

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

Объект авторского права

УДК 54.027+542.06+547.39+577.115.3

ФОМИЧ
МАКСИМ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**СИНТЕЗ ИЗБИРАТЕЛЬНО ДЕЙТЕРИРОВАННЫХ
ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ
И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

по специальности 02.00.03 – органическая химия

Минск, 2023

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:

Литвиновская Раиса Павловна,
доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси

Колесник Ирина Андреевна,
кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории химии гетероциклических соединений Института физико-органической химии НАН Беларуси

Оппонирующая организация:

Институт химии новых материалов НАН Беларуси

Защита состоится «18» января 2024 г. в 10.00 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 Ученого 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 «15» декабря 2023 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций Д 01.21.01
кандидат химических наук

Т.С. Божок

ВВЕДЕНИЕ

Полиненасыщенные жирные кислоты, находящиеся в составе липидов мембран, восприимчивы к процессам окисления. Клеточное дыхание приводит к образованию в клетке свободных радикалов. С ними преимущественно справляются антиоксидантные системы организма, однако иногда радикалам удаётся обходить эту защиту и вступать в реакцию с полиненасыщенными жирными кислотами. В результате искажаются специфические физические свойства мембран, происходит разрушение клетки, образуются токсичные продукты окисления, нарушаются биохимические процессы. Считается, что накопление реакционноспособных продуктов перекисного окисления отвечает за развитие некоторых заболеваний.

Для стабилизации полиненасыщенных жирных кислот атомы протия в ключевых бис-аллильных положениях можно заменить более тяжёлыми атомами дейтерия. Благодаря такому избирательному дейтерированию возникает кинетический изотопный эффект, проявляющийся в замедлении процессов, для которых лимитирующей стадией является отрыв водорода из бис-аллильного положения, в том числе процессов перекисного окисления.

Множественность биологических функций полиненасыщенных жирных кислот позволяет заключить, что стабилизация бис-аллильных положений путём замены протия на дейтерий и проявление кинетического изотопного эффекта в процессах окисления нуждаются в подробном исследовании, поскольку это позволяет получить не только важные теоретические данные, но и полезные практические результаты.

Основой данной диссертации являются новые методы синтеза, выделения и очистки жирных кислот, избирательно дейтерированных по бис-аллильным положениям, их производных и конъюгатов. Важность данной работы заключается в том, что полученные соединения и разработанные подходы являются инструментом для дальнейших физико-химических и биологических исследований. Результаты диссертации использованы для разработки фармацевтических препаратов и изучения метаболизма полиненасыщенных жирных кислот.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами) и темами. Диссертационная работа выполнялась в рамках ГПНИ «Химические технологии и материалы», подпрограмма «Биологически активные вещества», задание 2.05 «Разработка методов синтеза реагентов для сайт-специфической модификации белков, липидов и нуклеиновых кислот» (№ гос. рег. 20160516 от 01.04.2016 г.); контракта № 356-11-USA от 30.01.2011 г. Тема работы соответствует приоритетным направлениям научных исследований РБ на 2016-2020 гг.,

утвержденным Постановлением Совета Министров № 190 от 12.03.2015 г. «Химический синтез и продукты», «Медицина и фармация».

Цели и задачи исследования. Диссертация посвящена разработке и совершенствованию методов синтеза дейтерированных полиненасыщенных жирных кислот, их производных и конъюгатов с олигонуклеотидами для изучения эффекта стабилизации бис-аллильных положений атомами дейтерия. Цель работы – получить дейтерированные по бис-аллильным положениям жирные кислоты, а также их производные: амиды и эфиры с полярной функциональной частью, фосфолипиды и конъюгаты с олигонуклеотидами.

В соответствии с поставленной целью выполнение работы состояло в решении следующих задач:

1) разработать методы синтеза линолевой, линоленовой, арахидоновой и эйкозапентаеновой кислот, избирательно дейтерированных по бис-аллильным положениям;

2) оптимизировать методы синтеза амидов и эфиров 11,11-D₂-линолевой кислоты с полярной функциональной частью;

3) оптимизировать методы синтеза фосфатидилхолинов, содержащих в положении 2 дейтерированные жирные кислоты, для моделирования и изучения окислительных процессов и стабилизирующего эффекта в липосомах;

4) разработать реагенты для введения азидной группы в олигонуклеотиды в условиях автоматического синтеза и предложить методы синтеза алкин-содержащих производных жирных кислот;

5) определить оптимальные условия синтеза конъюгатов олигонуклеотидов с производными полиненасыщенных жирных кислот по реакции азид-алкинового циклоприсоединения.

Объектом исследования являются дейтерированные полиненасыщенные жирные кислоты, их производные (амиды, эфиры, фосфолипиды) и конъюгаты с олигонуклеотидами.

Предметом исследования являются методы синтеза, выделения и очистки новых соединений и их спектральные свойства.

Научная новизна:

1. Усовершенствован линейный синтетический подход к синтезу полиненасыщенных жирных кислот, что позволило получить новые дейтерированные аналоги этих соединений с заданным положением атомов дейтерия.

2. Показано преимущество использования на стадии частичного гидрирования катализатора Ni-P2, в том числе с добавками различных солей, что позволяет минимизировать долю примесных продуктов избыточного гидрирования и изомеризации.

3. В синтезе D₈-эйкозапентаеновой кислоты применён более мягкий подход к сборке углеродного скелета, основанный на реакциях медных ацетиленидов.

4. Предложены эффективные методы синтеза амидов и сложных эфиров D₂-линолевой кислоты, позволяющие получать производные без нарушения стереохимии хиральных центров.

5. Получены неизвестные ранее фосфолипиды, содержащие остаток дейтерированной жирной кислоты. Показано отсутствие миграции ацильного фрагмента в условиях реакции.

6. Впервые показана принципиальная возможность существования азидной и амидофосфитной группы в одной молекуле, а также продемонстрирована достаточная устойчивость азидсодержащего амидофосфита для его использования в автоматическом синтезе олигонуклеотидов.

7. Впервые предложены методы получения конъюгатов олигонуклеотидов и жирных кислот при помощи реакции азид-алкинового циклоприсоединения.

Положения, выносимые на защиту:

1. Масштабированные методы синтеза дейтерированных по бис-аллильным положениям линолевой и линоленовой кислот, включающие стадию высокоселективного гидрирования на катализаторе Ni-P2.

2. Синтез ряда новых арахидоновых кислот с различным положением атомов дейтерия в бис-аллильных положениях, основанный на итеративном использовании для построения углеродного скелета пропаргилового и дейтеро-пропаргилового спиртов.

3. Новый метод синтеза дейтерированной эйкозапентаеновой кислоты, применимый для получения её D₂-D₈-аналогов, основанный на мягких реакциях ацетиленидов меди с бромидами пропаргильного типа и позволяющий исключить хроматографическую очистку промежуточных продуктов.

4. Синтез новых амидов и сложных эфиров D₂-линолевой кислоты через хлорангидрид, генерируемый в присутствии оксалилхлорида, что позволяет избежать изомеризации кратных связей в кислотной части и стереоцентров в амидной части.

5. Синтез фосфатидилхолинов с дейтерированными жирными кислотами в положении *sn*-2, основанный на конденсации в присутствии дициклогексилкарбодиимида и исключаяющий миграцию ацильных остатков.

6. Синтез азидсодержащего амидофосфитного реагента, ключевой стадией которого является фосфитилирование азидсодержащего спирта.

7. Новый подход к получению конъюгатов ДНК и РНК с жирными кислотами, основанный на реакции азид-алкинового циклоприсоединения.

Личный вклад соискателя состоит в выполнении экспериментальной части работы, разработке методик, установлении и доказательстве структуры синтезированных соединений, анализе литературных данных и результатов физико-химических и биологических испытаний. Планирование работы, обсуждение и оформление результатов для публикации в виде статей проводилось совместно

с научным руководителем к.х.н. В. В. Шманаем. Анализ двумерных спектров ЯМР проводился совместно с д.х.н. А. В. Барановским (Институт биоорганической химии НАН Беларуси). Анализ масс-спектров осуществлялся совместно с д.х.н. В. А. Коршуном (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, РАН), д-ром К. Вайзе (Свободный университет Берлина, Германия), д-ром Дж. Т. Бренной (Корнелльский университет, США).

Планирование и анализ результатов физико-химических исследований кинетического изотопного эффекта выполнены совместно с д.х.н. Е. М. Плиссом и сотр. (Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова). Эксперименты по ферментативному превращению дейтерированных арахидоновых кислот выполнены научными коллективами Московского государственного университета, Всероссийского НИИ оптико-физических измерений и Российского университета дружбы народов. Биологические испытания в липидных бислоях и на клетках выполнены коллективами Московского государственного университета (РФ), Калифорнийского университета (США), Университета Вандербильта (США), Колумбийского университета (США) и Нью-Йоркского университета (США).

Апробация результатов диссертации. Материалы диссертационной работы представлены на XXI Международной конференции «International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids» (Познань, 2014); Междисциплинарном симпозиуме по медицинской, органической и биологической химии 2014 (Новый свет, 2014); X Международной научной конференции «Молодёжь в науке» (Минск, 2015); Международной конференции «Biomembranes» (Долгопрудный, 2018); III Международной научной конференции «Свободные радикалы в химии и жизни» (Минск, 2019).

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 10 статьях в рецензируемых научных журналах общим объёмом 11,5 авторского листа, тезисах 5 докладов и описании патента на изобретение.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, общей характеристики работы, трёх глав, заключения, списка использованных источников и приложения. Полный текст диссертации составляет 149 стр., в том числе 82 рисунка на 57 стр., 6 таблиц на 5 стр.; 4 приложения на 4 стр. Список использованных источников состоит из библиографического списка, который включает 200 наименований на 17 стр., и списка публикаций соискателя ученой степени (16 наименований на 3 стр.).

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Глава 1. Подходы к синтезу дейтерированных полиненасыщенных жирных кислот (обзор литературы)

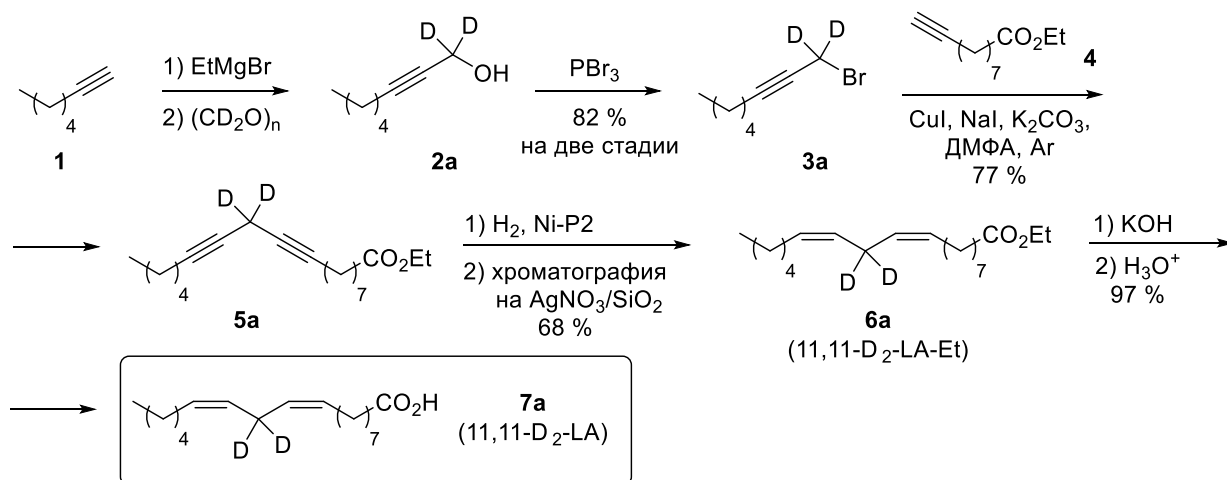
Обобщены литературные данные, касающиеся синтеза полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) с использованием полиацетиленового подхода и реакции Виттига, методов введения атомов дейтерия в эти соединения, а также кинетики окисления жирных кислот в процессах перекисного окисления.

Глава 2. Синтез дейтерированных полиненасыщенных жирных кислот, их производных и конъюгатов (результаты и обсуждение)

2.1. Синтез дейтерированных линолевых и линоленовых кислот

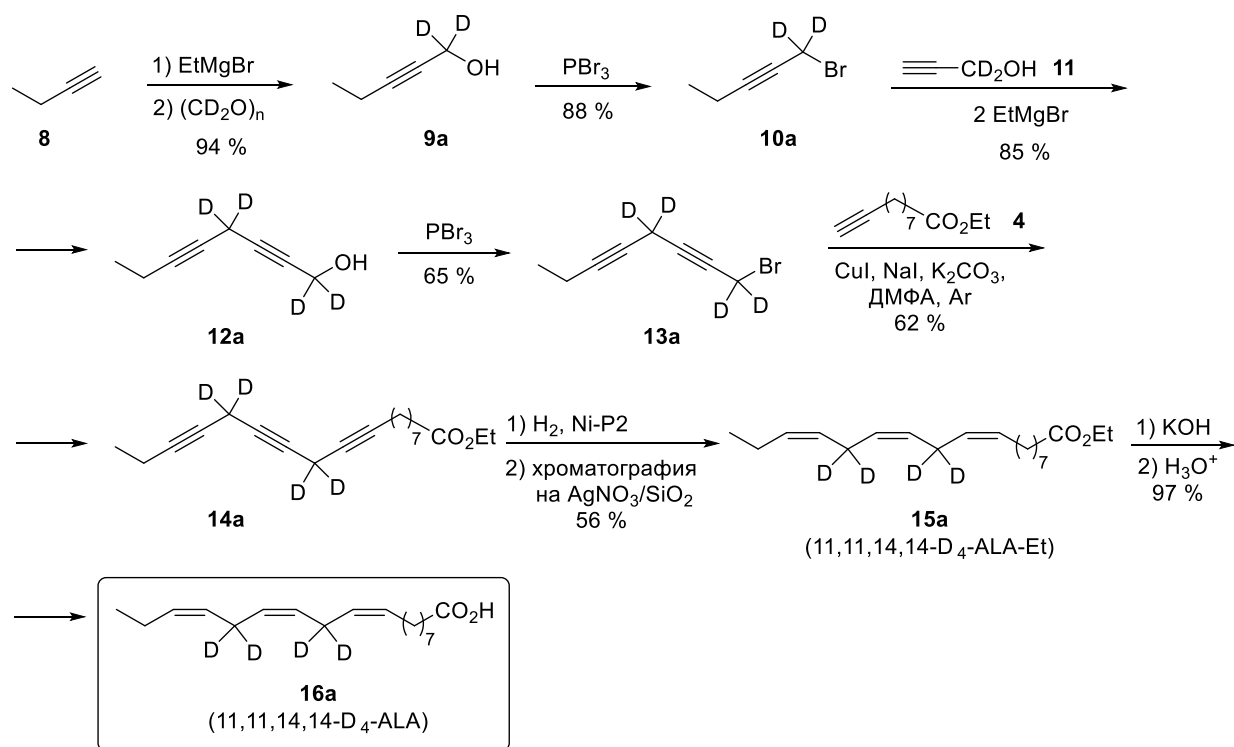
Простейшей ПНЖК является линолевая кислота (LA). Для синтеза 11,11-D₂-LA (**7a**) был использован подход, основанный на частичном гидрировании полиацетиленового предшественника. Алифатический и карбоксильный фрагменты кислоты создавались из гептина (**1**) и этил-9-дециноата (**4**), а источником дейтерия служил дейтеропараформ (CD₂O)_n.

Оптимизация на отдельных стадиях позволила масштабировать синтез до 40 г продукта. Выход на стадии получения бромида **3a** был увеличен в 4 раза. При сочетании **3a** и **4** количество CuI было уменьшено в два раза, а также подобран простой способ обработки, позволяющий удобно удалять неорганические соли фильтрованием. Использование катализатора Ni-P2 вместо предложенного ранее катализатора Линдлара позволило достичь чистоты соединения **6a** выше 95 % (ГЖХ). Выход **7a** с учётом очистки на сорбенте AgNO₃/SiO₂ составил 42 %. Структура подтверждена отсутствием сигнала бис-аллильных протонов при 2,76 м. д. (¹H ЯМР) и расщеплением сигнала бис-аллильного атома углерода при 25,2 м. д. (¹³C ЯМР).

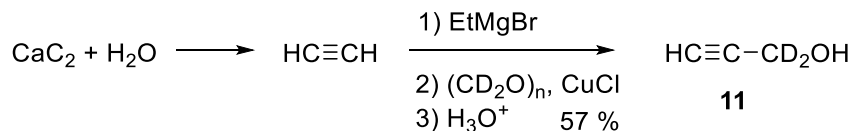


Найдено, что в растворе этиловый эфир 11,11-D₂-LA (**6a**) окисляется кислородом воздуха в 4,6 раза медленнее, чем этиловый эфир LA. Эти эфиры также подвергали окислению в присутствии высокой концентрации *трет*-бутилгидропероксида и кумилгидропероксида, что позволило определить константы скорости отрыва атомов водорода. В присутствии обоих инициаторов кинетический изотопный эффект (КИЭ; k_H / k_D) составил 3,0. При окислении в мицеллах значение КИЭ оказалось более высоким и составило 23,6.

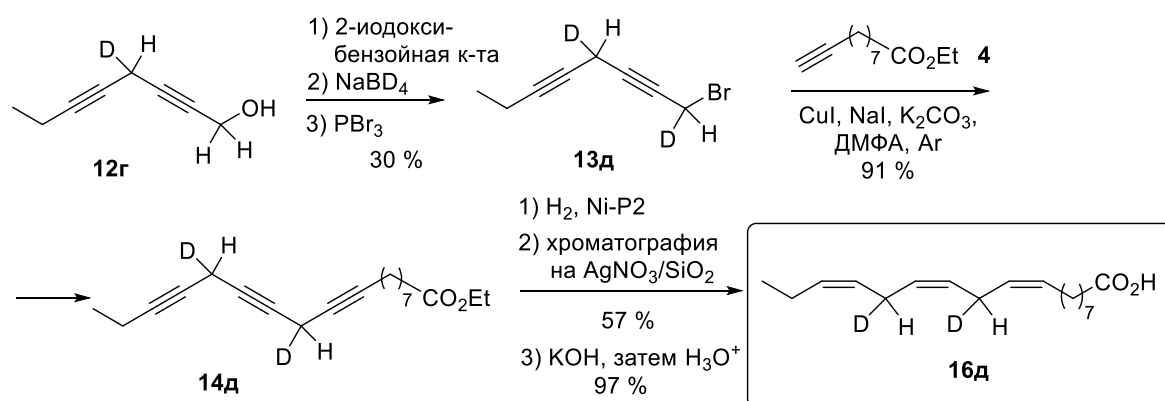
Похожим образом был осуществлён синтез аналога α-линоленовой кислоты (ALA) 11,11,14,14-D₄-ALA (**16a**), суммарный выход которого составил 15 %. В спектрах ¹H ЯМР отсутствовали сигналы, соответствующие протонам при атомах C-11 и C-14.



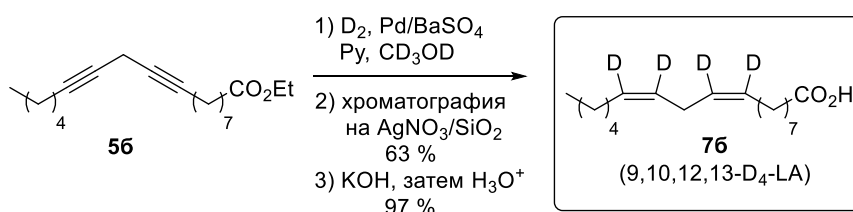
В синтезе ПНЖК с более чем двумя двойными связями использовался 1,1-D₂-пропаргиловый спирт (**11**). Разработана методика его получения *in situ* путём генерирования из ацетилена реактива Иочича с последующим добавлением к смеси (CD₂O)_n. Показана также возможность выделения **11** из реакционной смеси с небольшой примесью тетрагидрофурана (чистота 89 %).



Тем же методом были синтезированы кислоты 14,14-D₂-ALA (**16b**) и 11,11-D₂-ALA (**16в**). В этом случае на стадиях создания противеых бис-аллильных положений использовали обычный параформ и пропаргиловый спирт. Выход продуктов составил 12-15 %.



Также была синтезирована кислота 9,10,12,14-D₄-LA (**76**) с атомами дейтерия в винильных положениях. Дейтерирование двойных связей проводилось газообразным дейтерием на Pd, отравленном пиридином.

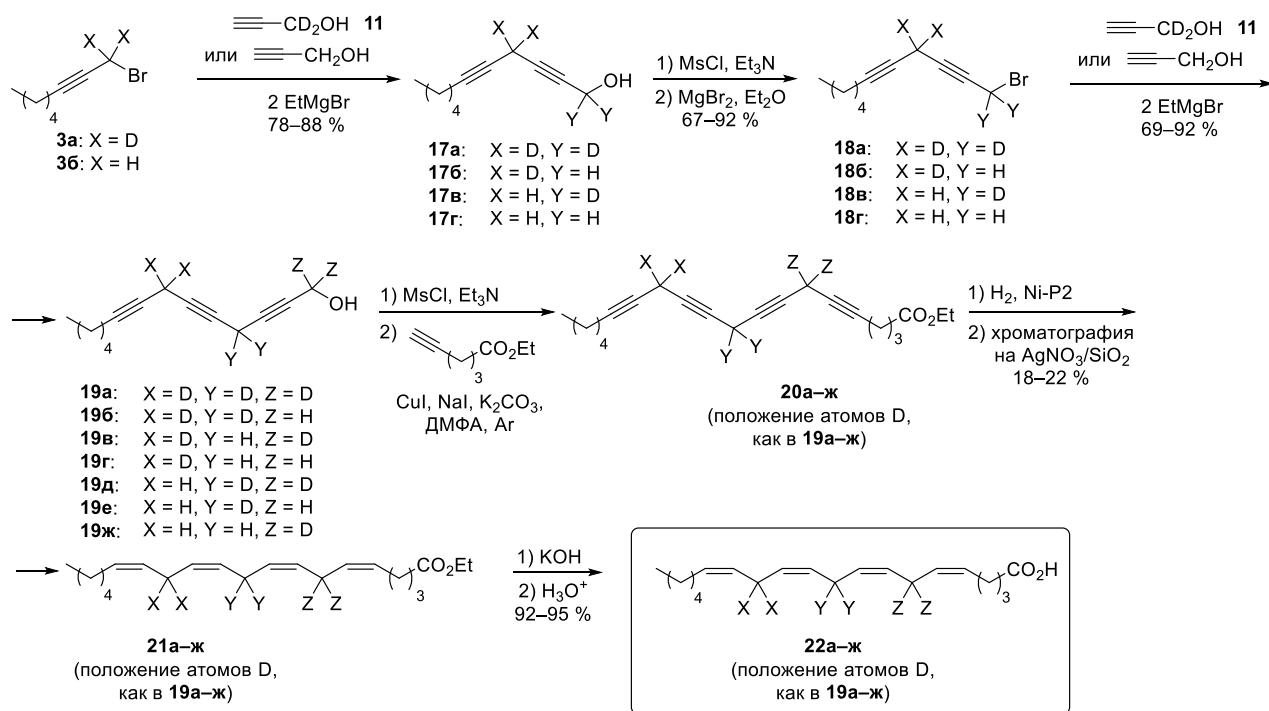


Соединения **6a-б** и **15a-д** были использованы для изучения окислительных процессов в клетках дрожжей *coq9Δ*, дефицитных по коферменту Q, который в норме обеспечивает их антиоксидантную защиту. Обработка дрожжей 200 мкМ ALA приводила к практически полной их гибели. Обработка дейтерированными аналогами приводила к проявлению защитного эффекта, который примерно коррелирует с числом C–D-связей, хотя и не зависит от положения атомов дейтерия. Показано, что добавка 20 мол. % дейтерированных ПНЖК ингибирует процессы образования изопростанов из арахидоновой кислоты.

2.2. Синтез и анализ арахидоновых кислот, дейтерированных по бис-аллильным положениям

Арахидоновая кислота (AA) интересна с точки зрения разнообразных превращений в ферментативных и неферментативных условиях. Для изучения возможности регулирования этих процессов был синтезирован ряд AA с различными комбинациями атомов протия и дейтерия в бис-аллильных положениях.

На стадиях удлинения скелета применяли либо пропаргиловый спирт, либо предварительно выделенный 1,1-D₂-пропаргиловый спирт (**11**), генерируя из них дианионы под действием EtMgBr. Для превращения спиртов **17** в бромиды **18** воспользовались мягкой методикой с получением мезитатов, которые далее вводили в реакцию с MgBr₂ в эфире. Триинолы **19** хорошо кристаллизовались из гексана, что позволило исключить стадию хроматографии. Очистка на сорбенте AgNO₃/SiO₂ приводила к эфирам **21** с чистотой 94-95 %.



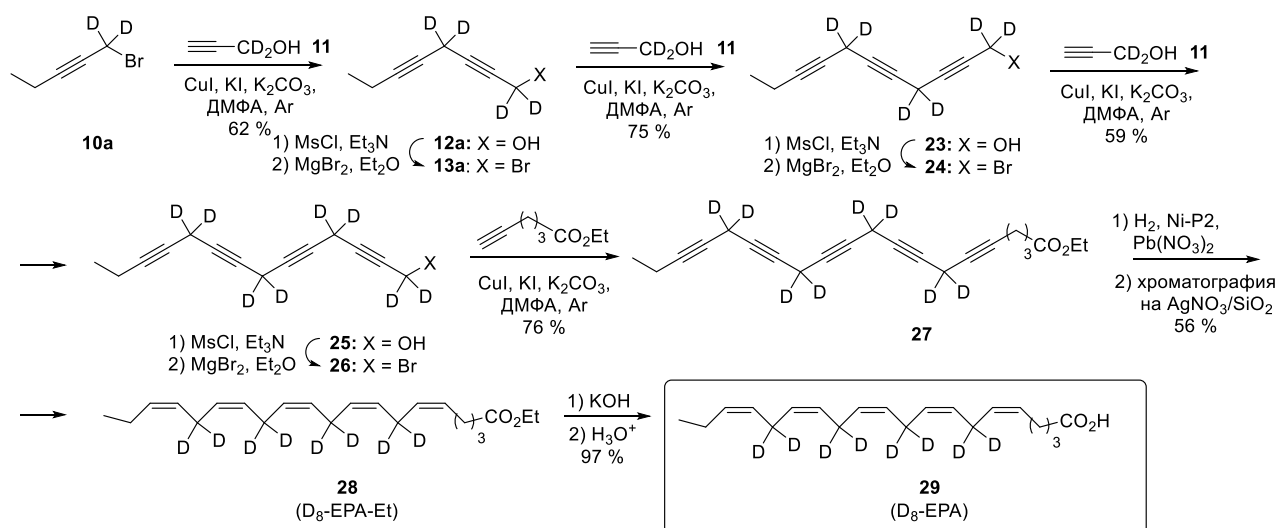
Спектроскопия ^{13}C ЯМР при частоте 800 МГц с криодатчиком TCI позволила разрешить сигналы бис-аллильных C-атомов при 25,8 м.д. и подтвердить положение дейтерия в эфирах **21**. Также оно было подтверждено с использованием метода газовой хроматографии – масс-спектрометрии с химической ионизацией и образованием ковалентного аддукта (GC-CACI-MS/MS).

Полученный ряд дейтерированных АА позволил исследовать взаимодействие различных изотопных аналогов с ферментами, в том числе циклооксигеназой ЦОГ-2, липоксигеназой 15-ЛОГ-2 и 5-липоксигеназой 5-ЛОГ. Его применили также для изучения механизма ферроптоза – процесса гибели клеток, вызванного повреждением системы восстановления липидных пероксидов.

2.3. Синтез D_8 -эйкозапентаеновой кислоты

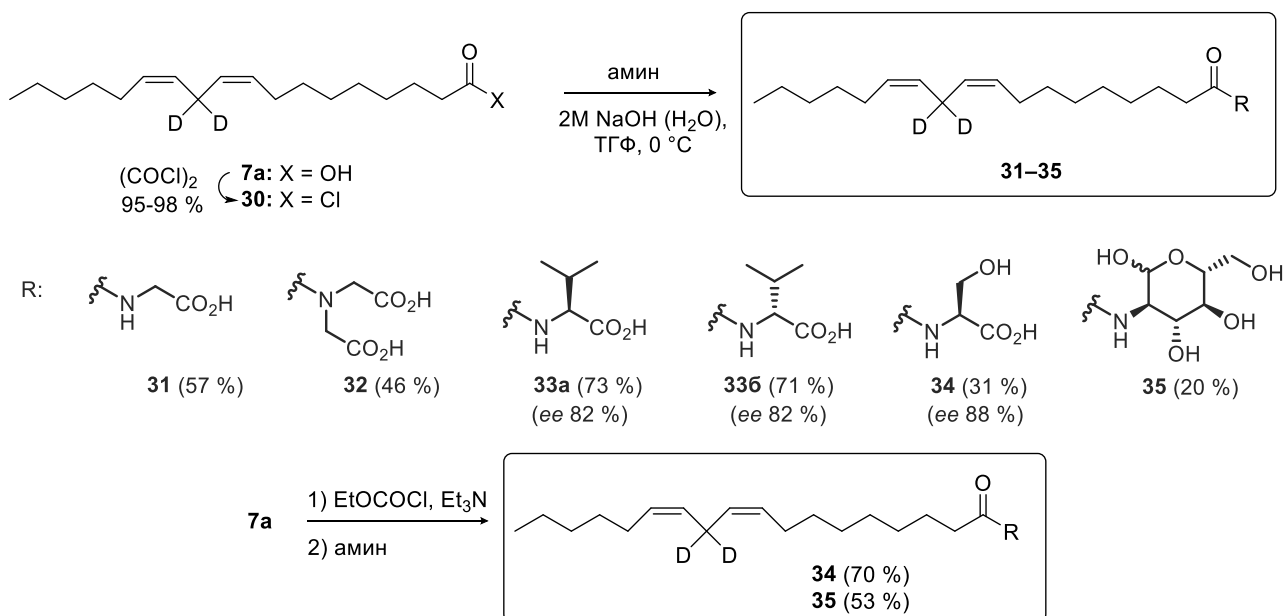
Для синтеза D_8 -эйкозапентаеновой кислоты (D_8 -ЕРА, **29**) была оптимизирована реакция гидрирования полииновых эфиров. Добавка солей свинца к катализатору позволила повысить чистоту продукта с 87 до 92 %. При понижении температуры до $-10\text{ }^\circ\text{C}$ также наблюдалось увеличение селективности.

Удлинение углеродного скелета с использованием дианионов пропаргильного спирта было заменено на более мягкое сочетание ацетиленидов меди с бромиды пропаргильного типа. Оптимизация позволила уменьшить количество используемого CuI до пропорции ниже эквивалента, что облегчило обработку смесей. Спирты в бромиды превращали без выделения мезилатов с выходом до 96 %. Спирты **23** и **25** очищали перекристаллизацией из петролейного эфира, что позволило избежать трудоёмкой очистки. Чистота эфира **28** составила 98 % (ГЖХ).

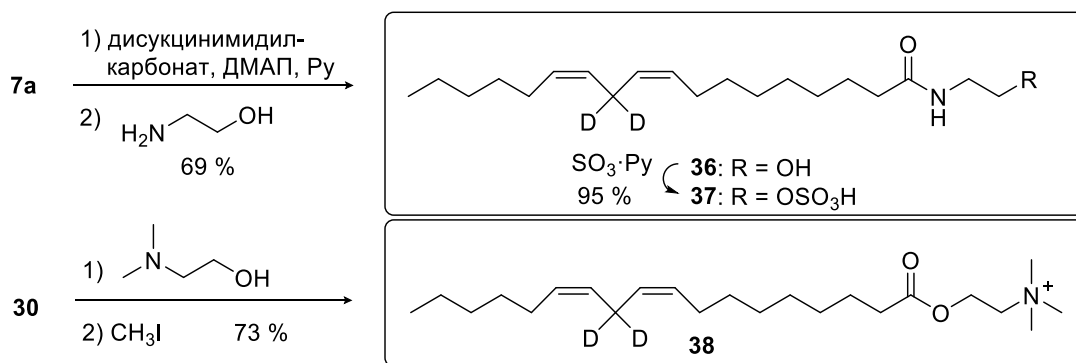


2.4. Синтез гидрофильных производных и фосфолипидов

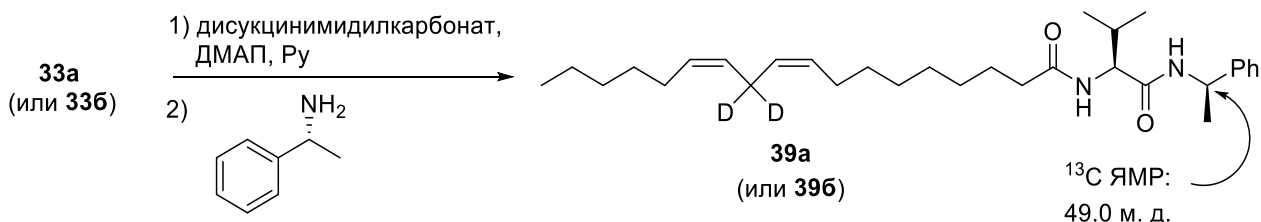
В данной части работы описан синтез ряда производных 11,11-D₂-LA, которые могут служить гидрофильной пролекарственной формой дейтерированной жирной кислоты. Обработка кислоты **7a** оксалилхлоридом приводила к хлорангидриду **30** (обработка хлористым тионилем вызывала изомеризацию диеновой системы), который вводили в реакцию с различными аминами и аминокислотами в системе ТГФ/вода, получая производные **31–35**. Для соединений **34** и **35** более оптимальным оказался метод смешанных ангидридов, позволивший повысить их выход до 70 и 53 % соответственно.



Сульфопроизводное **37** получали, обрабатывая кислоту **7a** дисукцинимидилкарбонатом, а затем 2-аминоэтанолом. Полученный амид **36** вводили в реакцию с комплексом SO₃·Py, что давало **37**. Производное **38** было затруднительно получать прямым ацилированием, поэтому был получен амид с *N,N*-диметил-2-аминоэтанолом, который затем метилировали, получая соединение **38**.

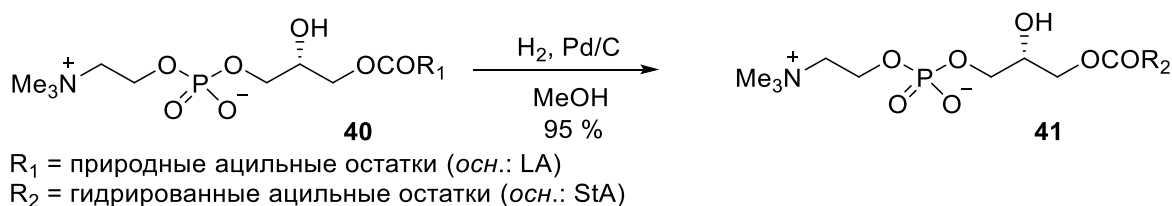


Энантиомерный избыток (*ee*) амидов **33a** и **33b** определяли методом ЯМР. Амиды конденсировали с (*R*)- α -фенилэтиламином и сравнивали ^{13}C ЯМР-спектры продуктов **39a** и **39b** со спектром их смеси. В спектре смеси **39a** и **39b** имеется два сигнала в области 49,0 м. д., а в спектрах индивидуальных соединений присутствует лишь один сигнал и остаточные количества второго. Соотношение их интенсивностей в обоих случаях составило 91:9, что соответствует соотношению энантиомеров **33a** и **33b**.

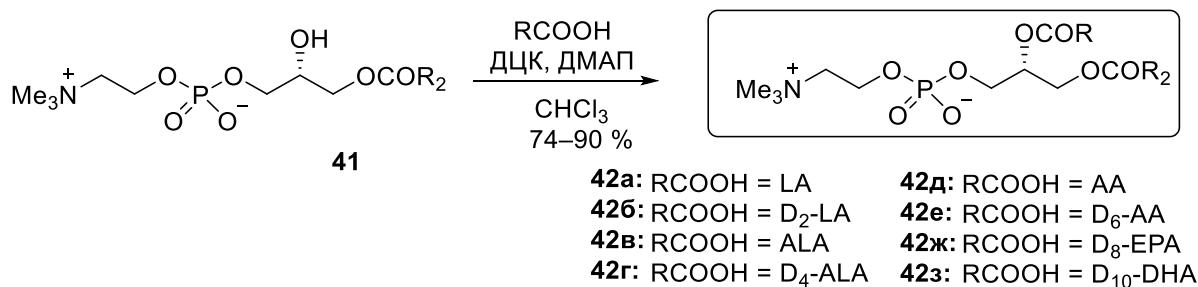


Для определения *ee* амида **34** оказалось достаточным добавить (*R*)- α -фенилэтиламин к раствору **34**. В области 1,48 м. д. ^1H ЯМР спектра наблюдалось два дублета, соответствующих метильной группе (*R*)- α -фенилэтиламина в составе диастереомерных солей. Соотношение интенсивностей составило 94:6, что для соединения **34** даёт *ee*, равный 88 %. Следовательно, конфигурация стереоцентров в аминокислотных остатках сохраняется, а энантиомерная чистота зависит от энантиомерной чистоты исходных аминокислот.

Далее был осуществлен синтез ряда дейтерированных фосфатидилхолинов. Лизофосфатидилхолин из сои (**40**) гидрировали на Pd, получая лизофосфатидилхолин **41**, содержащий в положении *sn*-1 преимущественно остаток стеариновой кислоты.



Целевые фосфатидилхолины **42** получали конденсацией лизофосфатидилхолина **41** со свободными природными или дейтерированными жирными кислотами в присутствии дициклогексилкарбодиимида в абсолютном хлороформе. Очистка производилась хроматографически в смесях метанола и хлороформа.



Фосфолипидный состав оценивался по интенсивности сигналов в спектрах ³¹P ЯМР около 0 м. д. Во всех случаях содержание диацильного компонента составляло более 90 %. Было проверено предположение о миграции остатка стеариновой кислоты в **41** в условиях реакции. Выдерживание лизофосфолипида **41** в присутствии ДМАП, но в отсутствие карбоновой кислоты и ДЦК не привело к миграции ацильного остатка.

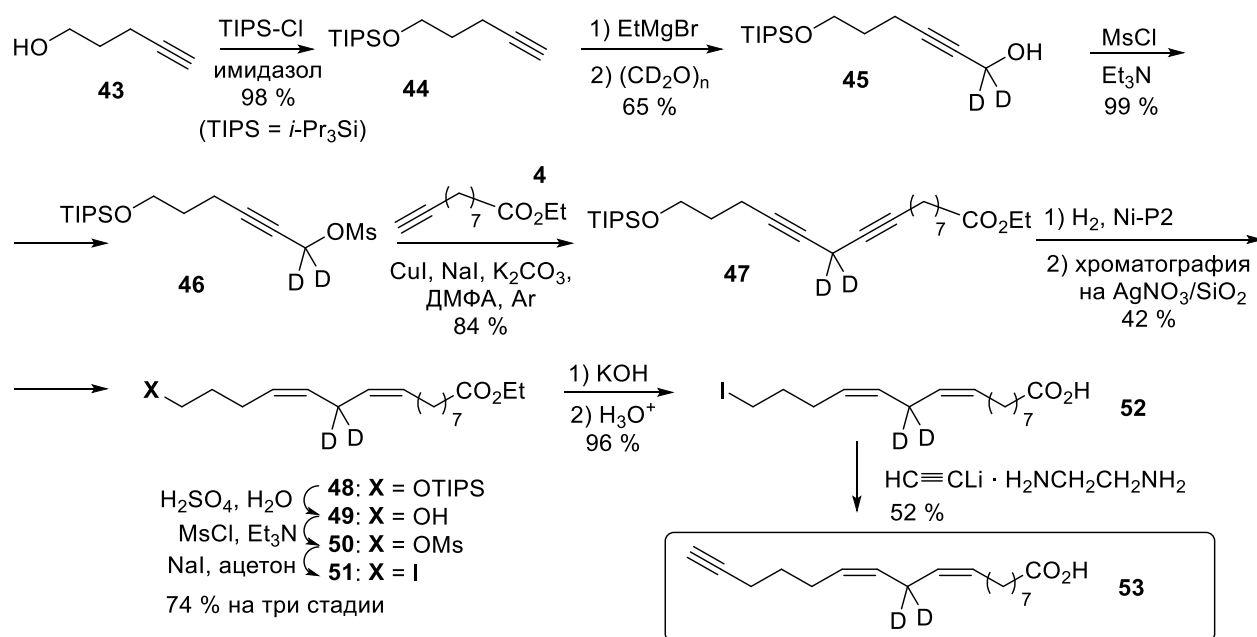
Полученные фосфолипиды были использованы для создания липосом и проверки их устойчивости к окислительному стрессу, вызванному системой Fe²⁺/аскорбат.

2.5. Синтез конъюгатов дейтерированных жирных кислот с олигонуклеотидами

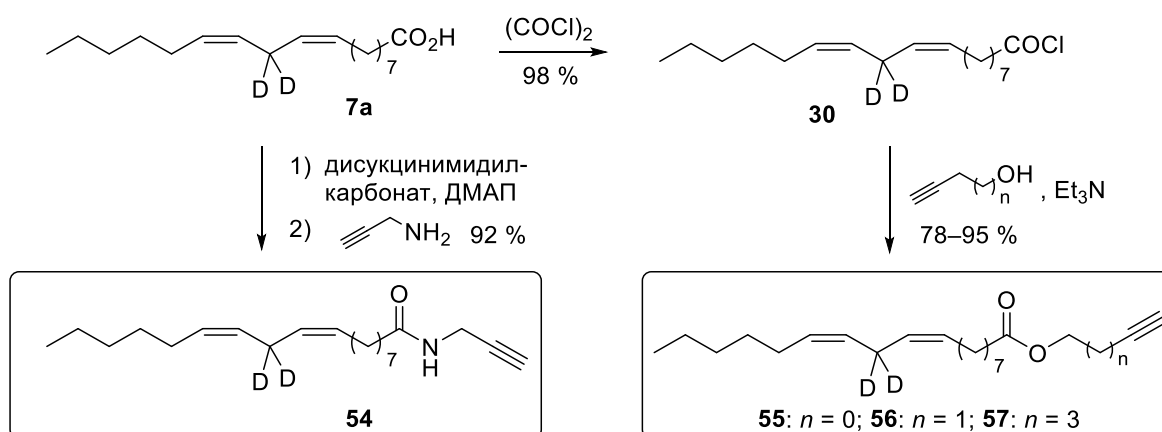
Конъюгаты олигонуклеотидов с липидами представляют интерес как средства доставки олигонуклеотидов к биологическим мишеням. С целью их синтеза были разработаны методы получения: 1) жирных кислот с алкиновой группой; 2) олигонуклеотидов с азидной группой. Конъюгирование этих компонентов затем проводилось по реакции азид-алкинового циклоприсоединения (CuAAC).

В качестве липидного компонента была использована 11,11-D₂-LA (**7a**). Введение тройной связи в это соединение осуществлялось: а) между атомами C17 и C18; б) через карбоксильную группу путём образования амида; в) через карбоксильную группу путём образования сложного эфира. Различное расположение тройной связи потенциально может обеспечивать устойчивость или, наоборот, расщепляемость целевого конъюгата в биологических средах.

Производное **53** было синтезировано с использованием полиацетиленового подхода из пентин-4-ола-1 (**43**). Гидроксильная группа, защищённая триизопропилсилильной группой, выступала в качестве места введения терминальной алкиновой группы на последней стадии. Синтез проводился так, как описано для 11,11-D₂-LA, вплоть до гидрирования диенового эфира **47** и очистки диенового эфира **48**. Затем защищённую OH-группу превращали в иодид, который после гидролиза сложноэфирной группы замещали ацетиленидом лития. Примечательно, что подобное замещение на сложном эфире **51** протекало с большим трудом.



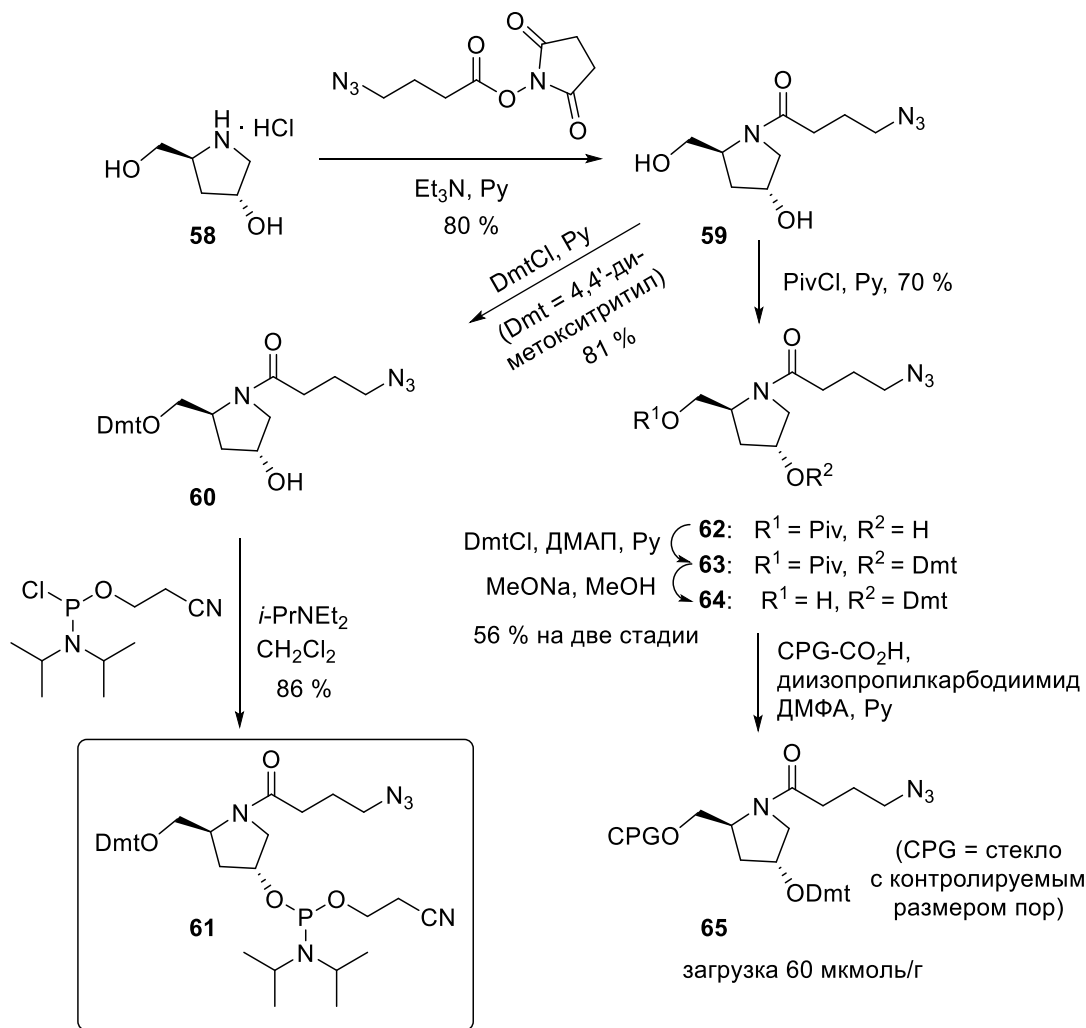
N-Пропаргиламид **54** был получен активацией кислоты дисукцинимидил-карбонатом и последующей обработкой пропаргиламином. Сложные эфиры (пропаргиловый, гомопропаргиловый и гексин-5-иловый) были получены введением хлорангидрида **30** в реакцию с соответствующими спиртами.



Затем была решена задача удобного получения азидсодержащих олигонуклеотидов. Известны методы, позволяющие сделать это постсинтетически, но ранее считалось, что ввести азидную группу в олигонуклеотид в ходе автоматического синтеза невозможно. Это связано с тем, что стандартные реагенты, используемые в автоматическом синтезе, создают фосфодиэфирную связь за счёт наличия в них реакционноспособной амидофосфитной группы (RO)₂PNR'₂, не совместимой с азидной группой.

Тем не менее синтез такого реагента был реализован. (3*R*,5*S*)-5-Гидроксиметил-3-гидрокси-2-пирролидин (58) ацилировали сукцинимидным эфиром 4-азидомасляной кислоты. Соединение **59** затем защищали 4,4'-диметокситритильной группой. Выделенный хроматографически предшественник **60** фосфитилировали по вторичной гидроксильной группе, что давало амидофосфит **61**.

Получение амидофосфита **61** было подтверждено путём анализа спектров ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC, NOESY и ^{31}P ЯМР сразу после синтеза. Чистота **61** была определена по спектру ^{31}P ЯМР и составила 94 %. Вещество удалось сохранить в течение 50 недель при $-20\text{ }^\circ\text{C}$ в растворе, однако оно практически полностью разлагалось в течение 1 недели хранения при $20\text{ }^\circ\text{C}$ (остаточное содержание 18 % по ^{31}P ЯМР). Попытки упаривания или лиофилизации для получения **61** в чистом виде приводили к его полному разложению (8 %).

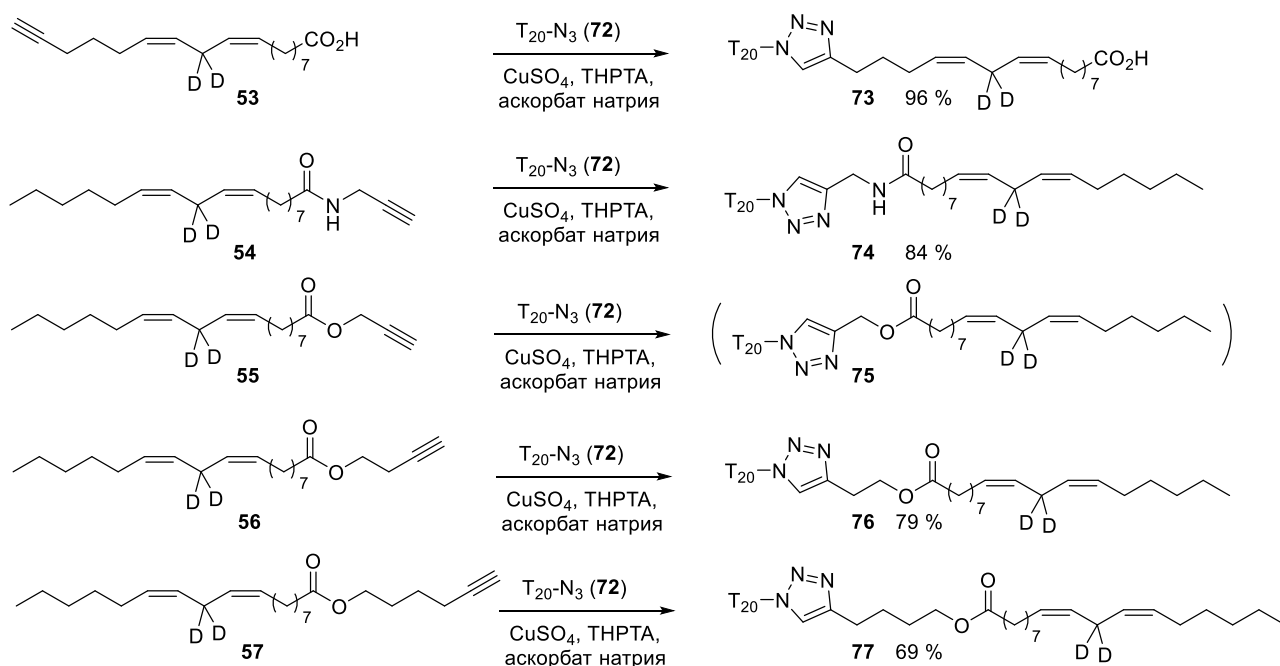


Непосредственно после синтеза или после хранения при низкой температуре амидофосфит **61** был пригоден для получения азидсодержащих олигонуклеотидов в автоматическом синтезаторе. Это было продемонстрировано синтезом ряда олигонуклеотидов (таблица 1) с одной азидной группой (**66**), с тремя азидными группами в конце цепи (**67**), с тремя азидными группами в середине цепи (**70**). Олигонуклеотиды **66** и **67** вступали в реакцию CuAAC с алкинсодержащими красителями (FAM, Cy5), образуя продукты **68** и **69**, что доказывало наличие в них азидных групп и их способность вступать в реакции CuAAC. Олигонуклеотид **70** вводили в реакцию с другим, алкинсодержащим олигонуклеотидом, получая олигонуклеотид **71** с тремя точками ветвления.

Таблица 1 – Структуры синтезированных олигонуклеотидов

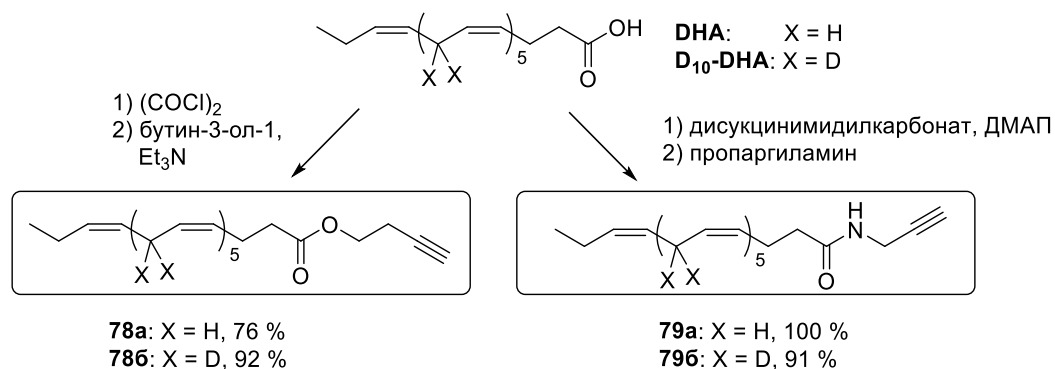
№	Структура, 5'→3'	MALDI, [M+H] ⁺ , найденно / расщ.
66	X-CACGACGTTGTAAAACGAC	6093/6094
67	X-X-X-CACGACGTTGTAAAACGAC	6673/6678
68	Cy5 ^x -CACGACGTTGTAAAACGAC	6613/6619
69	FAM ^x -FAM ^x -FAM ^x -CACGACGTTGTAAAACGAC	7912/7923
70	FAM-CACGA-X-CATTG-X-TAAAA-X-CCACC	7441/7447
71	FAM-CACGA-(T ₁₀) ^x -CATTG-(T ₁₀) ^x -TAAAA-(T ₁₀) ^x -CCACC	17190/17393

Для реакций с алкинсодержащими липидами **53–57** был синтезирован олигонуклеотид T₂₀-N₃ (**72**). Его реакция с двукратным избытком алкина **53** в смеси ДМСО/вода в присутствии Cu⁺ в течение 16 ч давала конъюгат **73**, который осаждали ацетоном, анализировали и очищали методом ВЭЖХ. Выход в оптимальных условиях составил 96 %. В аналогичных условиях в реакции с пропаргил-амидом **54** был получен конъюгат **74** с выходом 84 %. Однако пропаргил-эфир **55** в тех же условиях вместо ожидаемого конъюгата **75** дал неразделимую смесь, сложную для анализа. Эфиры **56** и **57**, наоборот, дали целевые конъюгаты **76** и **77**, хотя их выход был ниже (79 и 69 %).

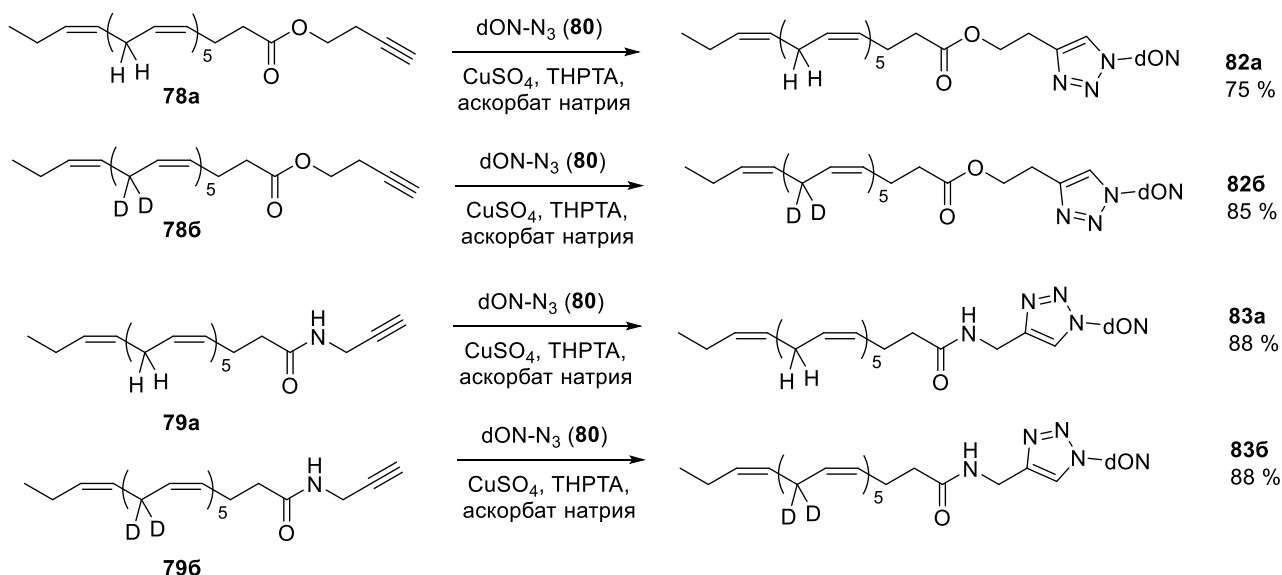


Из конъюгатов ПНЖК и олигонуклеотидов интерес представляют соединения, содержащие докозагексаеновую кислоту (ДНА) и фрагмент РНК. Оба этих компонента в зависимости от целей перспективны и как биологически активная составляющая, и как транспорт. ДНА также можно использовать в виде дейтерированного аналога, что повышает её устойчивость к окислению в биологической среде.

Кислоты DHA и D₁₀-DHA были превращены в бутиниловые эфиры **78a** и **78b** и пропаргиламиды **79a** и **79b**, которые конъюгировали с олигодезоксирибонуклеотидом **80** d(CTGGCTGTCACTGAGAACG)-N₃ и олигорибонуклеотидом **81** CUGGCUGUCACUGAGAACGTT-N₃.



В присутствии 10 эквивалентов алкина олигодезоксирибонуклеотид **80** без проблем превращался в соответствующий конъюгат с DHA или D₁₀-DHA (выход 75–88 %).



При конъюгировании олигорибонуклеотида **81** в аналогичных условиях пропаргиламиды вступали в конъюгацию эффективно (60–82 %), но бутиниловые эфиры дали низкие выходы (6–22 %). Этот результат не удалось улучшить даже использованием 50 эквивалентов реагента. В случае же пропаргиламидов конверсия достаточна для того, чтобы продукты можно было выделить методом препаративной ВЭЖХ в чистом виде.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Разработаны препаративные методы синтеза избирательно дейтерированных линолевой и линоленовой кислот, включающие стадию высокоселек-

тивного гидрирования на катализаторе Ni-P2, которая позволила снизить долю примесей *транс*-продуктов и продуктов избыточного гидрирования по сравнению с ранее описанными катализаторами. Подбор более удобных условий обработки на стадии получения полиацетиленового предшественника позволил масштабировать синтез до десятков граммов продукта. Показана возможность формирования частично дейтерированных бис-аллильных положений при помощи последовательности стадий окисления и восстановления первичных спиртов [2-A, 4-A, 8-A].

2. Разработан препаративный метод синтеза арахидоновых кислот с различными комбинациями атомов дейтерия в бис-аллильных положениях, заключающийся в итеративном удлинении углеродного скелета при помощи пропаргилового и дейтеропропаргилового спиртов. Предложен удобный метод получения дейтеропропаргилового спирта присоединением ацетилена к дейтеропараформу, что позволило избежать его генерирования *in situ* [3-A, 6-A, 7-A].

3. Разработан новый метод синтеза эйкозапентаеновой кислоты, дейтерированной по всем бис-аллильным положениям, основанный на мягких реакциях ацетиленидов меди с бромидами пропаргильного типа. Показана возможность синтеза бромидов пропаргильного типа из соответствующих спиртов без выделения мезитатов. Перекристаллизация промежуточных спиртов позволила избежать стадий хроматографической очистки [10-A, 15-A].

4. Синтезирован ряд новых амидов и сложных эфиров 11,11-D₂-линолевой кислоты через промежуточное образование её хлорангидрида в условиях, позволивших сохранить стереохимическую конфигурацию кратных связей в кислотной части. Показано, что применённый метод синтеза не приводит к рацемизации хиральных аминокислот в амидной части [5-A, 13-A].

5. Синтезирован ряд новых фосфатидилхолинов, содержащих дейтерированные жирные кислоты в положении *sn*-2. Установлено, что карбодиимидный метод конденсации лизофосфатидилхолина и жирной кислоты не приводит миграции ацильного остатка стеариновой кислоты из положения *sn*-1 в положение *sn*-2 [10-A].

6. Впервые получен амидофосфитный реагент для введения азидной группы в олигонуклеотиды. Подобраны условия его хранения, исключаяющие внутримолекулярную реакцию Штаудингера между амидофосфитной и азидной группами и обеспечивающие сохранение этих групп в составе одной молекулы. Показана возможность применения реагента в автоматическом синтезе олигонуклеотидов [1-A].

7. Получен ряд амидов и эфиров 11,11-D₂-линолевой кислоты и D₁₀-докозагексаеновой кислоты, содержащих тройную связь. Разработан метод синтеза аналога линолевой кислоты с терминальной тройной связью, основанный на

полиацетиленовом подходе и использовании защищённой гидроксильной группы в качестве точки введения тройной связи на последней стадии [9-А, 12-А].

8. Предложен новый эффективный подход к синтезу конъюгатов ДНК и РНК с жирными кислотами, заключающийся в реакции азид-алкинового циклоприсоединения между азидсодержащими олигонуклеотидами и алкинсодержащими производными жирных кислот. Концентрации медного катализатора и лиганда, а также состав растворителей и время реакции были оптимизированы для получения максимального выхода конъюгата. Показано преимущество пропаргиламидов в качестве алкиновых компонентов [1-А, 9-А, 11-А, 12-А, 14-А].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Этиловый эфир 11,11-D₂-линолевой кислоты является перспективным лекарственным средством и проходит клинические испытания на пациентах с нейродегенеративными заболеваниями (Retrotape, США). Дальнейшая оптимизация его получения и очистки, а также разработка синтеза в промышленном масштабе представляется целесообразной (справка о возможном практическом использовании результатов исследования в биотехнологической отрасли промышленности от 24.08.2021).

2. Изотопные аналоги жирных кислот с избирательно дейтерированными бис-аллильными положениями являются удобными субстратами для дальнейшего исследования механизмов окисления липидов. При помощи разработанных в данной работе методов можно получить также другие аналоги жирных кислот.

3. Гидрофильные производные 11,11-D₂-линолевой кислоты являются пролекарственными соединениями и представляют интерес для изучения в терапии глазных и нейродегенеративных заболеваний. Предложенные методы могут быть использованы для получения других гидрофильных производных жирных кислот.

4. Амидофосфит и твердофазный носитель, содержащие азидную функцию, удобны в крупномасштабном синтезе азидсодержащих олигонуклеотидов. Впоследствии в такие олигонуклеотиды можно вводить различные метки по реакции азид-алкинового циклоприсоединения, что является более практичным и экономным подходом [16-А] (акт о практическом использовании результатов исследования в биотехнологической отрасли промышленности от 24.08.2021).

5. Конъюгаты олигонуклеотидов (ДНК и РНК) с жирными кислотами могут найти применение в биологических исследованиях, разработке систем доставки лекарственных средств и генной терапии.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в рецензируемых научных журналах:

1-A. **Fomich M. A.**, Kvach M. V., Navakouski M. J., Weise C., Baranovsky A. V., Korshun V. A., Shmanai V. V. Azide Phosphoramidite in Direct Synthesis of Azide-Modified Oligonucleotides // *Org. Lett.* – 2014. – Vol. 16, № 17. – P. 4590–4593.

2-A. Andreyev A. Y., Tsui H. S., Milne G. L., Shmanai V. V., Bekish A. V., **Fomich M. A.**, Pham M. N., Nong Y., Murphy A. N., Clarke C. F., Shchepinov M. S. Isotope-reinforced polyunsaturated fatty acids protect mitochondria from oxidative stress // *Free Radic. Biol. Med.* – 2015. – Vol. 82. – P. 63–72.

3-A. **Fomich M. A.**, Bekish A. V., Vidovic D., Lamberson C. R., Lysenko I. L., Lawrence P., Brenna J. T., Sharko O. L., Shmanai V. V., Shchepinov M. S. Full Library of (Bis-allyl)-deuterated Arachidonic Acids: Synthesis and Analytical Verification // *ChemistrySelect.* – 2016. – Vol. 1, № 15. – P. 4758–4764.

4-A. Тихонов И. В., Москаленко И. В., Плисс Е. М., **Фомич М. А.**, Бекиш А. В., Шманай В. В. Кинетический изотопный Н/Д-эффект в реакции окисления эфиров линолевой кислоты в растворах // *Химическая физика.* – 2017. – Т. 36, № 5. – С. 14–18.

5-A. **Фомич М. А.**, Шарко О. Л., Шманай В. В. Синтез гидрофильных производных 11,11-D₂-линолевой кислоты // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук.* – 2017, № 4. – С. 48–54.

6-A. Chistyakov D. V., Filimonov I. S., Azbukina N. V., Goriainov S. V., Chistyakov V. V., **Fomich M. A.**, Bekish A. V., Shmanai V. V., Sergeeva M. G., Shchepinov M. S. Deuterated Arachidonic Acids Library for Regulation of Inflammation and Controlled Synthesis of Eicosanoids: An In Vitro Study // *Molecules.* – 2018. – Vol. 23, № 12. – P. 3331–3341.

7-A. Gaschler M. M., Andia A. A., Liu H., Csuka J. M., Hurlocker B., Vaiana C. A., Heindel D. W., Zuckerman D. S., Bos P. H., Reznik E., Ye L. F., Tyurina Y. Y., Lin A. J., Shchepinov M. S., Chan A. Y., Peguero-Pereira E., **Fomich M. A.**, Daniels J. D., Bekish A. V., Shmanai V. V., Kagan V. E., Mahal L. K., Woerpel K. A., Stockwell B. R. FINO₂ initiates ferroptosis through GPX4 inactivation and iron oxidation // *Nat. Chem. Biol.* – 2018. – Vol. 14, № 5. – P. 507–515.

8-A. Москаленко И. В., Тихонов И. В., Плисс Е. М., **Фомич М. А.**, Шманай В. В., Русаков А. И. Кинетический изотопный эффект в реакции окисления эфиров линолевой кислоты в мицеллах // *Химическая физика.* – 2018. – Т. 37, № 11. – С. 25–30.

9-A. **Фомич М. А.**, Бекиш А. В., Шарко О. Л., Прохоревич К. Н., Шманай В. В. Синтез конъюгатов олигонуклеотидов с производными 11,11-D₂-линолевой кислоты по реакции азид-алкинового циклоприсоединения // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук.* – 2018. – Т. 54, № 1. – С. 46–57.

10-A. Firsov A. M., **Fomich M. A.**, Bekish A. V., Sharko O. L., Kotova E. A., Sal H. J., Vidovic D., Shmanai V. V., Pratt D. A., Antonenko Y. N., Shchepinov M. S. Threshold protective effect of deuterated polyunsaturated fatty acids on peroxidation of lipid bilayers // FEBS J. – 2019. – Vol. 286, № 11. – P. 2099–2117.

Тезисы докладов и материалы конференций:

11-A. **Fomich M. A.**, Kvach M. V., Shmanai V. V. Synthesis and Evaluation of New Azide Phosphoramidite Reagent // International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. – Poznan, 2014. – P. 203.

12-A. **Фомич М. А.**, Лысенко И. Л., Кузмитович Е. А., Бекиш А. В., Шманай В. В. Получение алкинового аналога дейтеролинолевой кислоты // Междисциплинарный симпозиум по медицинской, органической и биологической химии. – Новый Свет, 2014. – С. 90.

13-A. **Фомич М. А.** Синтез амидов и эфиров 11,11- d_2 -линолевой кислоты для доставки к задним отделам глаза // «Молодежь в науке – 2015»: материалы X Международной научной конференции. – Минск, 2015. – С. 353.

14-A. Sharko O. L., **Fomich M. A.**, Ulashchik E. A., Bekish A. V., Shchepinov M. S., Shmanai V. V. Deuterium-reinforced fatty acids for combined treatment of neurodegenerative diseases: application for gene therapy // Biomembranes 2018: J. Bioenerg. Biomembr. – 2018. – V. 50. – P. 115.

15-A. **Фомич М. А.**, Бекиш А. В., Шманай В. В. Синтез D₈-эйкозапентаеновой кислоты, усиленной в бис-аллильных положениях // Свободные радикалы в химии и жизни: тезисы докладов III Международной конференции. – Минск, 2019. – С. 80–81.

Патент на изобретение:

16-A. BY 21685 C1, 2014.



РЕЗЮМЕ

Фомич Максим Александрович

Синтез избирательно дейтерированных полиненасыщенных жирных кислот и их производных

Ключевые слова: полиненасыщенные жирные кислоты, линолевая кислота, линоленовая кислота, арахидоновая кислота, кинетический изотопный эффект, дейтерий, перекисное окисление, фосфолипиды, биоконъюгаты.

Цель работы: получить дейтерированные по бис-аллильным положениям жирные кислоты, а также их производные: амиды и эфиры с полярной функциональной частью, фосфолипиды и конъюгаты с олигонуклеотидами.

Объекты исследования: дейтерированные полиненасыщенные жирные кислоты, их различные производные (амиды, эфиры, фосфолипиды) и конъюгаты с олигонуклеотидами.

Предмет исследования: методы синтеза, выделения и очистки новых соединений и их спектральные свойства.

Методы исследования: современные методы препаративного органического синтеза, ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия высокого разрешения, ВЭЖХ, ГЖХ.

Полученные результаты и их новизна: разработаны новые подходы в синтезе полиненасыщенных жирных кислот, содержащих атомы дейтерия в бис-аллильных положениях, впервые получен ряд их гидрофильных производных и конъюгатов; предложен новый подход к синтезу конъюгатов ДНК и РНК с жирными кислотами, основанный на реакции азид-алкинового циклоприсоединения между азидсодержащими олигонуклеотидами и алкинсодержащими жирными кислотами.

Рекомендации по использованию: представители синтезированных соединений могут быть использованы в создании лекарственных средств и их пролекарственных форм для лечения нейродегенеративных и глазных заболеваний, в дизайне средств доставки и генной терапии; предложенные реагенты для введения азидной группы могут найти применение в производстве меченых олигонуклеотидов.

Область применения: органическая и биоорганическая химия, биоконъюгация нуклеиновых кислот, молекулярная биология, медицина.

SUMMARY

Fomich Maksim Aleksandrovich

Synthesis of selectively deuterated polyunsaturated fatty acids and their derivatives

Keywords: polyunsaturated fatty acids, linoleic acid, linolenic acid, arachidonic acid, kinetic isotope effect, deuterium, lipid peroxidation, phospholipids, bioconjugates.

Objective of research: synthesis of deuterium-reinforced fatty acids, their derivatives, such as amides and esters with the polar functionality, phospholipids, and conjugates with oligonucleotides.

Object of research: deuterated polyunsaturated fatty acids, their derivatives (amides, esters, phospholipids) and nucleic acid conjugates.

Subject of research: synthesis, isolation and purification of the new compounds and their spectral properties.

Research methods: modern techniques of preparative organic synthesis, NMR spectroscopy, high-resolution mass-spectrometry, HPLC, GCMS.

Obtained results and their novelty: methods of the synthesis of the polyunsaturated fatty acids containing deuterium atoms in the bis-allyl sites are developed. The range of their hydrophilic derivatives and conjugates is obtained. A new approach to the synthesis of DNA and RNA–fatty acid conjugates proposed, which is based on the azide-alkyne cycloaddition reaction between azide oligonucleotides and alkyne fatty acids.

Application guidelines: representatives of the synthesized compounds can be used in the development of medicinal drugs and their prodrug forms for the treatment of neurodegenerative and ocular diseases, in the design of delivery and gene therapy systems; proposed reagents for introducing an azide group can find application in the production of labeled oligonucleotides.

Fields of application: organic and bioorganic chemistry, nucleic acid bioconjugation, molecular biology, medicine.

РЭЗІЮМЭ

Фоміч Максім Аляксандравіч

Сінтэз выбіральных дэйтэраваных поліненасычаных тлустых кіслот і іх вытворных

Ключавыя словы: поліненасычаныя тлустыя кіслоты, ліналевая кіслата, ліналенавая кіслата, арахідонавая кіслата, кінетычны ізатопны эффект, дэйтэры, перакіснае акісленне, фосфаліпіды, біякан'югаты.

Мэта працы: атрымаць дэйтэраваныя ў біс-алільных палажэннях тлустыя кіслоты, а таксама іх вытворныя: аміды і эфіры з палярнай функцыянальнай групай, фосфаліпіды і кан'югаты з алігануклеатыдамі.

Аб'екты даследавання: дэйтэраваныя поліненасычаныя тлустыя кіслоты, іх вытворныя (аміды, эфіры, фосфаліпіды) і кан'югаты з алігануклеатыдамі.

Прадмет даследавання: метады сінтэзу, выдзялення і ачысткі новых злучэнняў і іх спектральныя ўласцівасці.

Метады даследавання: сучасныя метады прэпаратыўнага арганічнага сінтэзу, ЯМР-спектраскапія, мас-спектраметрыя высокай разрознасці, высока-эфектыўная вадкасная хроматаграфія, газа-вадкасная хроматаграфія.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: распрацаваны метады сінтэзу поліненасычаных тлустых кіслот, якія ўтрымліваюць атамы дэйтэрыю ў біс-алільных палажэннях, атрыманы іх гідрафільныя вытворныя і кан'югаты; прапанаваны новы падыход да сінтэзу кан'югатаў ДНК і РНК з тлустымі кіслотамі, заснаваны на рэакцыі азід-алкінавага цыкладалучэння паміж алігануклеатыдамі, што ўтрымліваюць азідную групу, і тлустымі кіслотамі, што ўтрымліваюць алкінавую групу.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: прадстаўнікі сінтэзаваных злучэнняў могуць быць выкарыстаны пры стварэнні лекавых сродкаў і іх пралекавых форм для лячэння нейрадэгенератыўных і вочных захворванняў, пры дызаіне сродкаў дастаўкі і геннай тэрапіі; прапанаваныя рэагенты для ўвядзення азіднай групы могуць знайсці прымяненне ў вытворчасці мечаных алігануклеатаў.

Вобласць ужывання: арганічная і біяарганічная хімія, біякан'югацыя нуклеінавых кіслот, малекулярная біялогія, медыцына.

Подписано в печать 08.12.2023.
Формат 60×84/16. Бумага офсетная. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 1,35. Тираж 60 экз. Заказ № 425.

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.