

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию УЛАЩИКА Егора Александровича  
«Синтез модифицированных нуклеозидов и олигонуклеотидов как  
перспективных терапевтических агентов», представленную на соискание ученой  
степени кандидата химических наук по специальности  
02.00.10 – биоорганическая химия

### Соответствие диссертации специальности и отрасли науки

Диссертационная работа Улащика Е.А. посвящена синтезу модифицированных нуклеозидов, олигонуклеотидов и конъюгатов, которые позволяют реализовать терапевтический потенциал молекул. На основании анализа диссертационной работы, автореферата, опубликованных результатов диссертации (10 статей и 8 тезисов докладов на конференциях) и актов использования некоторых результатов (краткие выписки на стр. 163-178 диссертации) можно сделать вывод, что рассматриваемая работа соответствует заявленной специальности 02.00.10 – биоорганическая химия (область исследования пп. 1 и 2 согласно Паспорту специальности) отрасли – химические науки и требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

### Актуальность темы диссертации

Нуклеиновые кислоты (НК) определяют структуру всего живого на Земле, а также процессы жизнедеятельности и воспроизводства. Нуклеозиды являются компонентами НК и, в виде низкомолекулярных соединений – нуклеотидов, а также их многочисленных производных, играют важную роль в функционировании живой клетки, регулируя её метаболизм.

В 1945 году американскими учеными был синтезирован аналог гуанина, в котором атом кислорода заменили на химически родственный атом серы, получив 6-тиогуанин. Это соединение продемонстрировало способность ингибировать пролиферацию злокачественных клеток (TABLOID®). Данное достижение ознаменовало начало новой эры в разработке лекарственных средств: создания аналогов природных нуклеозидов/нуклеотидов, антисмысловых олигонуклеотидов (antisense nucleosides; ASO), малых интерферирующих РНК (siRNA) и других терапевтических молекул РНК, обладающих значительным лечебным потенциалом.

В результате синтеза многочисленных аналогов природных нуклеозидов и скрининга их биологической активности было выявлено множество соединений, проявляющих противовирусную и противоопухолевую активность. Это привело к лицензированию значительного количества (более 25) противовирусных и противоопухолевых препаратов. Исследования в данном направлении активно продолжаются в многочисленных лабораториях и фармацевтических компаниях.



Благодаря этим усилиям в последние годы были разработаны высокоэффективные препараты против вируса иммунодефицита человека, коронавируса и вируса гепатита С.

В диссертационной работе (стр. 60-77) описан синтез ряда периленовых производных урациловых нуклеозидов. Периленовые производные арабинозида и рибозида урацила были исследованы на активность против вируса клещевого энцефалита. В этом же разделе (стр. 70-77) представлены результаты исследования ферментативной активности синтезированного C5,6-дейтерированного дезоксицитидина в реакциях, катализируемых метилтрансферазами M.HhaI и DNMT3Ac. Полученные данные позволяют глубже понять механизм действия этих ферментов, что имеет важное значение для разработки новых подходов к направленному синтезу функционально активных олигонуклеотидов.

Как отмечалось ранее, в последние годы наблюдается устойчивый рост интереса к синтезу и изучению биологической активности различных типов олигонуклеотидов, в частности siRNA и miRNA. В 2023 году Управление по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) одобрило два знаковых метода терапии – Casgevy и Lyfgenia, которые стали первыми одобренными клеточными генными терапиями для лечения серповидноклеточной анемии (SCD) у пациентов в возрасте от 12 лет. Примечательно, что Casgevy представляет собой первую FDA-одобренную терапию, использующую технологию редактирования генома, что знаменует собой революционное достижение в области генной терапии. Результаты диссертанта в данной области изложена на стр. 77-109. С химической точки зрения эта работа представляет значительную сложность и требует высокого уровня экспериментального мастерства. Была разработана система, состоящая из двух олигомерных молекул: siRNA (активное вещество) и углеводного фрагмента GalNAc (транспортер), которые образуют конъюгат, способный доставлять олигонуклеотид к целевым органам, таким как пораженная печень. Диссертантом были предложены и реализованы схемы синтеза данных конъюгатов. Результаты этой работы были опубликованы в 2021 году в журнале «Methods in Molecular Biology». Востребованность методологии, разработанной Улащиком Е.А. и соавт., подтверждается фактом данной публикации: Qiang Li, Mingxin Dong and Pu Chen. Novel diamine-scaffold based N-acetylgalactosamine (GalNAc) – siRNA conjugate: synthesis and in vivo activities. Cite this: RSC Adv., 2024, 14, 17461; (doi: 10.1039/d4ra03023k), в которой работа (Е. А. Ulashchik, Y. V. Martynenko-Makaev, T. P. Akhlamionok, et al., Synthesis of GalNAc-Oligonucleotide Conjugates Using GalNAc Phosphoramidite and Triple-GalNAc CPG Solid Support, Methods Mol. Biol., 2021, 2282, 101 – 118) под номером 24 упоминается дважды: (1) On the one hand,

the modified nucleoside phosphoramidite with an individual GalNAc residue connected to either the nucleobase or the 2' or 3' position on the ribose may be inserted at any position of the strand during solid phase synthesis. [24]; (2) On the other hand, the diamine-scaffold-based GalNAc CPG, which can facilitate the synthesis of TG2 – ssRNA, was synthesized (Scheme 2B) [24].

В этой связи решение научных задач, поставленных в диссертационной работе Улащика Е.А., посвященной разработке новых подходов и методик получения модифицированных нуклеозидов и олигонуклеотидов, является актуальным и имеет высокую научную и практическую значимость. 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).

#### **Степень новизны результатов диссертации и научных положений, выносимых на защиту**

С момента первого химического синтеза нуклеозидов в начале XX века и разработки химико-ферментативных методов синтеза в 1940-х годах было опубликовано огромное количество работ, поэтому вопрос о принципиальной новизне таких исследований в настоящее время не актуален. Диссертант выполнил значительный объем синтетической работы, продемонстрировав высокую квалификацию как химик-синтетик. В диссертации и научных публикациях им описаны различные методы синтеза и получен широкий спектр соединений.

Среди наиболее значимых результатов следует особо отметить синтез дейтерированных соединений. Эти соединения представляют особый интерес как субстраты для изучения метилтрансфераз M.NhaI и DNMT, чья роль в метаболизме нуклеиновых кислот остается недостаточно изученной. Хотя полученные результаты не позволяют однозначно определить механизм ферментативной реакции, они имеют существенную научную ценность.

Особого внимания заслуживает разработанная диссертантом стратегия синтеза новых реагентов и компонентов, включая: моно-GalNAc амидофосфитный реагент, моно-GalNAc и трис-GalNAc(ТЭГ) носители. Эти разработки позволяют модифицировать нуклеиновые кислоты в различных положениях цепи в процессе автоматического твердофазного синтеза. Кроме того, была разработана эффективная методика получения конъюгатов 2'-F и 2'-ОМе миРНК с три- и трис-GalNAc лигандами, что открывает новые возможности для направленной доставки миРНК в гепатоциты.

В завершение следует отметить успешное применение разработанных методик для синтеза направляющих CRISPR РНК-олигонуклеотидов, функционирующих в комплексе с эндонуклеазой Cas12a в формате сплит-системы. Экспериментально показано, что активность нуклеазы AsCas12a в отношении ДНК зависит от точки усечения направляющей CRISPR РНК и может быть восстановлена добавлением полноразмерных РНК-фрагментов.

Таким образом, результаты, представленные в работе, и положения, выносимые на защиту, демонстрируют явную новизну.

#### **Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Достоверность полученных результатов, сделанных выводов и рекомендаций в работе Улащика Е.А. не вызывает сомнений. Надежность представленных данных обеспечивается применением современных физико-химических методов анализа, таких как ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия, ионообменная и обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография, УФ-спектроскопия и гель-электрофорез, которые были использованы для определения структуры и исследования свойств синтезированных соединений. Выводы и положения, выносимые на защиту, полностью соответствуют содержанию диссертации, ее целям и задачам.

#### **Научная, практическая и экономическая значимость результатов диссертации с указанием рекомендаций по их использованию**

Результаты, представленные в диссертационном исследовании Улащика Е.А., обладают существенной научной и практической значимостью. Подтверждением значимости результатов исследования служит их выполнение в рамках государственных программ научных исследований (ГПНИ), государственных программ (ГП), государственных научно-технических программ (ГНТП) и грантов.

Научная значимость полученных в работе результатов заключается в разработке подходов к синтезу новых модифицированных нуклеозидов и олигонуклеотидов, обладающих способностью модулировать активность

ферментов и использоваться в качестве терапевтических агентов. В частности, разработаны методы синтеза дейтерий-содержащих олигонуклеотидов, конъюгатов миРНК с GalNAc-лигандами и направляющих CRISPR РНК-олигонуклеотидов. Разработанные подходы позволяют создавать нуклеиновые кислоты с заданными свойствами, такими как повышенная стабильность, эффективность и адресность доставки.

Практическая значимость выполненного диссертационного исследования состоит в получении ряда соединений – нуклеозидов и модифицированных олигонуклеотидов, обладающих биологической активностью. Особо хочется подчеркнуть, что разработана эффективная методика получения конъюгатов миРНК с GalNAc лигандами, что позволило создать новые соединения для целевой доставки миРНК в гепатоциты. Также показано, что дейтерий-содержащие олигонуклеотиды способны замедлять работу метилтрансфераз, а направляющие CRISPR РНК-олигонуклеотиды могут использоваться в формате сплит-системы с эндонуклеазой Cas12a. Все эти результаты открывают перспективы для разработки новых противовирусных препаратов, совершенствования методов генной терапии и изучения механизмов работы ферментов, что может найти практическое применение в создании новых терапевтических средств.

#### **Опубликованность результатов диссертации в научной печати**

Материалы исследований, описанных в диссертационной работе Улащика Е.А., нашли отражение в 18 научных работах, среди которых 10 статей в рецензируемых международных и отечественных научных журналах (общий объем 11.5 авторских листов), тезисы 8 докладов на научных конференциях. Основные результаты и положения диссертационной работы достаточно полно представлены и обсуждены в научной печати.

#### **Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК**

Диссертационная работа оформлена в соответствии с требованиями ВАК Республики Беларусь. Работа изложена на 178 страницах машинописного текста и включает следующие структурные элементы: оглавление (стр. 2-5); список сокращений и обозначений (стр. 6-8). Наличие списка сокращений особенно важно для читателя, поскольку описание химических исследований сопровождается многочисленными специальными обозначениями. Далее следует краткое введение, в котором рассматривается значимость модифицированных (структурно измененных) компонентов нуклеиновых кислот – нуклеозидов и нуклеотидов – для поиска потенциально значимых лекарственных препаратов.

Общая характеристика работы представлена на стр. 11-17, в которой перечислены: (1) организационные мероприятия, (2) цель и задачи исследования,

(3) объекты и предметы исследования, (4) научная новизна (шесть пунктов), (5) положения, выносимые на защиту (5 пунктов), (6) личный вклад соискателя ученой степени, (7) апробация результатов диссертации, (8) опубликованность результатов диссертации и (9) структура и объем диссертации. Затем следуют: Глава 1. Модифицированные реагенты для получения терапевтических олигонуклеотидов (обзор литературы) (стр. 17-59), Глава 2. Синтез нуклеозидов и реагентов для модификации нуклеиновых кислот (результаты и обсуждение) (стр. 60-109), Глава 3. Экспериментальная часть (стр. 110-137), Заключение (стр. 138-139), Список использованных источников, 234 (стр. 140-160), Список публикаций соискателя ученой степени (стр. 160-162).

В конце диссертации (стр. 163-177) автор приводит Акты (1) внедрения технологии синтеза амидофосфонных реагентов, (2) о практическом использовании (внедрении) результатов диссертационного исследования на основе, (3) готовности производства к выпуску синтетических направляющих РНК для CRISPR, (4 и 5) о практическом использовании (внедрении) результатов диссертационного исследования, а так же титульные листы ТУ (1) технических условий на конформационно заблокированные нуклеозиды, (2) опытно-промышленного регламентатвердофазного синтеза трис-GalNAc-TEG-CPG и (3) GalNAc-CEP.

Автореферат диссертации полностью отражает суть диссертационного исследования, содержит основные результаты и положения, выносимые на защиту. Оформление диссертационной работы и автореферата соответствует требованиям ВАК Республики Беларусь.

### **Замечания**

По тексту диссертационной работы имеются замечания.

В экспериментальной части ряда публикаций и диссертации соискателя данные ЯМР-спектроскопии представлены в виде химических сдвигов без отнесения резонансных сигналов соответствующим атомам, что снижает информативность материала. Подобный подход затрудняет как интерпретацию результатов читателями, так и их дальнейшее использование самим автором. В связи с этим рекомендуется в будущих работах приводить данные ЯМР в стандартизированном табличном формате с полной расшифровкой сигналов. Такой формат не только облегчит восприятие результатов, но и создаст ценную базу данных для последующих исследований.

К сожалению, активность периленовых производных не была протестирована в сравнении с известными противовирусными препаратами. Для более полной характеристики противовирусной активности соединений, в частности периленовых производных, целесообразно в дальнейшем провести их сравнительный анализ с референсными препаратами. Отсутствие таких

сравнительных данных для данной группы соединений не позволяет в полной мере оценить их терапевтический потенциал и конкурентные преимущества. Подобный анализ позволил бы точнее определить перспективность разработки именно периленовых производных в качестве противовирусных агентов.

Высказанные замечания существенно не влияют на сделанные автором выводы и положения, выносимые на защиту.

**Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует**

Считаю, что диссертация Улащика Е.А. «Синтез модифицированных нуклеозидов и олигонуклеотидов как перспективных терапевтических агентов», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия, является успешным квалифицированным научным трудом. По актуальности темы научного исследования, объему экспериментальной работы и значимости полученных результатов диссертационная работа отвечает требованиям ВАК Республики Беларусь, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и заслуживает высокой оценки. Автор работы Улащик Егор Александрович в ходе выполнения эксперимента и обобщения полученных результатов проявил себя как квалифицированный специалист в области биоорганической химии и заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

**Формулировка конкретных научных результатов (с указанием их новизны и практической значимости), за которые может быть присуждена учёная степень**

Диссертационная работа Улащика Е.А. «Синтез модифицированных нуклеозидов и олигонуклеотидов как перспективных терапевтических агентов» представляет собой законченное научное исследование, содержащее новые научные результаты в области синтеза модифицированных нуклеозидов и олигонуклеотидов. Работа соответствует всем установленным требованиям, предъявляемым ВАК Беларуси к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук согласно «Положению о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь».

Считаю, что Улащик Егор Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия за новые научно обоснованные теоретические и экспериментальные результаты, включающие:

– синтез новых 5-перилен-3-илэтиниловых производных нуклеозидов уридинового ряда на основе защищенных 5-иодуридиновых блоков;

– синтез дейтерированного по атомам С-5 и С-6 2'-дезокситидинового амидофосфитного реагента, предназначенного для введения атомов дейтерия в олигонуклеотиды;

– разработку 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;

– разработку методов синтеза новых моно-GalNAc амидофосфитного реагента, моно-GalNAc носителя и трис-GalNAc(ТЭГ) носителя, предназначенных для модификации нуклеиновых кислот в процессе автоматического твердофазного синтеза;

– усовершенствование технологии синтеза направляющих РНК с использованием автоматического олигонуклеотидного синтезатора ASM-2000, в результате чего были получены направляющие CRISPR РНК-олигонуклеотиды, действующие в комплексе с эндонуклеазой Cas12a в формате сплит-системы,

что позволило получить соединения с высокой активностью против вирусов простого герпеса, гриппа А, парагриппа человека типа 3, респираторного-синцитиального вируса и вируса клещевого энцефалита, а также дейтерийсодержащие олигонуклеотиды, для которых был продемонстрирован кинетический изотопный эффект в процессе метилирования ДНК под действием метилтрансфераз M.NhaI и DNMT 3Ac, синтезировать конъюгаты миРНК с тремы аффинными лигандами для адресной доставки миРНА в гепатоциты и направляющие РНК для системы CRISPR, что в совокупности вносит значительный вклад в развитие методов синтеза биологически активных нуклеозидов и олигонуклеотидов.

Официальный оппонент:

главный научный сотрудник лаборатории  
химии нуклеотидов и полинуклеотидов  
ИБОХ НАН Беларуси,  
член-корреспондент, доктор химических наук,  
профессор

И.А. Михайлопуло

