** до амина **39**, который сразу же реагирует с активированным субстратом с образованием кислоты **41**. Полученное соединение **41** легко подвергается хроматографической очистке. Таким образом, нам удалось совместить три стадии в одну с достаточно высоким выходом. Дальнейшая конденсация **41** с диметокситритильным

производным **42** приводила к соединению **43**, которым после ацилирования гидроксильной группы янтарным ангидридом модифицировали аминосодержащий носитель (CPG-NH₂) и получали носитель **44** с высокой загрузкой (49 мкмоль/г).



i, H₂, Pd/C, ТГФ, 5 ч; *ii*, EDC·HCl, HOBT, Et₃N, CH₂Cl₂, 12 ч; *iii*, янтарный ангидрид, ДМАП, Et₃N, CH₂Cl₂, 12 ч; *iv*, CPG-NH₂, ГБТУ, ДИПЭА, ацетонитрил, 12 ч

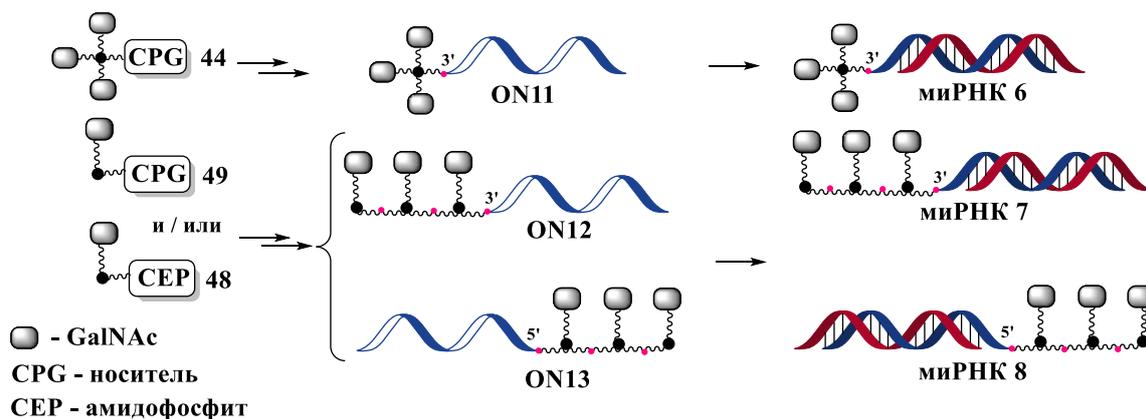
Для модификации нуклеиновых кислот по 3'-, 5'-положениям и в середине цепи непосредственно в процессе олигонуклеотидного синтеза были разработаны новые моно-GalNAc амидофосфитный реагент **48** и твердофазный носитель **49**.



i, K₂CO₃, MeOH, вода, 12 ч; *ii*, EDC·HCl, HOBT, Et₃N, CH₂Cl₂, 12 ч; *iii*, **2.37**, Et₃N, CH₂Cl₂, 2 ч; *iv*, янтарный ангидрид, ДМАП, Et₃N, CH₂Cl₂, 12 ч; *v*, CPG-NH₂, ГБТУ, ДИПЭА, ДМАП, ацетонитрил, 12 ч

Исходя из соединения **45**, под действием карбоната калия было получено аминпроизводное **46**, которое конденсировали с кислотой **31** и получали соединение **47**. Реакция **47** с фосфитирующим реагентом **24** приводила к целевому амидофосфиту (СЕР) **48**. Трансформация **47** в гемисукцинатное производное и

последующая конденсация его с аминогруппой на твердофазном носителе (CPG-NH₂) приводили к материалу (CPG) **49** (загрузка 62 мкмоль/г).



С использованием полученных реагентов были отработаны условия синтеза конъюгатов с 2'-F и 2'-OMe РНК (**ON11 – ON13**). Из полученных конъюгатов были сформированы дуплексы **миРНК 6 – миРНК 8** для тестирования как *in vitro*, так и *in vivo*; а **миРНК 6** показало отличные результаты *in vivo* при исследовании процесса подавления мРНК циклофилина В.

2.3 Направляющие РНК для CRISPR-Cas

Ключевым элементом системы CRISPR-Cas (сгруппированные регулярно чередующиеся короткие палиндромные повторы/ассоциированный белок), применяемой для редактирования генома, являются синтетические направляющие РНК (нРНК). Они определяют место разреза в двухцепочечной ДНК-мишени. Длина нРНК зависит от типа системы: около 100 нуклеотидов для Cas9 и порядка 40 – для Cas12a. Активное изучение CRISPR-Cas увеличивает потребность в синтетических нРНК.

Синтез РНК-олигонуклеотидов длиной 40 оснований на автоматическом синтезаторе ASM-2000 с использованием стандартных заводских протоколов и реагентов не привел к удовлетворительному результату: содержание целевого олигонуклеотида было низким, а количество коротких фрагментов – значительным (рисунок 3). С целью повышения эффективности синтеза РНК был оптимизирован протокол проведения реакции и подобран состав реагентов.

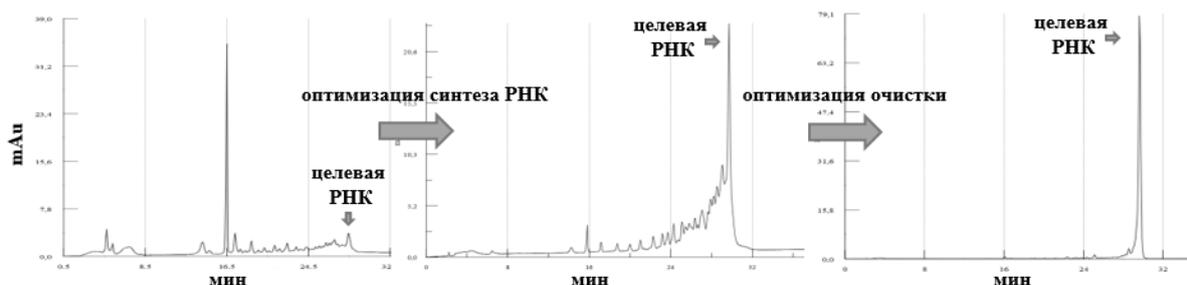


Рисунок 3 – Хроматограммы направляющей РНК до и после оптимизации синтеза РНК и способа ее очистки

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. С использованием защищенного конформационно блокированного по углеводному фрагменту 5-иодуридина (5-I-LNA-U) впервые синтезирован конформационно блокированный по углеводному фрагменту 5-перилен-3-илэтинилуридин, который проявляет активность против вируса простого герпеса (ВПГ-1). На основе защищенного 5-иодуридина впервые получен 5-перилен-3-илэтинилуридин, который проявляет активность против вирусов гриппа А (IVA), парагриппа человека типа 3 (PIV-3), респираторно-синцитиального вируса (RSV) и вируса клещевого энцефалита [4-А; 5-А; 6-А; 11-А].

2. Исходя из природного 2'-дезоксцитидина, впервые синтезирован дейтерированный по атомам С-5 и С-6 2'-дезоксцитидиновый амидофосфитный реагент для получения дейтерированных олигонуклеотидов, для которых был показан кинетический изотопный эффект в процессе метилирования ДНК под действием метилтрансфераз M.HhaI и DNMT 3Ac [1-А].

3. Исходя из D-галактозамина, синтезированы алкиновые и азидные моно-GalNAc производные, с использованием которых разработан удобный постсинтетический метод получения конъюгатов 2'-F и 2'-OMe миРНК с одним и тремя аффинными лигандами посредством [3+2]-диполярного циклоприсоединения. Разработанный метод применен для эффективного введения как мономерных, так и кластерных N-ацетилгалактозаминовых модификаций в миРНК для их тестирования как *in vitro*, так и *in vivo* [2-А; 12-А; 13-А; 17-А; 18-А].

4. Разработаны методики синтеза новых моно-GalNAc амидофосфитного реагента, моно-GalNAc носителя и трис-GalNAc(ТЭГ) носителя, предназначенных для модификации РНК-олигонуклеотидов в процессе автоматического твердофазного синтеза. С использованием оригинальных моно- и трис-GalNAc производных получены конъюгаты миРНК, содержащие три аффинных лиганда. Полученные трис-N-ацетилгалактозаминовые производные миРНК проявили высокую *in vitro* и *in vivo* активность в процессе РНК-интерференции [3-А; 7-А; 14-А; 17-А; 18-А].

5. Оптимизирован процесс твердофазного синтеза направляющих РНК-олигонуклеотидов с использованием синтезатора ASM-2000. Разработанный протокол успешно использован для получения как полноразмерных направляющих РНК-олигонуклеотидов, так и коротких РНК. С использованием оптимизированной методики синтезированы CRISPR РНК-олигонуклеотиды, действующие в комплексе с эндонуклеазой Cas12a в формате сплит-системы [8-А; 9-А; 10-А; 15-А; 16-А].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. На основе методики синтеза производных конформационно блокированных по углеводному фрагменту нуклеозидов (LNA) разработана и внедрена в

производство технология получения амидофосфитных конформационно блокированных реагентов (Акт внедрения технологии в производство; Технические условия на конформационно блокированные нуклеозиды ТУ ВУ 100185198.200-2019; Акт о внедрении результатов диссертационного исследования).

2. Методика синтеза трис-N-ацетилгалактозаминового(ТЭГ) носителя легла в основу разработанного технологического процесса получения трис-GalNAc-TEG-CPG (Опытно-промышленный регламент на синтез модифицирующего твердофазного носителя трис-GalNAc-TEG-CPG).

3. Методика синтеза моно-GalNAc амидофосфитного реагента легла в основу технологического процесса получения амидофосфитного реагента GalNAc-CEP (Опытно-промышленный регламент на синтез фосфорамидитного реагента GalNAc-CEP).

4. Оптимизированный процесс твердофазного синтеза направляющих РНК с использованием синтезатора ASM-2000 лёг в основу разработанной и внедренной в производство технологии получения синтетических направляющих РНК для технологии геномного редактирования CRISPR (Акт готовности производства к выпуску; технические условия на синтетические направляющие РНК для технологии геномного редактирования CRISPR; Акты о внедрении результатов диссертационного исследования).

5. Способ получения дейтерированных олигонуклеотидов, вошедший в ТОП-10 результатов деятельности ученых НАН Беларуси в области фундаментальных и прикладных исследований за 2016 год, может найти применение в исследовании процессов метилирования ДНК, а также открыть новые подходы к исследованию механизмов развития клеток.

6. Моно- и трис-GalNAc реагенты могут найти применение в разработке новых эффективных препаратов для генной терапии, а также в производстве отечественных аналогов уже известных выведенных на рынок препаратов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях

1-A. Woodcock C.B., **Ulashchik E.A.**, Poopeiko N.E., Shmanai V.V., Reich N.O., Shchepinov M.S. Rational Manipulation of DNA Methylation by Using Isotopically Reinforced Cytosine // ChemBioChem. – 2016. – Vol. 17, № 21. – P. 2018–2021.

2-A. Farzan V.M., **Ulashchik E.A.**, Martynenko-Makaev Y.V., Kvach M.V., Aparin I.O., Brylev V.A., Prikazchikova T.A., Maklakova S.Y., Majouga A.G., Ustinov A.V., Shipulin G.A., Shmanai V.V., Korshun V.A., Zatsepin T.S. Automated Solid-Phase Click Synthesis of Oligonucleotide Conjugates: From Small Molecules to Diverse N-Acetylgalactosamine Clusters // Bioconjugate Chemistry. – 2017. – Vol. 28, № 10. – P. 2599–2607.

3-A. Sharma V.K., Osborn M.F., Hassler M.R., Echeverria D., Ly S., **Ulashchik E.A.**, Martynenko-Makaev Y.V., Shmanai V.V., Zatsepin T.S., Khvorova A., Watts J.K. Novel Cluster and Monomer-Based GalNAc Structures Induce Effective Uptake of siRNAs in Vitro and in Vivo // *Bioconjugate Chemistry*. – 2018. – Vol. 29, № 7. – P. 2478–2488.

4-A. Speerstra S., Chistov A.A., Proskurin G.V., Aralov A.V., **Ulashchik E.A.**, Streshnev P.P., Shmanai V.V., Korshun V.A., Schang L.M. Antivirals acting on viral envelopes via biophysical mechanisms of action // *Antiviral Res.* – 2018. – Vol. 149. – P. 164–173.

5-A. Николаева Ю.В., **Улащик Е.А.**, Чекерда Е.В., Галочкина А.В., Слесарчук Н.А., Чистов А.А., Никитин Т.Д., Коршун В.А., Шманай В.В., Устинов А.В., Штро А.А. Производные 5-(перилен-3-илэтинил)урацила ингибируют репродукцию респираторных вирусов // *Биоорганическая химия*. – 2020. – Т. 46, № 3. – С. 273–279.

6-A. Slesarchuk N.A., Khvatov E.V., Chistov A.A., Proskurin G.V., Nikitin T.D., Lazarevich A.I., Ulanovskaya A.A., **Ulashchik E.A.**, Orlov A.A., Jegorov A.V., Ustinov A.V., Tyurin A.P., Shmanai V.V., Ishmukhametov A.A., Korshun V.A., Osolodkin D.I., Kozlovskaya L.I., Aralov A.V. Simplistic perylene-related compounds as inhibitors of tick-borne encephalitis virus reproduction // *Bioorganic Med. Chem. Lett. Elsevier*. – 2020. – Vol. 30, № 10. – P. 28–30.

7-A. **Ulashchik E.A.**, Martynenko-Makaev Y.V., Akhlamionok T.P., Melnik D.M., Shmanai V.V., Zatsepin T.S. Synthesis of GalNAc-Oligonucleotide Conjugates Using GalNAc Phosphoramidite and Triple-GalNAc CPG Solid Support // *Methods Mol. Biol.* – 2021. – Vol. 2282. – P.101–118.

8-A. Shebanova R., Nikitchina N., Shebanov N., Mekler V., Kuznedelov K., **Ulashchik E.**, Vasilev R., Sharko O., Shmanai V., Tarassov I., Severinov K., Entelis N., Mazunin I. Efficient target cleavage by Type V Cas12a effectors programmed with split CRISPR RNA // *Nucleic Acids Res.* – 2022. – Vol. 50, № 2. – P. 1162–1173.

9-A. **Улащик Е.А.**, Ахламенок Т.П., Борищик П.Ю., Шарко О.Л., Шманай В.В. Оптимизация технологии получения направляющих РНК на планшетном автоматическом синтезаторе // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хім. навук.* – 2022. – Т. 58, № 4. – С. 398–406.

10-A. Nikitchina N., **Ulashchik E.**, Shmanai V., Heckel A., Tarassov I., Mazunin I., Entelis N. Targeting of CRISPR-Cas12a crRNAs into human mitochondria // *Biochimie*. – 2024. – Vol. 217. – С. 398–406.

Тезисы докладов и материалы конференций

11-A. Chistov A.A., Proskurin G.V., Orlov A.A., Aralov A.V., Brylev V.A., Tyurin A.P., Prokhorenko I.A., Kutyaakov S.V., Aparin I.O., Ivanov N.M., **Ulashchik E.A.**, Streshnev F.P., Sapozhnikova K.A., Korelskaya K.S.,

Myasoutova A.A., Shmanai V.V., Ustinov A.V., Osolodkin D.I., Korshun V.A. Perylene derivatives of nucleosides: synthesis and antiviral properties // Материалы международной конференции «Химическая биология», посвященной 90-летию академика Д.Г. Кнорре. – Новосибирск, Россия, 2016. – С. 52.

12-А. **Ulashchik E.**, Farzan V., Martynenko Y., Aparin I., Brylev V., Ustinov A., Shipulin G., Majouga A., Kotelianski V., Shmanai V., Korshun V., Zatsepin T. Synthesis of oligonucleotide conjugates by solid phase CuAAC: application to GalNAc dendrimers and dye labelling // XXII International roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids: abstract book notebook. – France, Paris, 2016. – P. 430–431.

13-А. Lamekina Y.P., **Ulashchik E.A.**, Akhlamionok T.P., Normantovich V.V., Sharko O.L., Shmanai V.V. Nanoporous support for automated synthesis of cyclooctyne oligonucleotides and further solid-phase copper-free modification // Тезисы докладов 9-й Международной конференции по химии и химическому образованию «Свиридовские чтения – 2021». – Минск, Беларусь, 2021. – С. 89.

14-А. **Улащик Е.А.**, Ахламенок Т.П. Оптимизация схемы синтеза N-ацетилгалактозаминового носителя для получения 3'-модифицированных малых интерферирующих РНК // Материалы XIX Международной научной конференции «Молодежь в науке – 2022». – Минск, Беларусь, 2022. – С. 616–618.

15-А. Антипина М.И., Каспаров С.А., **Улащик Е.А.**, Шарко О.Л., Терешко А.Б., Шманай В.В. Подавление экспрессии гентингина (Huntingtin, НТТ) в мозге мышей с помощью разветвленных олигонуклеотидов // Материалы Форума молодых исследователей «ХимБиоSeasons 2022». – Калининград, Россия, 2022. – С. 4.

16-А. Антипина М.И., Васильев А.А., Романишин А.О., **Улащик Е.А.**, Шманай В.В., Каспаров С.А. Молекулярная терапия нейродегенеративных заболеваний полиглутаминового тракта с применением разветвленных олигонуклеотидов // Материалы Всероссийского форума молодых исследователей «ХимБиоSeasons 2023». – Калининград, Россия, 2023. – С. 12.

17-А. **Ulashchik E.A.**, Sharko O.L., Shmanai V.V. N-Acetylgalactosamine Reagents and Materials for Obtaining Objects with Effective Targeting to Hepatocytes // Materials of the Online China-Belarus-Russia International Forum of Innovative Nanomedicine. – 2023. – P. 10.

18-А. **Улащик Е.А.**, Борищик П.Ю., Шарко О.Л., Зацепин Т.С., Шманай В.В. Реагенты и материалы для получения конъюгатов N-ацетилгалактозамина (GalNAc) с терапевтическими олигонуклеотидами // Материалы 6-й Российской конференции по медицинской химии «МЕДХИМ 2024». – Нижний Новгород, Россия, 2024. – С. 108.

РЕЗЮМЕ

Улащик Егор Александрович

Синтез модифицированных нуклеозидов и олигонуклеотидов как перспективных терапевтических агентов

Ключевые слова: модифицированные нуклеозиды, дейтерированные олигонуклеотиды, N-ацетилгалактозамин, малые интерферирующие РНК, направляющие РНК, олигонуклеотиды, азид-алкиновое циклоприсоединение.

Цель работы: разработка методов структурной модификации нуклеозидов и олигонуклеотидов и исследование их биологической активности, а также усовершенствование технологии получения синтетических миРНК и направляющих РНК-олигонуклеотидов.

Объекты исследования: нуклеозиды пиримидинового ряда, конформационно заблокированные по углеводному фрагменту нуклеозиды, производные GalNAc, синтетические ДНК- и РНК-олигонуклеотиды с улучшенными функциональными характеристиками.

Предмет исследования: методы синтеза модифицированных нуклеозидов пиримидинового ряда и производных N-ацетилгалактозамина, применение синтезированных соединений для получения модифицированных нуклеиновых кислот, усовершенствование технологии получения синтетических направляющих РНК и миРНК.

Методы исследования: современные методы органического и олигонуклеотидного синтеза, ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия высокого разрешения, ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС, гель-электрофорез.

Полученные результаты и их новизна: разработаны методы синтеза периленовых и дейтерированных нуклеозидов, синтезированы новые моно- и трис-GalNAc-производные, получен ряд конъюгатов GalNAc с РНК, предложен новый подход к постсинтетической модификации РНК производными GalNAc, усовершенствована технология синтеза направляющих РНК с использованием синтезатора ASM-2000, получены направляющие CRISPR РНК-олигонуклеотиды, работающие в сплит-системе.

Рекомендации по использованию: полученные биологически активные производные могут быть использованы для разработки противовирусных препаратов и средств генной терапии. Модифицированные олигонуклеотиды могут быть применены для исследования процессов метилирования ДНК и редактирования генома по технологии CRISPR.

Область применения: биоорганическая химия, получение биоконъюгатов нуклеиновых кислот, молекулярная биология, медицина.

SUMMARY

Ulashchik Egor Aleksandrovich

Synthesis of modified nucleosides and oligonucleotides as promising therapeutic agents

Keywords: modified nucleosides, deuterated oligonucleotides, N-acetylgalactosamine, small interfering RNAs, guide RNAs, oligonucleotides, azide-alkyne cycloaddition.

Objective of research: development of methods for the structural modification of nucleosides and oligonucleotides and research of their biological activity, improvement of the technology for producing synthetic siRNAs and guide RNA oligonucleotides.

Object of research: pyrimidine nucleosides, conformationally locked nucleosides at the carbohydrate moiety, GalNAc derivatives, synthetic DNA and RNA oligonucleotides with improved functional characteristics.

Subject of research: methods for the synthesis of modified pyrimidine nucleosides and N-acetylgalactosamine derivatives, the use of synthesized compounds to obtain modified nucleic acids, improvement of the technology for obtaining synthetic guide RNAs and siRNA.

Research methods: modern methods of organic and oligonucleotide synthesis, NMR spectroscopy, high resolution mass spectrometry, HPLC, HPLC-MS, gel electrophoresis.

Obtained results and their novelty: methods for the synthesis of perylene nucleoside derivatives and deuterated nucleosides were developed, new mono- and tris-GalNAc derivatives were synthesized, a series of GalNAc conjugates with RNA was obtained, a new approach to the postsynthetic modification of RNA with GalNAc derivatives was proposed, the technology for the synthesis of guide RNAs was improved using the ASM-2000 synthesizer, split CRISPR guide RNA oligonucleotides were obtained.

Application guidelines: obtained biologically active derivatives can be used to develop antiviral drugs and for gene therapy. Modified oligonucleotides can be used to study the processes of DNA methylation and genome editing using CRISPR technology.

Fields of application: bioorganic chemistry, synthesis of nucleic acid bioconjugates, molecular biology, medicine.

РЭЗІЮМЭ

Улашчык Ягор Аляксандравіч

Сінтэз мадыфікаваных нуклеазідаў і алігануклеатыдаў як перспектыўных тэрапеўтычных агентаў

Ключавыя словы: мадыфікаваныя нуклеазіды, дейтэраваныя алігануклеатыды, N-ацэтылгалактозамін (GalNAc), малыя інтэрферуючыя РНК, накіроўваючыя РНК, алігануклеатыды, азід-алкінавае цыкладалучэнне.

Мэта працы: распрацоўка метадаў структурнай мадыфікацыі нуклеазідаў і алігануклеатыдаў і даследаванне іх біялагічнай актыўнасці, а таксама ўдасканаленне тэхналогіі атрымання сінтэтычных міРНК і накіроўваючых РНК-алігануклеатыдаў.

Аб'екты даследавання: нуклеазіды пірымідынавага шэрагу, канфармацыйна блакіраваныя нуклеазіды па вугляводнай частцы, вытворныя GalNAc, сінтэтычныя ДНК- і РНК-алігануклеатыды з палепшанымі функцыянальнымі характарыстыкамі.

Прадмет даследавання: метады сінтэзу мадыфікаваных нуклеазідаў пірымідынавага шэрагу і вытворных N-ацэтылгалактозаміна, выкарыстанне сінтэзаваных злучэнняў для атрымання мадыфікаваных нуклеінавых кіслот, удасканаленне тэхналогіі атрымання сінтэтычных накіроўваючых РНК і міРНК.

Метады даследавання: сучасныя метады арганічнага і алігануклеатыднага сінтэзу, ЯМР-спектраскапія, мас-спектраметрыя высокай разрознасці, высокаэфектыўная вадкасная храматаграфія, высокаэфектыўная вадкасная храматаграфія з мас-спектраметрыяй, гель-электрафарэз.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: распрацаваны метады сінтэзу перыленавых вытворных нуклеазідаў і дейтэраваных нуклеазідаў, сінтэзаваны новыя мона- і трыс-GalNAc-вытворныя, атрыманы шэраг кан'югатаў GalNAc з РНК, прапанаваны новы падыход да постсінтэтычнай мадыфікацыі РНК вытворнымі GalNAc, удасканалена тэхналогія сінтэзу накіроўваючых РНК з выкарыстаннем сінтэзатара ASM-2000, атрыманы накіроўваючыя CRISPR РНК-алігануклеатыды, якія працуюць як спліт-сістэма.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: атрыманыя біялагічна актыўныя вытворныя могуць быць выкарыстаны для распрацоўкі супрацьвірусных прэпаратаў і сродкаў геннай тэрапіі. Мадыфікаваныя алігануклеатыды могуць быць ужытыя для даследавання працэсаў метыліравання ДНК і рэдагавання геному па тэхналогіі CRISPR.

Вобласць ужывання: біяарганічная хімія, атрыманне біякан'югатаў нуклеінавых кіслот, малекулярная біялогія, медыцына.

Подписано в печать 04.03.2025.
Формат 60×84/16. Бумага офсетная. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 1,34. Тираж 60 экз. Заказ № 79.

ФТИ НАН Беларуси.
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 2/12 от 21.11.2013.
220084, ул. Академика Купревича, 10, г. Минск.