

УТВЕРЖДАЮ

Первый проректор
учреждения образования
«Белорусский государственный
технологический университет»


А.А. Сакович
«27» _____ 2025 г.

ОТЗЫВ

оппонирующей организации учреждения образования «Белорусский государственный технологический университет» 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.

Диссертационная работа Улащика Е.А. выполнена в лаборатории химии биоконъюгатов Института физико-органической химии НАН Беларуси, является частью плановых НИР по государственным программам научных исследований Республики Беларусь и соответствует приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь. Диссертационная работа включает содержание, перечень сокращений и обозначений, введение, общую характеристику работы, три главы, заключение, список использованных источников и приложения. Полный объем диссертации составляет 178 страниц, включая 103 иллюстрации на 43 страницах, 12 таблиц на 5 страницах и 12 приложений на 16 страницах. Список использованных источников содержит 234 наименования, занимающие 22 страницы, а также список публикаций соискателя, включающий 18 работ на 3 страницах.

Соответствие содержания диссертации заявленной специальности и отрасли науки

Объектом исследования диссертационной работы Улащика Е.А. являются нуклеозиды пиримидинового ряда, в том числе конформационно блокированные, 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 блокированных, и производных N-ацетилгалактозамина, а также применение синтезированных соединений для получения модифицированных нуклеиновых кислот; усовершенствование технологии получения синтетических направляющих РНК и миРНК-олигонуклеотидов.

Все исследования, проведенные Улащиком Е.А., были выполнены на высоком научном уровне с использованием современных физико-химических методов анализа. В работе применялись: ЯМР-спектроскопия для анализа структуры синтезированных соединений, масс-спектрометрия, ВЭЖХ/МС, масс-спектрометрия высокого разрешения, УФ-спектроскопия, а также ионная и обращенно-фазовая ВЭЖХ.

На основании анализа содержания диссертационной работы, автореферата, опубликованных результатов, направлений научных тематик и программ, в рамках которых соискателем выполнялись научные исследования, установлено, что работа Улащика Е.А. полностью соответствует отрасли «химические науки» и паспорту специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия (раздел III: 1. Низкомолекулярные биорегуляторы: простагландины, стероиды, пептиды, нуклеотиды и нуклеозиды, витамины, липиды, алкалоиды и др. Синтез, выделение из природных источников, установление структуры, изучение свойств. Синтетические биологически активные вещества (лекарства, пестициды). 2. Биологически активные олигомеры: олигопептиды, олигонуклеотиды, олигосахариды. Твердофазный автоматический синтез пептидов и олигонуклеотидов. Создание систем и молекулярных инструментов для генной терапии (РНКи, CRISPR, антисмысловая терапия и др.), утвержденным приказом Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь от 08.01.2024 № 6.

Научный вклад соискателя в решение научной задачи с оценкой его значимости

Научный вклад соискателя заключается в решении актуальной научно-технической задачи, связанной с разработкой новых подходов и методик синтеза нуклеозидов пиримидинового ряда и производных N-ацетилгалактозамина, созданием модифицирующих реагентов на их основе, а также получением ДНК- и РНК-олигонуклеотидов и их конъюгатов с улучшенными функциональными характеристиками.

Модифицированные олигонуклеотиды и нуклеозиды имеют важное значение для биотехнологии и медицины, в частности, для диагностики и разработки лекарственных средств. В связи с развитием методов генной терапии возникает необходимость в создании модифицированных нуклеиновых кислот для повышения их эффективности и стабильности, а также решения проблемы их адресной доставки в клетки-мишени. Несмотря на активную работу по созданию новых нуклеозидных препаратов, совершенствование существующих нуклеозидных лекарств не теряет своей актуальности. Таким образом, разработка новых производных нуклеозидов и модифицированных нуклеиновых кислот является важной задачей и открывает перспективы для создания эффективных терапевтических средств.

В представленной к защите диссертационной работе Улащика Е.А. решены ключевые задачи, связанные с разработкой и синтезом новых производных нуклеозидов и модифицированных нуклеиновых кислот, что имеет важное значение для современной биотехнологии, биохимии и медицины. В ходе исследования были получены новые 5-перилен-3-илэтиниловые производные уридина с использованием защищенных 5-иодуридиновых блоков для тестирования их противовирусной активности; синтезирован новый 2-дезоксцитидиновый амидофосфитный реагент, дейтерированный по атомам С-5 и С-6, а также получены селективно дейтерированные олигонуклеотиды для изучения ферментативного метилирования ДНК; разработана новая методика 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; синтезированы 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; разработан метод получения конъюгатов 2'-F и 2'-OMe миРНК с три- и трис-GalNAc лигандами, с использованием которого синтезированы новые соединения для адресной доставки миРНК в гепатоциты; оптимизирован процесс твердофазного синтеза направляющих РНК-олигонуклеотидов с использованием синтезатора ASM-2000, что позволило получить как полноразмерные направляющие РНК-олигонуклеотиды, так и короткие РНК для системы CRISPR, действующие в комплексе с эндонуклеазой Cas12a в формате сплит-системы.

Диссертационная работа Улащика Е.А. являлась частью плановых исследований лаборатории химии биоконъюгатов Института физико-органической химии НАН Беларуси, которые соответствуют приоритетным направлениям научных исследований на 2016–2020 годы, утвержденным постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 12 марта 2015 г. № 190: п.2. Химический синтез и продукты, п.3 Биологические системы и технологии, а также приоритетным направлениям научно-технической деятельности на 2016–2020 годы, утвержденные указом Президента Республики Беларусь от 22 апреля 2015 г. № 166: п.5. Химические технологии, нефтехимия. Кроме того, 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).

Конкретные научные результаты (с указанием их новизны и практической значимости), за которые соискателю может быть присуждена искомая ученая степень

Полученные результаты обладают значительной научной ценностью и новизной, заключающейся в разработке методик синтеза новых производных нуклеозидов и уникальных олигонуклеотидов, а также в комплексном исследовании их физико-химических свойств. Разработанные подходы применяются для направленного синтеза биологически активных соединений, включая модифицированные нуклеозиды, олигонуклеотиды и их конъюгаты, что способствует созданию высокоэффективных терапевтических агентов. Данные исследования вносят существенный вклад в развитие генной терапии и поиск новых противовирусных препаратов, расширяя перспективы их практического применения.

Соискателю Улащику Е.А. может быть присуждена ученая степень кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия за приведенные ниже новые научно обоснованные экспериментальные и теоретические результаты:

– синтез новых 5-перилен-3-илэтиниловых производных нуклеозидов уридинового ряда, в том числе конформационно заблокированного по углеводному фрагменту, с использованием защищенных 5-иодуридиновых блоков;

- впервые осуществленный синтез дейтерированного по атомам С-5 и С-6 2'-дезоксцитидинового амидофосфитного реагента исходя из 2'-дезоксцитидина и получение содержащих дейтерий олигонуклеотидов;
- 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;
- синтез новых GalNAc производных из D-галактозамина гидрохлорида для модификации олигонуклеотидов в процессе твердофазного синтеза и оптимизацию методики получения 2'-F и 2'-OMe GalNAc-миРНК с использованием синтезированных реагентов;
- оптимизированную технологию 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.

Практическая значимость работы

В результате выполнения работы удалось получить соединения с высокой активностью против вирусов простого герпеса, гриппа А, парагриппа человека типа 3, респираторно-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 тремя аффинными лигандами для адресной доставки миРНК в гепатоциты и направляющие РНК для системы CRISPR, что в совокупности вносит значительный вклад в развитие методов синтеза биологически активных нуклеозидов и олигонуклеотидов.

Значимость результатов диссертационного исследования подчёркивается выполнением данной работы в рамках заданий (мероприятий) государственных программ научных исследований, государственных программ, государственных научно-технических программ и грантов и состоит в следующем:

1. При выполнении диссертационной работы разработана технология получения амидофосфитных конформационно заблокированных реагентов, соответствующих зарегистрированным Техническим условиям ТУ ВУ 100185198.200-2019. Применение в производственном процессе подтверждено актом внедрения

технологии в производство и актом о внедрении результатов диссертационного исследования.

2. Методики получения трис-N-ацетилгалактозаминового (ТЭГ) носителя и моно-GalNAc амидофосфитного реагента легли в основу технологических процессов, описанных в опытно-промышленных регламентах на синтез модифицирующего твердофазного носителя трис-GalNAc-TEG-CPG и на синтез фосфорамидитного реагента GalNAc-CER.

3. На основе оптимизированного процесса твердофазного синтеза направляющих РНК с использованием синтезатора ASM-2000 разработана технология получения синтетических направляющих РНК для технологии геномного редактирования CRISPR. Проведена процедура государственной регистрации технических условий ТУ ВУ 100185198.204-2020 «РНК-олигонуклеотиды направляющие синтетические», оформлены акт готовности производства к выпуску соответствующей продукции и акты о внедрении результатов диссертационного исследования.

4. Способ получения дейтерированных олигонуклеотидов, вошедший в Топ-10 фундаментальных результатов научных исследований ученых НАН Беларуси 2016 года, может найти применение в исследовании процессов метилирования ДНК, а также открыть новые подходы к исследованию механизмов развития клеток.

Рекомендации по использованию результатов диссертации

Новые 5-перилен-3-илэтиниловые производные нуклеозидов уридинового ряда могут найти применение в разработке противовирусных препаратов, что открывает перспективы для создания новых терапевтических средств в современной медицине.

Дейтерийсодержащий нуклеозидный амидофосфитный реагент и дейтерированные олигонуклеотиды могут быть использованы для изучения механизмов метилирования ДНК, а также в качестве альтернативы классическим ингибиторам метилтрансфераз, что может способствовать развитию новых подходов в эпигенетических исследованиях.

Разработанные методики, включая постсинтетическую модификацию РНК-олигонуклеотидов методом [3+2]-диполярного циклоприсоединения, а также синтез GalNAc реагентов, могут найти применение для создания функционально модифицированных нуклеиновых кислот с улучшенными свойствами. Эти подходы могут быть использованы для получения терапевтических олиго-

нуклеотидов и разработки методов адресной доставки генетического материала в целевые клетки.

Усовершенствованная технология синтеза направляющих РНК с использованием автоматического синтезатора ASM-2000, включая получение CRISPR РНК-олигонуклеотидов, совместимых с эндонуклеазой Cas12a в формате сплит-системы, может найти применение в технологиях геномного редактирования. Данные достижения могут быть использованы для создания новых инструментов в молекулярной биологии, генной терапии и биотехнологии, что подчеркивает их потенциал для решения актуальных научных и медицинских задач.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует

Научные положения и выводы, изложенные в работе, базируются на достоверных экспериментальных данных, полученных с использованием современных физико-химических методов исследования органических соединений. Обсуждение результатов проведено корректно, выводы аргументированы, обобщены и не вызывают сомнений. Диссертационная работа Улащика Е.А. представляет собой завершённое научное исследование. Соискатель активно участвовал в анализе литературных данных, проведении экспериментальной работы, разработке и модификации методик, установлении структуры синтезированных соединений, подготовке публикаций и представлении результатов исследований на конференциях. Указанные факты свидетельствуют о том, что уровень научной подготовки Улащика Е.А. соответствует требованиям ВАК Республики Беларусь, предъявляемым к соискателям ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия.

Основные результаты диссертации опубликованы в 18 научных работах, в том числе 10 статьях в рецензируемых научных изданиях общим объемом 11,5 авторского листа, а также в тезисах 8 докладов конференций. Публикации в полной мере отражают содержание работы, сделанные выводы и положения, выносимые на защиту. Диссертационная работа оформлена в соответствии с требованиями ВАК Республики Беларусь.

Замечания

По содержанию работы имеется ряд замечаний.

1. В тексте встречаются неудачные, иногда разговорного характера, выражения (с. 45, с. 53, с. 57, с. 58, с. 91, с. 95).

2. В тексте работы допущены немногочисленные опечатки: «антисмысловых» вместо антисмысловых (с. 49), «постинтетической» вместо постсинтетической (с. 58), «фосфорадимидатную» вместо фосфородиамидатную (с. 49), «палладивого» вместо палладиевого (с. 64), «хроматографическую» вместо хроматографическую (с. 67).

3. Название реагента ГБТУ, несмотря на то, что автор приводит его расшифровку в списке сокращений, является редко встречающейся и нераспространенной аббревиатурой в русскоязычной научной литературе.

4. Из таблицы 2.2 на стр. 69 не сразу очевидно, почему дублируются результаты цитотоксичности нуклеозидов. Автору следовало бы детальнее прокомментировать таблицу.

Указанные замечания не касаются сущности работы, носят характер рекомендаций и не меняют общую положительную оценку диссертационной работы, которая является завершенным исследованием, выполненным в актуальной области на высоком научном уровне. По объему выполненных исследований, достоверности, научной и практической значимости полученных результатов, обоснованности выводов работа и квалификация ее автора Улащика Е.А. соответствует ученой степени кандидата химических наук.

Заключение оппонировавшей организации

Изложенное выше дает основание считать, что диссертационная работа Улащика Егора Александровича «Синтез модифицированных нуклеозидов и олигонуклеотидов как перспективных терапевтических агентов» по выбору научного направления, актуальности решаемых проблем, научной новизне и практической значимости результатов соответствует всем требованиям пунктов 20 и 21 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь», утвержденного Указом Президента Республики Беларусь от 02.06.2022 г. № 190. Работа содержит результаты, включающие:

– синтез новых 5-периллен-3-илэтиниловых производных нуклеозидов уридинового ряда, которые проявляет активность против вируса простого герпеса (ВПГ-1), против вирусов гриппа А (IVA), парагриппа человека типа 3 (PIV-3), респираторно-синцитиального вируса (RSV) и вируса клещевого энцефалита;

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

был показан кинетический изотопный эффект в процессе метилирования ДНК под действием метилтрансфераз M.HhaI и DNMT 3Ac;

– разработка 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; применение разработанного подхода для эффективного введения как мономерных, так и кластерных N-ацетилгалактозаминовых модификаций в миРНК для их тестирования как *in vitro*, так и *in vivo*;

– разработка 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; с использованием оригинальных моно- и трис-GalNAc производных получены конъюгаты миРНК, содержащие три аффинных лиганда, проявившие высокую *in vitro* и *in vivo* активность в процессе РНК-интерференции;

– усовершенствованная технология синтеза направляющих РНК с использованием автоматического олигонуклеотидного синтезатора ASM-2000, с помощью которой были получены направляющие CRISPR РНК-олигонуклеотиды, действующие в комплексе с эндонуклеазой Cas12a в формате сплит-системы.

В целом объем и достоверность выполненных исследований, логика изложения материала диссертации, обоснованность сделанных выводов и уровень публикаций соискателя свидетельствуют о том, что Улащик Е.А. является квалифицированным специалистом в области синтеза биологически активных органических соединений и олигонуклеотидов. Полученные результаты, их научная и практическая значимость позволяют считать, что диссертация отвечает требованиям, предъявляемым ВАК Беларуси к кандидатским диссертациям, а ее автор Улащик Егор Александрович заслуживает присвоения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия.

Устный доклад соискателя ученой степени кандидата химических наук Улащика Е.А., отзыв эксперта по диссертации заведующего кафедрой биотехнологии, кандидата химических наук, доцента Леонтьева В.Н. заслушаны и обсуждены на расширенном научном семинаре кафедры биотехнологии (протокол № 1 от «27» марта 2025 г.) согласно приказу ректора учреждения

образования «Белорусский государственный технологический университет» (№ 183 от «20» марта 2025 г.).

Присутствовали: 26 чел., в том числе к.н. – 14.

По диссертационной работе было задано 12 вопросов. Вопросы задавали: к.х.н. Леонтьев В.Н. – 4, к.х.н. Кузьменок Н.М. – 4, к.б.н. Игнатовец О.С. – 2, к.х.н. Ковганко В.Н. – 2.

В голосовании приняли участие 14 человек.

Результаты голосования:

«ЗА» – 14, «ПРОТИВ» – нет, «ВОЗДЕРЖАЛИСЬ» – нет.

Председатель заседания,
доцент кафедры биотехнологии,
кандидат биологических наук, доцент

О.С. Игнатовец

Эксперт по диссертации, подготовивший отзыв,
заведующий кафедрой биотехнологии,
кандидат химических наук, доцент

В.Н. Леонтьев

Секретарь научного семинара,
доцент кафедры биотехнологии,
кандидат технических наук, доцент

Е.В. Феськова