

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-243

**ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО  
РНК-ОЛИГОНУКЛЕОТИДА С 5'-ТЕРМИНАЛЬНЫМ ФОСФАТОМ****PREPARATION AND APPLICATION OF SYNTHETIC RNA OLIGONUCLEOTIDE  
WITH 5'-TERMINAL PHOSPHATE**

И. Б. Козлов, О. А. Герасимов, О. Ю. Домашева, Л. Г. Бушина, Д. М. Федосеева

*Центр стратегического планирования и управления  
медико-биологическими рисками здоровью ФМБА России, Москва*

I. B. Kozlov, O. A. Gerasimov, O. Y. Domasheva, L. G. Bushina, D. M. Fedoseeva

*Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, FMBA of Russia, Moscow*

✉ IKozlov@cspfmba.ru

**Аннотация**

Активно развиваются технологии создания генотерапевтических препаратов с использованием синтетических 5'-фосфорилированных РНК-олигонуклеотидов. Их синтез осложнен подбором методов постсинтетической очистки с использованием ВЭЖХ. Мы предлагаем способ комбинирования ВЭЖХ-методов для эффективной очистки целевого продукта. Структура полученных 5'-фосфорилированных РНК-олигонуклеотидов была подтверждена с помощью ВЭЖХ-МС-спектрометрии.

**Abstract**

Technologies for creating genotherapeutic drugs using synthetic 5'-phosphorylated RNA oligonucleotides are being actively developed. The synthesis of these oligonucleotides is complicated by the methods selection for post-synthetic purification using HPLC. We propose combination of HPLC methods for efficient purification of the target product. The structure of the obtained 5'-phosphorylated RNA oligonucleotides was confirmed by LC-MS.

В настоящее время активно развиваются технологии создания генотерапевтических препаратов с использованием синтетических олигонуклеотидов [1]. Ферментативная сборка длинных генетических конструкций осуществляется с использованием РНК-лигаз, для обеспечения активности которых необходимо наличие терминального фосфата на 5'-конце олигонуклеотида. Использование синтетических РНК в сборке генетических конструкций обладает преимуществом по сравнению с использованием линейных фрагментов нуклеиновых кислот, полученных в результате амплификации, поскольку дает возможность введения модифицированных нуклеотидов в конкретные участки последовательности. В то время как наличие терминального 5'-фосфата снижает зависимость от необходимости осуществления дополнительной стадии кинирования фрагментов и значительно сокращает длительность процесса. Такой подход позволяет обеспечить функциональную активность будущей фармацевтической субстанции.

Помимо получения линейных РНК, технология может быть использована для наработки синтетических кольцевых РНК с использованием Т4 РНК-лигазы 1, которая формирует интрамолекулярную связь между 5'-фосфатом и 3'-ОН группой.

Для формирования длинной последовательности РНК используются синтетические 5'-фосфорилированные РНК-олигонуклеотиды. Их производство осложнено подбором методов постсинтетической очистки с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии из-за низкой гидролитической стабильности самих молекул. Наиболее распространенным методом ВЭЖХ для очистки олигонуклеотидов является обращенно-фазовая хроматография. Однако удаление всех гидрофобных защитных групп в процессе присоединения фосфата на 5'-конец РНК-олигонуклеотида делает процесс очистки затруднительным.

В научной литературе описывается способ присоединения на 5'-конец синтетической РНК фотодеградирующего (PhotoCleavable, PC) линкера [2, 3]. Наличие в своей структуре гидрофобной диметокситритильной (DMT) защитной группы позволяет осуществлять очистку с помощью обращенно-фазовой хроматографии. Последующее воздействие УФ-излучением (265 нм) на модифицированный PC-линкером РНК-олигонуклеотид приводит к полной деструкции линкерной молекулы с образованием терминального фосфата на 5'-конце РНК. Однако использование PC-линкера имеет ограничения, связанные со сложной логистикой из западных стран и относительно высокой стоимостью реагента.

В своей работе мы использовали комбинацию хроматографических методов, применение которой не зависит от гидрофобных свойств молекулы. Синтез РНК-олигонуклеотидов проводили амидофосфитным методом на автоматическом синтезаторе Polygen (Polygen GmbH, Германия). В качестве исходных реактивов использовали РНК-фосфорамидиты с TBDMS защитной группой на 2'-конце. В процессе синтеза РНК на финальной стадии присоединяли фосфорилирующий реагент II (CPR II). После снятия всех защитных групп с азотистых оснований, межнуклеотидных связей, 2'-положения рибозы и 5'-фосфатной группы РНК олигонуклеотид очищали с помощью ионно-обменной хроматографии. Пик на хроматограмме с наибольшей интенсивностью соответствовал искомому соединению и был собран полностью. Последующей гель-фильтрационной хроматографией синтезированную РНК отделяли от низкомолекулярных соединений. Полученные 5'-фосфорилированные РНК-олигонуклеотиды анализировали с помощью ВЭЖХ/МС-метода на соответствие расчетных масс.

### Литература

1. Bege M., Borbás A. The medicinal chemistry of artificial nucleic acids and therapeutic oligonucleotides // *Pharmaceuticals*. 2022. Vol. 15, No. 8. P. 909.
2. Hu T. et al. Light-Triggered Signal Enhancement Strategy Integrated with a CRISPR/Cas13a-Based Assay for Ultrasensitive and Specific miRNA Detection // *Analytical Chemistry*. 2023. Vol. 95, No. 50. P. 18587–18594.
3. Wenzel T. et al. Genosnip: SNP genotyping by MALDI-TOF MS using photocleavable oligonucleotides // *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 2003. Vol. 22, No. 5–8. P. 1579–1581.