

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 20__ р.

**ОТРИМАННЯ ТА АНАЛІТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НОВИХ
ЛІНКЕРНИХ ГРУП, ОПТИМІЗОВАНИХ ДЛЯ МРНК-ДИСПЛЕЮ *IN VIVO***

Випускна кваліфікаційна робота
студента денної форми навчання
за спеціальністю Біологія та біохімія
Хадирова Селіма Ленур огли

Науковий керівник від кафедри
д-р. біол. наук, ст. наук. співроб.
Дворщенко К.О.

Робота виконана на базі дослідного центру ТОВ «Юрія-Фарм» під керівництвом керівника відділу розробки біотехнологічних продуктів Губаря Олександра Миколайовича

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- ПЕГ – поліетиленгліколь;
- DAD – diode-array detector (діодно-матричний детектор);
- DVCO – dibenzocyclooctine (добензоциклооктин);
- DMT – dimetoxitriyl (диметокситритил);
- HILIC – hydrophilic interaction chromatography (хроматографія гідрофільної взаємодії);
- IP-RP-HPLC – ion-paired reverse-phase high performance liquid chromatography (іон-парна обернено-фазова високоефективна рідинна хроматографія);
- SPAAC – strain-promoted alkyne-azide cycloaddition (циклоприєднання, промотоване внутрішньою напругою);
- TFP – tetrafluorophenyl (тетрафторфеніл);
- VWD – variable wavelength detector (детектор із змінною довжиною).

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Загальна характеристика мРНК-дисплею як метода та підходи до синтезу, очищення та характеристики синтетичних олігонуклеотидів.....	8
1.1. мРНК-дисплей: перспективний спосіб скринінгу білкових бібліотек.....	8
1.2. Сучасні підходи до фракціонування та аналітичного контролю якості синтетичних нуклеїнових кислот.....	13
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....	19
2.1. Хімічні реактиви та матеріали для синтезу.....	19
2.2. Використане обладнання.....	20
2.3. Методи синтезу.....	21
2.4. Синтез кон'югатів олігонуклеотидів з ПЕГ-лінкерами шляхом TFP-амінного приєднання та SPAAC-клік-хімії.....	22
2.5. Очищення кон'югатів із використанням обернено-фазної хроматографії з іон-парним реагентом (IP-RP).....	23
2.6. Рідинна хроматографія з гідروفільною взаємодією (HILIC).....	24
2.7. Обробка даних за допомогою програмного забезпечення BioConfirm (Agilent MassHunter, версія B.08.00).....	26
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення.....	28
3.1. Синтетична бібліотека лінкерів розгалуженої архітектури для мРНК-дисплею <i>in vivo</i>	28
3.2. Оптимізація лужних умов для забезпечення стабільності РНК в умовах кон'югації із TFP-естерами.....	31
3.3. Двоетапна кон'югація олігонуклеотидів основної групи із бічною пуроміциною групою.....	35

3.3.1. Взаємодія із TFP-естером ацильного кінця ПЕГ-лінкера.....	35
3.3.2. Кон'югація ПЕГ-лінкера із бічною пуроміциною групою шляхом азид-алкінового циклоприєднання.....	40
3.4. Очищення пуроміцинових лінкерів шляхом обернено-фазної хроматографії з іон-парним реагентом.....	42
ВИСНОВКИ.....	48
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	50
ДОДАТКИ.....	55

ВСТУП

Системи мРНК-дисплею належать до найважливіших інструментів сучасної молекулярної біотехнології, оскільки дають змогу здійснювати селекцію пептидів і білків із високою спорідненістю до заданих мішеней у повністю безклітинному форматі. Однією з ключових переваг цього підходу є прямий зв'язок між генотипом і фенотипом, що забезпечується ковалентним поєднанням матричної РНК з продуктом трансляції. Це дозволяє працювати з надзвичайно великими бібліотеками варіантів, недосяжними для клітинних систем дисплею, та проводити селекцію в умовах, які більш точно моделюють реальні біологічні процеси (Roberts, 1997).

Центральним структурним елементом у такій системі є пуроміциновий лінкер, який забезпечує утворення стабільного зв'язку між нуклеїновою кислотою та синтезованим пептидом або білком. Саме архітектура лінкера, його хімічна чистота, стабільність і відтворюваність синтезу значною мірою визначають ефективність усього процесу мРНК-дисплею. Особливого значення це набуває при переході до складніших конструкцій, зокрема розгалужених лінкерів, що повинні поєднувати в собі функціональність, хімічну сумісність із біомолекулами та придатність до подальшої аналітичної характеристики. Ускладнення структури таких сполук закономірно призводить до зростання кількості побічних продуктів, неповних кон'югатів та інших домішок, які необхідно своєчасно виявляти, розділяти та контролювати.

Проблема ускладнюється тим, що синтез і подальша кон'югація пуроміцинових лінкерів відбуваються в умовах, де потрібно одночасно враховувати реакційну здатність функціональних груп, стабільність олігонуклеотидної частини та обмеження, пов'язані з низькою стійкістю РНК у лужному середовищі (Chheda, 2024). Через це отримання цільових кон'югатів не може розглядатися лише як задача органічного синтезу. Воно потребує розроблення цілісної технологічної схеми, яка включає вибір

послідовності стадій, умов депротекції, підходів до кон'югації, методів очищення та способів аналітичного підтвердження структури кінцевих продуктів. Особливої уваги потребує відбір хроматографічних підходів, здатних ефективно розділяти як низькомолекулярні побічні компоненти, так і структурно близькі олігонуклеотидні домішки, а також забезпечувати коректну мас-спектрометричну ідентифікацію.

Актуальність роботи зумовлена необхідністю створення відтворюваного підходу до синтезу, кон'югації, очищення та аналітичної оцінки пуроміцинових лінкерів розгалуженої архітектури, придатних для подальшого використання у функціональних системах мРНК-дисплею. Незважаючи на значний інтерес до технологій мРНК- та кДНК-дисплею, практичні аспекти одержання складних пуроміцинових лінкерів, зокрема з урахуванням багатостадійної кон'югації та необхідності контролю побічних продуктів, висвітлені недостатньо. Це створює потребу в розробленні стандартизованої технології, яка б поєднувала препаративну придатність із надійною аналітичною верифікацією структури та чистоти одержаних продуктів.

Метою кваліфікаційної роботи є розроблення технології синтезу, кон'югації, очищення та аналітичної характеристики набору пуроміцинових лінкерів розгалуженої архітектури з урахуванням особливостей їх подальшого використання у системах мРНК-дисплею.

Відповідно до поставленої мети були сформульовані такі завдання:

1. Проаналізувати сучасний стан технології мРНК-дисплею та методи контролю якості олігонуклеотидних кон'югатів для розробки оптимізованої схеми синтезу розгалужених пуроміцинових лінкерів, стійких до деградації РНК у реакційному середовищі.

2. Виявити основні «вузькі місця» процесу синтезу та очищення і запропонувати шляхи їх усунення.

3. Здійснити очищення одержаних кон'югатів і провести їх аналітичну

характеристику методом вискоєфективної рідинної хромато-мас-спектрометрії.

Наукова новизна роботи зводиться до розроблення та апробації технологічного підходу до отримання пуроміцинових лінкерів розгалуженої архітектури, який поєднує багатостадійний синтез, кон'югацію, хроматографічне очищення та мас-спектрометричну ідентифікацію продуктів. У роботі проаналізовано характер домішок, що виникають на різних етапах одержання таких сполук, а також оцінено придатність різних аналітичних підходів для контролю повноти кон'югації та чистоти цільових продуктів.

Практичне значення роботи полягає у створенні робочої схеми синтезу та очищення пуроміцинових лінкерів, придатної для використання в лабораторній практиці та подальшого вдосконалення. Одержані результати можуть бути використані при підготовці функціональних кон'югатів для систем мРНК- і кДНК-дисплею, а також у роботах, пов'язаних із синтезом складних олігонуклеотидних конструкцій, їх очищенням та характеристикою із використанням вискоєфективної рідинної хромато-мас-спектрометрії.

РОЗДІЛ 1

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА мРНК-ДИСПЛЕЮ ЯК МЕТОДА ТА ПІДХОДИ ДО СИНТЕЗУ, ОЧИЩЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИЗАЦІЇ СИНТЕТИЧНИХ ОЛІГОНУКЛЕОТИДІВ

1

1.1. мРНК-дисплей: перспективний спосіб скринінгу білкових бібліотек

Історія розвитку мРНК-дисплею є результатом конвергенції успіхів у галузі молекулярної біології, хімічного синтезу та розуміння механізмів трансляції. Концептуальні засади фізичного зв'язку між мРНК та білком почали формуватися ще у 1970-х роках, коли дослідники продемонстрували, що специфічні мРНК можуть бути збагачені шляхом імунопреципітації полісом за допомогою антитіл, спрямованих на білковий продукт (Kraus, 1982; Payvar, 1979; Schechter, 1973). Це були перші спроби використати трансляційний комплекс як носій генетичної та структурної інформації, хоча на той час методи клонування та секвенування ще не дозволяли повноцінно реалізувати потенціал цього підходу. У 1991 році Кавасакі запропонував ідею використання полісом для селекції пептидів, але експериментальне підтвердження з'явилося лише через три роки (Kawasaki, 1991). Матеакіс та колеги у 1994 році вперше реалізували афінну селекцію коротких пептидів з бібліотек, використовуючи полісомні системи *E. coli*, що заклало фундамент для сучасного рибосомного дисплею (Mattheakis, 1994). Проте полісомні комплекси характеризувалися нестабільністю та високою чутливістю до умов середовища, що обмежувало їхнє широке застосування. Справжній технологічний прорив відбувся у 1997 році. Дві незалежні групи дослідників запропонували методику ковалентного поєднання мРНК та пептиду, що докорінно змінило ландшафт спрямованої еволюції білків. Річард Робертс та Джек Шостак з Гарвардського

університету описали використання пуроміцину – антибіотика, що імітує структуру аміноацильованої тРНК – для створення стабільного зв'язку між мРНК та білком (Roberts, 1997). Ця технологія дозволила ідентифікувати епітоп тус з абсолютно рандомної бібліотеки, продемонструвавши високу роздільну здатність методу. Майже одночасно Наото Немото та колеги представили концепцію «*in vitro virus*» (IVV), яка базувалася на аналогічному принципі, але використовувала дещо іншу архітектуру лінкера (Nemoto, 1997). Розвиток мРНК-дисплею став відповіддю на обмеження фагового дисплею, зокрема на проблему «пляшкового горла» трансформації бактерій. Традиційні клітинні методи дисплею обмежені ефективністю проникнення ДНК у клітину-господаря, що фіксує максимальний розмір бібліотеки на рівні приблизно 10^9 варіантів. Перехід до повністю безклітинних систем дозволив дослідникам оперувати бібліотеками розміром до 10^{13} - 10^{15} унікальних послідовностей (Wilson, 2001). Протягом наступних десятиліть технологія еволюціонувала в бік підвищення стабільності через впровадження кДНК-дисплею (Yamaguchi, 2009) та розширення хімічної різноманітності за рахунок некананічних амінокислот.

Фундаментом мРНК-дисплею є здатність пуроміцину, природного амінонуклеозидного антибіотика, діяти як структурний аналог 3'-кінця аміноацильованої тирозил-тРНК. Пуроміцин складається з модифікованого аденозину, ковалентно пов'язаного через стабільний амідний зв'язок з О-метилтирозином (Aviner, 2020). Ця стабільність є ключовою перевагою порівняно з природними тРНК, де амінокислота приєднана лабільним естерним зв'язком, схильним до швидкого гідролізу. Процес формування мРНК-пептидного кон'югата відбувається безпосередньо в рибосомі під час трансляції. Матрична РНК, яка використовується в дисплеї, заздалегідь модифікується на 3'-кінці шляхом приєднання ДНК-лінкеру з пуроміциновим залишком. Під час трансляції, коли рибосома досягає межі між РНК та ДНК-сегментом, вона зупиняється через відсутність подальших кодонів та

присутність ДНК-спейсера. У цей момент пуроміцин, завдяки своїй схожості з тРНК, входить у А-сайт рибосоми (Takahashi, 2003). Вільна аміногрупа пуроміцину атакує карбонільний вуглець пептидил-тРНК у Р-сайті, що призводить до перенесення синтезованого пептидного ланцюга на пуроміцин. Цей процес, відомий як пуроміцилювання, завершується утворенням міцного ковалентного амідного зв'язку. Важливим фактором ефективності є архітектура лінкерного містка. Лінкер повинен бути достатньо довгим і гнучким (зазвичай використовують сегменти поліетиленгліколю або його похідні), щоб забезпечити вільний доступ пуроміцину до активного центру рибосоми (Liu, 2000). Крім того, лінкер часто містить додаткові функціональні групи, такі як флуоресцентні мітки для детекції або біотин для швидкого очищення комплексів за допомогою стрептавідин-біотинової взаємодії. Стійкість утвореного зв'язку дозволяє очищати кон'югати від рибосом та інших компонентів лізату, що значно знижує фоновий шум під час афінної селекції.

Розуміння переваг мРНК-дисплею вимагає детального порівняння з іншими широко вживаними системами, такими як фаговий, рибосомний та дріжджовий дисплей. Кожна з цих технологій має свою нішу, але мРНК-дисплей виділяється за декількома критичними параметрами. Фаговий дисплей, розроблений Джорджем Смітом у 1985 році, є «золотим стандартом» для відбору антитіл, але він має суттєві обмеження (Smith, 1985). Оскільки фаговий дисплей є системою *in vivo*, розмір його бібліотеки обмежений ефективністю трансформації бактеріальних клітин (зазвичай порядку 10^9 варіантів). Натомість мРНК-дисплей, будучи повністю безклітинним процесом, дозволяє створювати бібліотеки, що містять 10^{13} - 10^{15} унікальних послідовностей (Kamalinia, 2021). Це дає можливість ідентифікувати надзвичайно рідкісні варіанти з афінністю в пікомолярному діапазоні, які просто відсутні в менших бібліотеках. Крім того, бактеріальна система

експресії фагів накладає обмеження на типи білків, що можуть бути відображені. Складні еукаріотичні білки часто не можуть правильно згорнутися або пройти посттрансляційну модифікацію в *E. coli*. мРНК-дисплей використовує еукаріотичні лізати (наприклад, лізат ретикулоцитів кролика), що дозволяє відображати білки з правильним фолдингом та функціональністю.

Рибосомний дисплей також є безклітинною технологією і підтримує бібліотеки високої складності. Проте він базується на нековалентному зв'язку між мРНК, рибосомою та пептидом (Plückthun, 1997). Це вимагає проведення селекції в умовах, що запобігають дисоціації рибосоми (низькі температури, висока концентрація магнію). мРНК-дисплей завдяки ковалентному пуроміциновому зв'язку є набагато стабільнішим (Newton, 2020). Це дозволяє використовувати агресивні умови промивання, детергенти та високу температуру для зменшення фонового зв'язування, що забезпечує «чистішу» селекцію (Liu, 2011; Wang, 2011).

Переваги мРНК-дисплею виходять далеко за межі простого збільшення розміру бібліотек. Це гнучка платформа, що дозволяє вирішувати завдання, недоступні для класичних методів біології. Однією з найбільш захоплюючих переваг мРНК-дисплею є можливість включення неканонічних амінокислот (NCAAs) у пептидний ланцюг під час трансляції. Використання систем, таких як PURE (Protein synthesis Using Recombinant Elements), дозволяє створювати «дизайнерські» бібліотеки з модифікованими амінокислотами, що містять флуорофори, реакційноздатні групи або D-амінокислоти (Whittaker, 2012). Це відкриває шлях до створення макроциклічних пептидів, які мають виняткову стабільність до протеолізу та високу мембранну проникність, що робить їх ідеальними кандидатами на роль лікарських засобів. Завдяки стабільності зв'язку між генотипом і фенотипом, мРНК-дисплей дозволяє здійснювати селекцію за умов, що імітують складне патологічне середовище. Дослідники можуть

використовувати різні рівні рН, температури, присутність сироватки крові або специфічних метаболітів. Це мінімізує кількість хибнопозитивних результатів, які часто виникають у менш стабільних системах через неспецифічне зв'язання. Крім того, невеликий розмір пуроміцинового лінкера порівняно з цілою рибосомою або фаговою часткою значно зменшує стеричні перешкоди під час взаємодії пептиду з мішенню. Незважаючи на потужність мРНК-дисплею, його ахіллесовою п'ятою є лабільність самої молекули мРНК. РНК чутлива до деградації рибонуклеазами, які часто присутні у біологічних зразках або клітинних лізатах. Для вирішення цієї проблеми було розроблено технологію кДНК-дисплею (Yamaguchi, 2009). У цій модифікації одразу після трансляції та формування мРНК-пептидного зв'язку проводиться зворотна транскрипція для синтезу комплементарної ДНК (кДНК). Це призводить до утворення гетеродуплексу мРНК/кДНК, який є значно стійкішим до дії нуклеаз. Крім того, кДНК-дисплей дозволяє уникнути небажаної селекції РНК-аптамерів – молекул РНК, які можуть самостійно зв'язуватися з білковою мішенню завдяки своїй вторинній структурі, тим самим створюючи перешкоди для відбору пептидних лігандів. Використання розгалужених лінкерів, що містять псораленові групи для фото-крослінкінгу або специфічні аміно-модифікатори, дозволяє досягти виходів кон'югації понад 90%, що критично для збереження різноманітності бібліотеки (Mochizuki, 2011).

Одним із найбільш значущих трендів останнього п'ятиріччя є прагнення перенести потужність мРНК-дисплею безпосередньо в живі клітини. Традиційний мРНК-дисплей стикається з серйозними викликами в умовах *in vivo*: пуроміцин є цитотоксичним антибіотиком, а мРНК-пуроміцинові кон'югати нестабільні в цитоплазмі (Aviner, 2020). Для подолання цих бар'єрів було запропоновано альтернативні стратегії, що не потребують пуроміцину. У 2020 році П. Ойконому та його колеги опублікували роботу, яка започаткувала еру справжнього *in vivo*

мРНК-дисплею (Oikonomou, 2020). Замість використання хімічного термінатора трансляції, вони застосували високоафінну білок-РНК взаємодію між оболонковим білком бактеріофага MS2 (MCP) та специфічною РНК-шпилькою (stem-loop). У цій системі білок інтересу експресується як фузія з MCP, а його мРНК містить MS2-шпильки в 3'-нетрансльованій області. Одразу після синтезу білок MCP розпізнає та міцно зв'язується зі своєю власною мРНК. Такий комплекс генотип-фенотип формується в природному середовищі клітини, що дозволяє білкам проходити нативний фолдинг, локалізуватися в органелах та взаємодіяти з природними партнерами. Ця технологія докорінно змінює підхід до масштабних протеомних досліджень. Традиційна мас-спектрометрія має обмеження щодо чутливості та швидкості аналізу великих популяцій клітин. *In vivo* мРНК-дисплей перетворює ідентифікацію білків на задачу секвенування нуклеїнових кислот. Оскільки кожен білок ковалентно або квазі-ковалентно (через MCP) пов'язаний зі своєю мРНК, достатньо провести афінне збагачення комплексів та відправити РНК на високопродуктивне секвенування. Такий підхід дозволяє: картувати білок-білкові взаємодії з високою роздільною здатністю, ідентифікуючи навіть слабкі або транзійтні контакти в нативному контексті; визначати субклітинну локалізацію тисяч білків одночасно через фракціонування клітин та наступне секвенування зв'язаних РНК; вивчати динаміку протеому у відповідь на ліки або патогени без необхідності складної підготовки зразків для мас-спектрометрії.

1.2. Сучасні підходи до фракціонування та аналітичного контролю якості синтетичних нуклеїнових кислот

Процес отримання синтетичних олігонуклеотидів є складним ітеративним циклом, де покроковий вихід на кожній стадії, хоч і перевищує

98 %, все ж призводить до прогресивного накопичення значної кількості побічних продуктів зі збільшенням довжини ланцюга (Sanghvi, 2019). Навіть при високій ефективності коуплінгу у 99 % теоретичний вихід цільового 50-мера становить лише близько 61 %, що робить очищення критичним етапом у виробництві терапевтичних нуклеїнових кислот (Abe, 2025). Наявність домішок, таких як вкорочені форми, що виникають через неповне приєднання мономерів, послідовності з внутрішніми делеціями або хімічні аддукти, може суттєво впливати на біологічну активність, специфічність та токсичність кінцевого продукту (Anderson, 2022). Очищення та аналітичний контроль олігонуклеотидів є не окремими етапами, а єдиною технологічною системою, оскільки вибір способу очищення безпосередньо визначається природою домішок, які утворюються під час твердофазного синтезу, деблокування та подальших маніпуляцій із продуктом. У сирому продукті зазвичай присутні n-1, n-2 та інші укорочені послідовності, продукти депуринації, неповного деблокування, неповного сульфуровання або десульфуровання, ізомерні та діастереомерні варіанти, а також нековалентно зв'язані солі й залишки реагентів. Через це «чистота» олігонуклеотиду не зводиться лише до частки повнорозмірного продукту: для коректної оцінки потрібно одночасно враховувати довжину, послідовність, модифікації цукрово-фосфатного скелету, наявність захисних груп, ступінь десольватації та структурний стан молекули. Саме тому в сучасній практиці очищення розглядають не як механічне видалення домішок, а як селективне виділення цільового компонента з подальшим підтвердженням його ідентичності та профілю споріднених речовин методами ортогональної аналітики (Caraldi, 2017; El Zahar, 2018; Goyon, 2020; Pourshahian, 2021).

Найпростішими підходами після відщеплення олігонуклеотиду від носія є осадження, знесолення та твердофазна екстракція, зокрема класичне «trityl-on»-очищення на оберненофазних картриджах. Принцип такого очищення базується на різниці гідрофобності між повнорозмірним

продуктом, який зберігає 5'-кінцеву DMT-групу, і більшістю укорочених фрагментів із вільним 5'-гідроксилем, тому метод є швидким, технологічно простим і зручним для рутинної роботи з невеликими синтезами. Водночас його селективність обмежена: якщо домішки мають близькі гідрофобні властивості або якщо в ході деблокування утворюються депуриновані DMT-вмісні укорочені фрагменти, вони можуть співочищуватися з цільовим продуктом. Саме це особливо критично для довших олігонуклеотидів, де депуринація та подальший розрив ланцюга вже не є поодиноким артефактом, а реальною причиною хибно завищеної “чистоти” після картриджного очищення. Денатуруюча PAGE забезпечує значно вищу роздільну здатність щодо різниці в одну нуклеотидну ланку і тому залишається корисною для складних коротких ДНК та РНК, але її недоліки очевидні: низька масштабованість, значні втрати матеріалу, тривалість процедури та незручність для GMP-орієнтованого або напівпрепаративного процесу. Тому такі підходи доцільні переважно як швидке попереднє очищення або як допоміжні методи, але не як універсальне рішення для отримання субстанції високої якості (Horn 1988; Gilar, 2000; Ellington, 2001; Minkner, 2022).

Найбільш універсальним хроматографічним підходом для очищення й одночасної аналітики синтетичних олігонуклеотидів тривалий час залишається іон-парна оберненофазна ВЕРХ. У цій системі аніонний остов олігонуклеотиду утворює іонну пару з легкою алкіламінною основою, після чого сумарний комплекс утримується на гідрофобній стаціонарній фазі; таким чином розділення визначається не лише довжиною ланцюга, а й послідовністю, типом модифікацій, ступенем гідрофобності та, частково, конформаційним станом молекули. Практична перевага методу полягає в тому, що він придатний як для аналітичних, так і для напівпрепаративних задач, дозволяє працювати з широким діапазоном довжин і сумісний з УФ-детекцією та мас-спектрометрією за умови використання легких буферних систем. Класичним кроком у розвитку LC–MS для

олігонуклеотидів стало впровадження систем на основі фторованих спиртів, насамперед HFIP, що різко покращило електроспрей-іонізацію і зробило можливим рутинне визначення точної молекулярної маси. Однак саме цей підхід має й принципові обмеження: іон-парні реагенти можуть знижувати чутливість MS, викликати забруднення або нестабільність системи, ускладнювати переналаштування приладу на інші аналіти, а також сприяти утворенню складних багатозарядних спектрів із металевими аддуктами. Крім того, для фосфоротіоатних олігонуклеотидів обернено-фазна рідинна хроматографія з іон-парним реагентом не завжди достатньо селективна щодо діастереомерних або дуже близьких за хімією домішок, тому її можливості, хоч і великі, не слід переоцінювати (Gilar, 2001; Huber, 2001; Birdsall, 2016; Liu, 2022).

Ортогональним до оберненофазного підходу є аніонообмінна хроматографія (anion exchange chromatography, AEX), в якій розділення визначається силою електростатичної взаємодії між негативно зарядженим олігонуклеотидом і позитивно зарядженою стаціонарною фазою. Її основна цінність полягає в іншій селективності: те, що співелює в IP-RP, може добре розділятися в AEX, особливо коли йдеться про варіанти довжини, ступінь заміщення фосфатних груп, нессульфуровані домішки або інші споріднені речовини, для яких зарядовий внесок є критичнішим за гідрофобний. Крім того, AEX є привабливою для препаративного масштабу завдяки високій питомій ємності носіїв й відносній технологічній стабільності. Її головний недолік очевидний: елюювання часто вимагає високих концентрацій нелетких солей, що практично виключає пряме сполучення з мас-спектрометром. Саме тому в останні роки особливого значення набули двовимірні схеми, в яких перший вимір виконується в IP-RP або AEX, а другий – у HILIC або іншому MS-сумісному режимі, що одночасно забезпечує знесолення і покращує виявлення домішок низького рівня. Паралельно з хроматографією важливу роль у контролі якості зберігає

капілярний електрофорез, зокрема капілярний гель-електрофорез, який характеризується дуже високою ефективністю, малими витратами зразка і придатний для аналізу ASO, siRNA, mRNA та інших терапевтичних нуклеїнових кислот, хоча як препаративний метод він практично не використовується (Cook, 2011; Goyon, 2020; Wei, 2022).

Гідрофільна взаємодійна хроматографія останнім часом розглядається не як екзотична альтернатива, а як повноцінний інструмент аналізу олігонуклеотидів, особливо тоді, коли потрібна сумісність із MS без класичних іон-парних систем. Її перевага полягає в іншому порядку елювання й іншому механізмі утримування, завдяки чому HILIC може розв'язувати ті аналітичні задачі, де IP-RP виявляється недостатньо вибірковою. Це особливо помітно для фосфоротіатних послідовностей, guide RNA та інших модифікованих олігонуклеотидів, де HILIC здатна краще виявляти окремі діастереомерні або близькі за структурою домішки. Разом із тим HILIC поки що складніша в перенесенні між різними системами, сильніше залежить від складу рухомої фази, солі, температури та природи стаціонарної фази, а її механізм утримування для великих поліаніонів не можна вважати повністю тривіальним. Окреме місце займає SEC, яка зазвичай не є головним методом для очищення повнорозмірного продукту від n-1 домішок, але корисна для оцінки вищих структур, агрегатів, ступеня дуплексації та загального конформаційного стану; для фосфоротіатних олігонуклеотидів, однак, навіть SEC може демонструвати широкі піки через додаткові взаємодії з пакуванням колонки. Отже, HILIC і SEC радше розширюють аналітичний інструментарій, ніж замінюють класичні IP-RP та AEX (Shimoyama, 2017; Goyon, 2023; Lardeux, 2024).

На етапі аналітичного підтвердження якості олігонуклеотиду лише хроматографічного профілю недостатньо. УФ-детекція, зазвичай при 260 нм, є простою, відтворюваною та придатною для кількісної оцінки основного піка, однак вона не дає прямої структурної інформації й не розрізняє

співелюючі домішки однакової або близької оптичної відповіді. Тому LC–MS стала фактично основним методом підтвердження ідентичності, оскільки дає точну або високоточну масу, дозволяє будувати екстраговані іонні хроматограми для окремих компонентів, виконувати деконволюцію багатозарядних спектрів і, за потреби, застосовувати MS/MS для встановлення послідовності, локалізації модифікацій чи розмежування споріднених домішок (Sutton, 2020; Santos, 2021). Водночас якість мас-спектрометричних даних для олігонуклеотидів дуже чутлива до утворення натрієвих і калієвих аддуктів, до залишкових солей, до вибору іон-парного реагенту та навіть до неспецифічної адсорбції на металевих поверхнях хроматографічної системи. Для довгих або хімічно модифікованих послідовностей це може проявлятися у втраті сигналу, спотворенні пікової форми та заниженні рівня домішок, тому використання біоінертного тракту, контроль стану рухомої фази та ретельне десольовування є не другорядними технічними деталями, а необхідною частиною валідної методики. Звідси випливає практичний висновок: надійна оцінка якості синтетичних олігонуклеотидів повинна будуватися на ортогональному наборі методів, де швидке первинне очищення поєднується з високоселективною хроматографією, а встановлення тотожності та профілю домішок – з мас-спектрометричним підтвердженням (Pourshahian, 2021; Lardeux, 2022).

Фосфорамідитна хімія залишається найбільш широко вживаним підходом до синтезу олігонуклеотидів. Але широкий спектр домішок, які генеруються під час синтезу та подальшої обробки олігонуклеотидів, вимагають особливої уваги до вибору способів очищення та аналізу, зокрема в контексті багатоетапного синтезу складних біокон'югатів та використання у живих системах.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Хімічні реактиви та матеріали для синтезу

Усі фосфорамідити були розчинені в ацетонітрилі Honeywell (gradient grade, вміст води <30 ppm, Німеччина). Усі водні розчини готували з використанням води системи очищення Milli-Q (18.2 МΩ·см).

Реактиви, використані для фосфорамідитного синтезу олігонуклеотидів:

- Ацетонітрил CHROMASOLV™, gradient grade, for HPLC, ≥99.9% (Honeywell, Німеччина);
- 0,02 М розчин йоду в 70/20/10 тетрагідрофуран/піридин/вода (v/v) (Sigma-Aldrich, Німеччина);
- Cap A, 80/10/10 тетрагідрофуран/лутидин/ангідрид оцтової кислоти (v/v) (Sigma-Aldrich, Німеччина);
- Cap B, 80/20 ацетонітрил/N-метилімідазол (v/v) (Sigma-Aldrich, Німеччина);
- ЕТТ-активатор (Sigma-Aldrich, Німеччина);

фосфорамідити та твердофазні носії:

- dT-CE Phosphoramidite (Glen Research, США);
- dmf-dG-CE Phosphoramidite (Glen Research, США);
- Ac-dC-CE Phosphoramidite (Glen Research, США);
- dA-CE Phosphoramidite (Glen Research, США);
- Amino-Modifier C6 dT (Glen Research, США);
- Spacer Phosphoramidite 18 (Glen Research, США);
- DBCO-dT-CE Phosphoramidite (Glen Research, США);
- Solid Chemical Phosphorylation Reagent II (Glen Research, США);

- передзапаковані колонки: dG-CPG 1000, dA-CPG 1000, dT-CPG 1000, Puromycin-CPG (Glen Research, США).

Реактиви, використані для депротекції та знесолення олігонуклеотидів:

- 35 % водний розчин амоній гідроксиду (Sigma-Aldrich, Німеччина);
- реактив АМА (1:1 суміш 35 % водного розчину амоній гідроксиду та 40 % водного розчину метиламіну) (Sigma-Aldrich, Німеччина);
- 1-бутанол, gradient grade (Sigma-Aldrich, Німеччина);
- буфер ТЕ (10 мМ Трис-НСl, 1 мМ ЕДТА, рН 8.0) (самостійного приготування на основі Milli-Q води).

2.2. Використане обладнання

Фосфорамідитний синтез олігонуклеотидів здійснювали за допомогою автоматичного синтезатора DNA/RNA Synthesizer H-8 Standard (K&G Laborgeräte, Німеччина).

Осадження та знесолення продуктів після депротекції проводили з використанням вакуумної сушарки Concentrator Plus (Eppendorf, Німеччина).

Контроль кількості олігонуклеотидів здійснювали за допомогою спектрофотометричних вимірювань при $\lambda = 260$ нм на Multiskan Sky та μ Drop Plate (Thermo Fisher Scientific, США).

Аналіз чистоти та маси отриманих олігонуклеотидів проводили методом HILIC-MS, описаним нижче, на системі 1260 Infinity II HPLC, сполученій з детектором мас-спектрометра 6530 Q-TOF (Agilent Technologies, США).

Колонка для HILIC-MS: ACQUITY UPLC BEH Amide (Waters, США), розміри 2.1×100 мм, розмір частинок носія 1.7 мкм.

Хроматографічне очищення олігонуклеотидів методом IP-RP-HPLC здійснювали за допомогою системи 1260 Infinity HPLC із колектором фракцій аналітичного масштабу 1260-FC (Agilent Technologies, США)

Колонка для IP-RP-HPLC: Pursuit 5 C18, розміри 150 × 10 мм, розмір частинок носія 5 мкм.

2.3. Методи синтезу

Синтез здійснювався на синтезаторі нуклеїнових кислот K&A H-8. Методи синтезу значно не відрізняються від добре описаних (Ellington, 2000) у літературі та є практично однаковими для усіх фосфорамідитів та послідовностей. Кепування ацетильними групами здійснювалося двічі за цикл, перед окисненням та після нього задля підвищення чистоти продукту. Час коуплінгу підбирався згідно рекомендацій виробника (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Тривалість коуплінгу фосфорамідитів

Мономери	Час коуплінгу, с
Amino-Modifier C6 dT	90
DBCO-dT-CE	900
dA, dT, dC, dG	45
Spacer 9, Spacer 18	190
Solid Chemical Phosphorylation Reagent II	720

Після депротекції проводили знесолення зразків шляхом осадження у н-бутанолі. До 200 мкл розчину олігонуклеотидів у депротекційному

середовищі додавали 1800 мкл 1-бутанолу (Sigma-Aldrich, США). Суміш інтенсивно змішували (вортексуванням) та центрифугували при 18000 g протягом 10 хв. Після цього надосадову рідину обережно видаляли, а осад, який містив олігонуклеотиди разом із частинками розчиненого скла, висушували у вакуумному концентраторі до повного видалення залишкових розчинників. Після висушування осад розчиняється у однократному буфері TE.

2.4. Синтез кон'югатів олігонуклеотидів з ПЕГ-лінкерами шляхом TFP-амінного приєднання та SPAAC-клік-хімії

У роботі було використано наступні реактиви:

- Azido-dPEG[®]₂₄-TFP ester (Vector Labs, США)
- Безводний ДМСО (Sigma-Aldrich, Німеччина)
- Ацетонітрил
- 100 мМ натрій-карбонатні буфери із додаванням 112мМ ЕДТА із рН 9.8, 10.5, 11.0, 11.4
- Вода MilliQ

Склад реакційної суміші для кон'югації наведено у табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Склад реакційної суміші для кон'югації із TFP-естером

Реактив	Об'єм, мкл
Розчин олігонуклеотиду у воді	100
TFP-PEG ₂₄ -DBCO, 15,7 мМ у ДМСО	80
100 мМ Натрій-карбонатний буфер із 112 мМ ЕДТА, рН 10.5	105

--	--

Продовження таблиці 2.2

Реактив	Об'єм, мкл
Ацетонітрил	160
Загальний об'єм	445

Реакційні суміші інкубувалися за 37°C протягом 3 годин. Після закінчення інкубації відбиралися аліквоти об'ємом 5 мкл для LCMS-характеризації. Зразки, що показали низький вихід, інкубувалися протягом 3 додаткових годин із додаванням 80 мкл розчину ПЕГ-лінкера. Після закінчення кон'югації зразки осаджувались із додаванням 4 мл бутанолу, перемішувалися за допомогою вортекса та центрифугувалися протягом 15 хвилин на 12400 g. Осад двічі промивався бутанолом та центрифугувався за таких самих умов. Після цього ми висушували зразки у концентраторі та розчиняли сухий осад у 200 мкл води.

2.5. Очищення кон'югатів із використанням обернено-фазної хроматографія з іон-парним реагентом (IP-RP)

Для виділення та фракціонування цільових олігонуклеотидних послідовностей було застосовано метод іон-парної обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії (IP-RP-HPLC). Процес здійснювали на напівпрепаративній колонці Pursuit 5 C18 (Agilent Technologies) з геометрією 150 × 10 мм та розміром часток сорбенту 5 мкм. Вибір даної нерухомої фази обумовлений необхідністю забезпечення високої ємності та роздільної здатності при роботі з великими об'ємами ін'єкцій. Під час

аналітичного циклу тиск у системі підтримували на рівні до 300 бар.

Хроматографічне розділення проводили в градієнтному режимі при швидкості потоку 3.0 мл/хв. Як мобільні фази використовували: фазу А – ацетонітрил високого ступеня чистоти (gradient grade, $\geq 99,9$ %, Sigma-Aldrich); фазу В – 100 мМ водний розчин триетиламоній ацетату (ТЕАА, рН 7.3). Робочий розчин фази В готували шляхом розведення 10-кратного стокового концентрату на ультрачистій воді (Milli-Q) з подальшою обов'язковою фільтрацією, дегазацією та зберіганням при температурі +4 °С для запобігання деградації іон-парного агента. Попередню підготовку зразків проводили шляхом розведення аналітів до об'єму 200 мкл у буфері ТЕ.

Введення зразка в об'ємі 190 мкл здійснювали за допомогою автосамплера G2258А, налаштованого на швидкість набору та випуску 350 мкл/хв, із застосуванням процедури промивання голки (needle wash) для запобігання крос-контамінації. Профіль елюювання було оптимізовано для розділення цільового продукту та домішок: початковий стан системи (5 % А) змінювали згідно з наступним градієнтом: від 1 % до 85 % фази В протягом першої хвилини, з подальшим лінійним зростанням частки органічного розчинника (фаза А) до 40 % до 20.0 хв. Режим плато (40 % А) утримували до 22.0 хв, після чого систему повертали до початкових умов (5 % А) для стабілізації сорбенту. Загальний час методу становив 25 хв.

Детекцію елюату здійснювали за допомогою варіабельного хвильового детектора (VWD) при довжині хвилі 260 нм. Параметри детекції включали ширину піку 0.05 хв та час відгуку 1 с (частота 5 Гц). Збір очищених фракцій виконували в автоматичному режимі за допомогою колектора G1364С. Алгоритм фракціонування було налаштовано на детекцію піків за пороговим значенням інтенсивності сигналу (мінімум 200 mAU) та мінімальним схилом піку (5 mAU/c), що забезпечувало прецизійне відсікання цільової фракції.

Максимальний об'єм кожної відібраної фракції було обмежено до 500 мкл для полегшення подальшої ліофілізації та концентрації продукту.

2.6. Рідинна хроматографія з гідрофільною взаємодією (HILIC)

Для аналізу та верифікації чистоти синтезованих сполук було застосовано метод обернено-фазової хроматографії (HILIC/RP-режим) з використанням системи Agilent 1260 Infinity II, інтегрованої з детекторами високої роздільної здатності. Хроматографічне розділення здійснювали на аналітичній колонці ACQUITY UPLC BEH Amide (Waters, США) з параметрами 2.1×100 мм та розміром часток сорбенту 1.7 мкм. Для забезпечення стабільності часу утримування та оптимізації кінетики масообміну колонку термостатували при температурі 60 °C (модуль G7116B, Agilent Technologies). Робочий тиск у системі під час аналітичного циклу сягав 570 бар.

Елюювання проводили у градієнтному режимі при постійній швидкості потоку 0.400 мл/хв. Як мобільну фазу А використовували 30 мМ розчин амонію ацетату (рН 5.3) з додаванням 10 % ацетонітрилу (v/v), приготований на ультрачистій воді (Milli-Q). Рухома фаза В була представлена ацетонітрилом ступеня чистоти «gradient grade» (Sigma-Aldrich, Франція). Перед використанням водну фазу піддавали фільтрації та дегазації. Схема градієнта була оптимізована для розділення складних сумішей олігонуклеотидів: початковий склад елюенту (45 % А / 55 % В) утримували протягом перших 0.5 хв, після чого здійснювали перехід до співвідношення 22 % А / 78 % В до 7.20 хв. Даний склад залишався незмінним до 8.20 хв, після чого систему повертали до вихідних умов для регенерації сорбенту. Загальна тривалість одного аналітичного циклу становила 15 хв.

Введення зразка здійснювали за допомогою автосамплера G1329B в

об'ємі 40 мкл із застосуванням процедури промивання голки (needle wash) для мінімізації ефекту перенесення. Перед ін'єкцією зразки попередньо розводили у співвідношенні 1:10 сумішшю фази А та ацетонітрилу (35:65). Спектрофотометричну детекцію проводили за допомогою DAD-детектора, де основним каналом було обрано довжину хвилі 260 нм. Параметри детекції включали ширину піку 0.05 хв та час відгуку 1 с (частота 5 Гц).

Мас-спектрометричну ідентифікацію виконували на квадруполь-часпролітному детекторі 6530 Q-TOF з іонізацією в електроспреї (Dual AJS ESI, джерело Agilent JetStream). Детекцію проводили у режимі реєстрації негативних іонів у діапазоні мас від 100 до 3200 m/z. Для забезпечення високої точності визначення маси та розширення динамічного діапазону (Extended Dynamic Range) було встановлено частоту АЦП 2 GHz при швидкості збору даних 2 спектри/с. Параметри іонного джерела були оптимізовані наступним чином: капілярна напруга – 3500 В, напруга на форсунці газу обтискання (sheath gas nozzle) – 2000 В, тиск на небулайзері – 40 psi. Температурні та потокові режими газів осушення (drying gas) та обтискання (sheath gas) становили 275°C (12 л/хв) та 325°C (10 л/хв) відповідно. Напруга на фрагментаторі становила 200 В. Калібрування системи проводили за процедурою Swarm Autotune з використанням стандартної суміші ESI-L LCMS Tuning Mix (Agilent) у режимі зовнішнього калібрування.

2.7. Обробка даних за допомогою програмного забезпечення BioConfirm (Agilent MassHunter, версія B.08.00)

Тип аналізу: Intact MS - Oligonucleotide

Метод: BioConfirmOligo-Default.m

Тип workflow: Intact Protein (адаптовано під олігонуклеотиди)

Параметри екстракції спектрів:

- Використовувати всі скани MS (MS level: All), негативна полярність.
- m/z-діапазон: 900–3200.

Зарядова деконволюція для зарядних кластерів олігонуклеотидів проводилася з використанням алгоритму деконволюції з максимізацією ентропії.

Параметри зарядової деконволюції:

- Діапазон мас: 6000–20000 Да (якщо не вказано інакше)
- Крок деконволюції: 0.5 Да
- Діапазон мас для деконволюції: 900-3200 Да
- Фільтрація базової лінії: 3
- Ширина ізотопного кластеру: Автоматично
- Обмеження лише на найінтенсивніші 100 піків
- Розрахунок точної маси: лише 75% найінтенсивніших піків кластеру

Отримані спектри нейтральних мас анотувалися з використанням вбудованих інструментів анотації спектрів AgilentBioConfirm B.08.00.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Синтетична бібліотека лінкерів розгалуженої архітектури для мРНК-дисплею *in vivo*

У рамках даного дослідження було обрано набір пуроміцинових лінкерів розгалуженої архітектури (табл. 3.1) для синтезу та подальшої оптимізації умов їх використання в мРНК-дисплеї. У класичній конфігурації мРНК-дисплею білок кон'югується безпосередньо зі своєю мРНК (Liu, 2000).

Інші варіанти лінкерів мають складнішу будову з точкою біфуркації та були розроблені для застосування в модифікованій технології, відомій як кДНК-дисплей (Yamaguchi, 2009). У цьому підході білок кон'югується не з мРНК, а з комплементарною ДНК (кДНК), синтезованою шляхом зворотної транскрипції мРНК. Для цього у склад олігонуклеотидів основних груп під час синтезу вводиться модифікований нуклеотид Amino-Modifier C₆ dT, у складі якого є бічна вуглеводнева «рука» із первинною аміногрупою. Ця аміногрупа має вступити у реакцію із TFP-естером одного з кінців біфункціонального ПЕГ-лінкера, утворюючи довгий спейсер між основною та бічними групами. Олігонуклеотид бічної групи DBCO-Puro містить так званий дибензоциклооктин (dibenzocyclooctyne, DBCO), який вступає у реакцію циклоприєднання із азидною групою іншого кінця ПЕГ-лінкера, утворюючи розгалужений олігонуклеотид.

Синтетична бібліотека олігонуклеотидів для мРНК-дисплею

Назва зразка	Ідентифікатор	Нуклеотидна послідовність, 5'→3'	Тип лінкера
RCCG-CCT	SID1937	(CCGCUCGA)CCCCGCCG CCCCCG(NH ₂ C ₆ dT)CCT	Розгалужений, У-лігування Rtcb-лігазою
RGUG-CCT	SID1938	(GUGGAUGA)CACGCCG ACTGATGGCAG(NH ₂ C ₆ dT))CCT	Розгалужений, У-лігування Rtcb-лігазою
pCC-CCT	SID1939	pCCGCTCGACCCCCGCCG CCCCCG(NH ₂ C ₆ dT)CCT	Розгалужений, У-лігування T4 РНК-лігазою
pCC-CTG	SID1940	pCCGCTCGACCCCCGCCG CCCCCG(NH ₂ C ₆ dT)CCTC TG	Розгалужений, У-лігування T4 РНК-лігазою
pCC-OMe- CCT	SID1941	pCCGCTCGA[C]C[C]CGC[C]GCC[C]CCC[G] (NH ₂ C ₆ dT)CCT	Розгалужений, У-лігування T4 РНК-лігазою
DBCO-Puro	SID1946	(DBCO-dT)TC(NH ₂ C ₆ dT) (Sp18)CCC-Puro	Група розгалуження

Для реалізації ефективного зв'язку між генотипом і фенотипом у технології мРНК-дисплею було розроблено два альтернативні дизайни основного ланцюга розгалужених лінкерів, кожен з яких втілює специфічну стратегію кон'югації з молекулами бібліотеки. Перша група конструкцій базується на використанні фосфорильованого 5'-кінця, що в присутності T4 РНК-лігази формує субстратну петлю для з'єднання з нативною 3'-гідроксогрупою рибози. Цей підхід, детально описаний у працях Наїмуддіна, (Naimuddin, 2016) є універсальним завдяки можливості залучення широкого спектра субстратів, включаючи химерні олігонуклеотиди, та відсутності потреби у попередній модифікації РНК, що робить його оптимальним для роботи з клітинними мРНК-бібліотеками. До цієї групи належать зразки рСС-ССТ, рСС-СТG та рСС-ОМе-ССТ, які містять функціональний AminoModifierC6-dT у 24-й позиції для подальшого ковалентного поєднання з групою розгалуження через біфункціональний лінкер.

Друга стратегія передбачає використання олігонуклеотидів із коротким 5'-кінцевим РНК-фрагментом, які при гібридизації до РНК із циклічним 3'-фосфатом створюють умови для роботи лігази RtcB. Застосування цього ферменту має суттєві переваги над фаговими лігазами, зокрема через швидку кінетику, довший час життя інтермедіату та здатність ефективно лігувати послідовності зі складною вторинною структурою без ризику конкатемеризації. Оскільки лігази типу RtcB експресуються майже всіма типами еукаріотичних клітин, такі конструкції відкривають перспективи для кон'югації безпосередньо в умовах *in vivo*, що наразі є малодослідженим напрямком. Представниками цієї групи є зразки RCCG-ССТ та RGUG-ССТ, де восьминуклеотидний РНК-фрагмент слугує субстратом для лігації, а модифікований дезоксиурацил забезпечує точку біфуркації. При цьому дизайн RGUG-ССТ спеціально адаптований для гібридизації з елементами рибозима Twister P1, що використовується для природного процесингу РНК.

Паралельно з вибором ферментативної стратегії було досліджено вплив геометричних параметрів лінкера на термінацію трансляції та ефективність праймінгу кДНК. Для цього в конструкціях під T4 РНК-лігазу передбачено два варіанти довжини фрагмента до точки розгалуження: короткий у три нуклеотиди для зразка рСС-ССТ та подовжений до шести нуклеотидів для рСС-СТG. Така варіація доступного простору дозволяє експериментально оцінити, наскільки дистанція до точки біфуркації впливає на здатність пуроміцину адаптуватися в активному центрі трансляційного комплексу.

Окремим критичним аспектом розробки став захист кон'югатів від внутрішньоклітинних нуклеаз, оскільки збереження гібридизації між ДНК лінкера та РНК бібліотеки створює субстрат для активності РНКаз типу H, що загрожує втратою асоціації між кодуючою послідовністю та білком. Для нівелювання цього ризику було застосовано стратегію часткової модифікації ДНК-ланцюга 2'-O-метильними групами, які перешкоджають продуктивному зв'язуванню ферменту з дуплексом. З цією метою синтезовано модифікований варіант основного ланцюга рСС-ОМе-ССТ, де кожен третій нуклеотид у критичних позиціях замінено на його метильований аналог. Така щільність модифікацій, згідно з актуальними даними Кондо, забезпечує повне інгібування РНКаз H при збереженні біологічної функціональності всієї лінкерної конструкції (Kondo, 2020).

3.2. Оптимізація лужних умов для забезпечення стабільності РНК в умовах кон'югації із TFP-естерами

У протоколах та статтях наводяться відносно м'які умови для кон'югації TFP-естерів та NHS-естерів в межах рН 8.0 - 9.0, але це пов'язано із типовим використанням для білків, які можуть денатурувати у більш жорстких умовах. Але більш вигідна кінетика реакції взаємодії TFP-естерів

та первинних амінів досягається за більш високих рівней рН, і попередні дослідження із схожими субстратами дійсно показали кращі виходи за рН 11.0. Під час таких реакцій кон'югації TFP-вмісні молекули зачасту додаються у надлишку, який у більшості вичерпується під час спонтанного гідролізу. Рибонуклеїнові кислоти, на відміну від ДНК, мають високореактивну 2'-гідроксогрупу, через яку у лужних умовах реалізовується каталіз спонтанного гідролізу фосфодієфірного зв'язку. Оскільки пуроміцинові лінкери, підібрані для лігування Rtcb-лігазою, мають короткий кінцевий РНК-фрагмент, було поставлено задачу підібрати оптимальні умови для кон'югації. Основним фактором було обрано рН буферу для кон'югації, решту умов було запозичено з попередніх протоколів, оптимізованих для ДНК. Було прийнято рішення поставити дослід для виявлення стабільності РНК-вмісних для RGUG-ССТ із двома наборами умов: водне середовище із додаванням 7 % ДМСО (для відтворення додавання ПЕГ-лінкера, розчиненого у безводному ДМСО) - в якості контролю, та середовище із вищим відсотком органічних модифікаторів у вигляді 30 % ДМСО та 30 % ацетонітрилу, аналогічне тим, що раніше використовувались для кон'югації TFP-естерів.

Хроматографічний профіль між двома наведеними зразками є практично ідентичним. За умов використання буферу із рН 11.4 не спостерігається значимої деградації після 6 годин інкубації, що не відповідало нашим очікуванням (рис. 3.1).

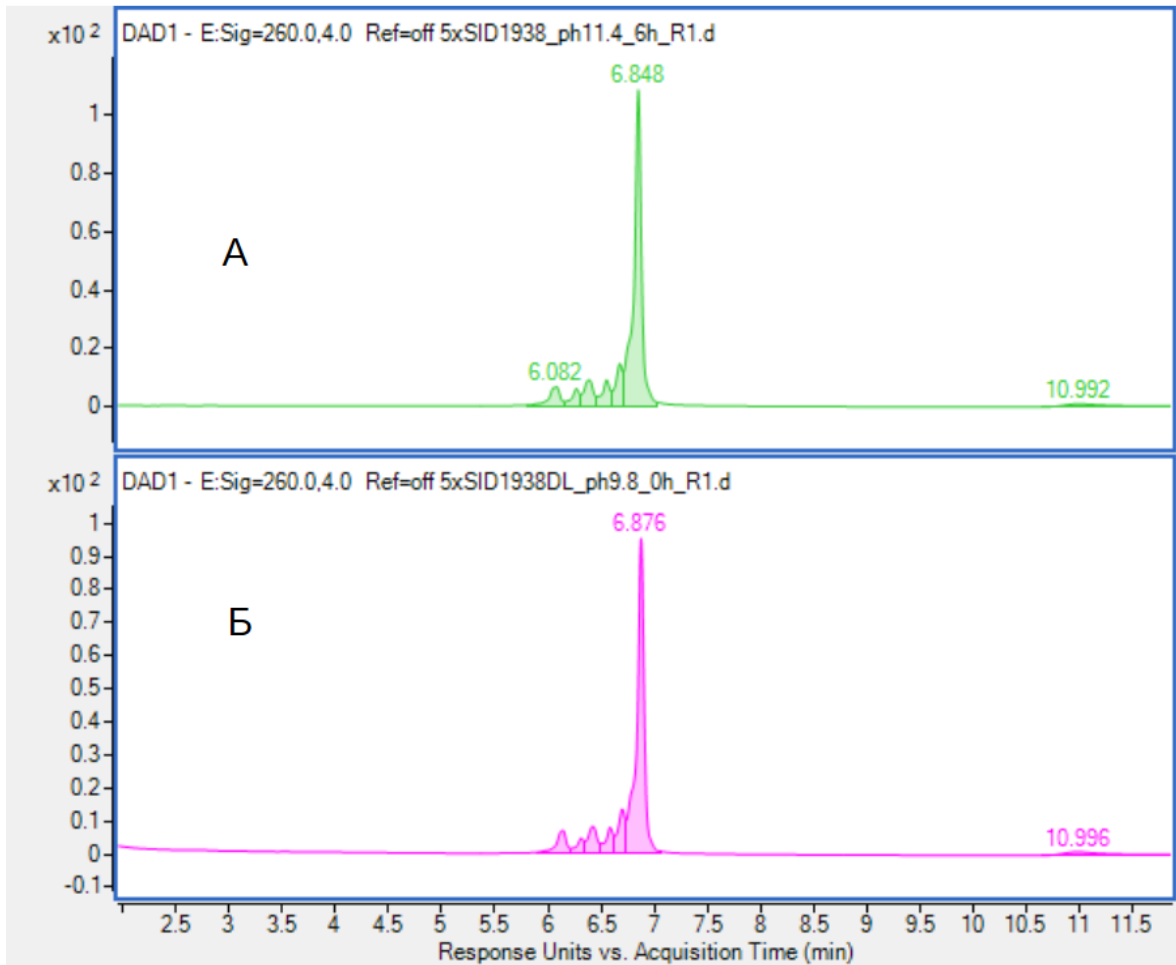


Рис. 3.1. Порівняння хроматограм розділення зразка RGUG-ССТ після інкубації протягом 6 годин за рН 11.4 (А) та до інкубації (Б) на колонці ACQUITY UPLC VEN Amide з використанням лінійного градієнту ацетонітрилу, рН 5.3, оптичне поглинання на $\lambda = 260$ нм

На усіх хроматограмах піки із часом елюції 6,8 хв відповідають олігонуклеотиду повної довжини, решта піків, що розділяються частково – вкорочені форми, утворені через недостатній покроковий вихід під час синтезу кінцевого фрагменту ДНК та втрати внаслідок спонтанного гідролізу. У випадку зразків із більшим вмістом органічного модифікатора, рівень рН 10.5, за якого після повної інкубації не спостерігається значимої деградації, є найвищим з випробуваних (рис. 3.2).

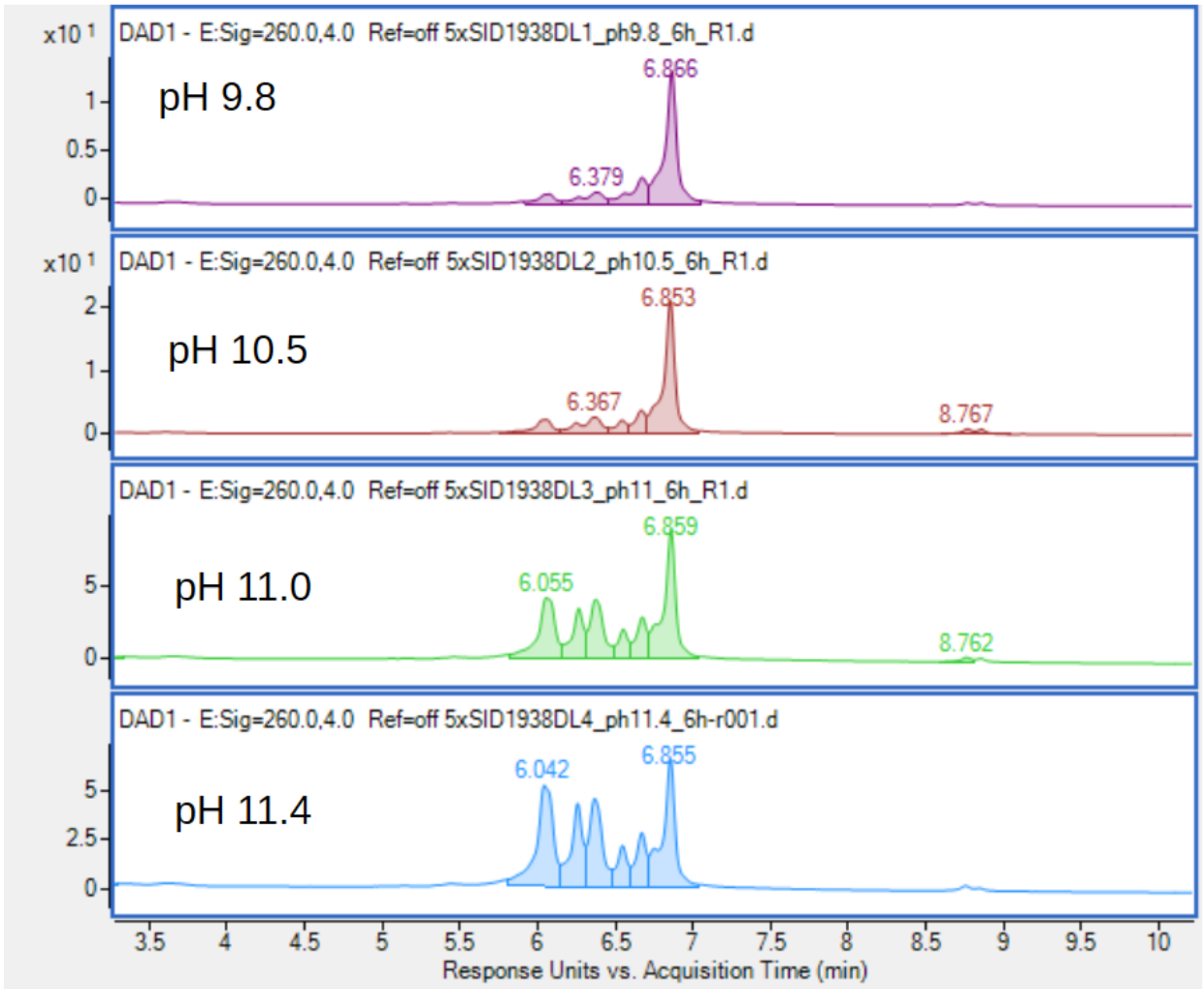


Рис. 3.2. Хроматограми розділення зразків RGUG-ССТ на колонці ACQUITY UPLC VEN Amide з використанням лінійного градієнту ацетонітрилу, рН 5.3, оптичне поглинання на $\lambda = 260$ нм за інкубації протягом 6 годин у буфері із високим вмістом органічних розчинників за різних рівней рН

За отриманими результатами було прийнято рішення проводити подальші реакції кон'югації TFP-естерів за рН 10.5. За таких умов активна первинна аміногрупа, що знаходиться на кінці «руки» Amino-Modifier C₆ dT є достатньо депротонованою (рКа 10.5-11), що має сприяти ефективній реакції.

3.3. Двоетапна кон'югація олігонуклеотидів основної групи із бічною пуроміциновою групою

3.3.1. Взаємодія із TFP-естером ацильного кінця ПЕГ-лінкера

У роботі М. Наймуддін (Naimuddin, 2016) галуження пуроміцинового лінкера досягається через синтез модифікованого олігонуклеотиду із азотистою основою, заблокованою альтернативною захисною групою. Такий підхід дозволяє синтезувати розгалужені полімери у один підхід, без кон'югації після кліведжа з носія. Але у такому випадку потрібний досить великий набір спеціалізованих реактивів. Тому у нашому утіленні галуження із бічним ланцюгом аналогічною довжини реалізовується у простіший спосіб. Основна група та група галуження сполучені через біфункціональний ПЕГ-лінкер, що на одному кінці містить TFP-естер для кон'югації із первинною аміногрупою основної групи, а на іншому – азидну групу для взаємодії із DBCO-залишком олігонуклеотиду бічної групи. Останні дві є стабільними за широкого спектра умов та ефективність їхнього зв'язування дозволяє високі відносні виходи, на відміну від TFP-естерів, які достатньо швидко гідролізують у водних умовах. Тому у першому етапі кон'югації проводилася реакція саме TFP-естеру та NH_2 -груп.

Реакцію проводили у умовах, обраних за результатами попереднього експерименту. З метою підтримання більш сталої концентрації інтактного лінкера, а значить, і збільшення виходу реакції та економії реактиву, ПЕГ-лінкер, попередньо розчинений у безводному ДМСО, розраховували додавати двома порціями – перед початком інкубації та у її запланованій середині. Після трьох годин інкубації перебіг реакції було оцінено за допомогою стандартного методу для LCMS-аналітики олігонуклеотидів. В

якості зразків ми брали аліквоти реакційних сумішей до осадження бутанолом.

Для RCCG-CCT та RGUG-CCT, що мають РНК-фрагменти, реакція кон'югації пройшла ефективно та після інкубації протягом 3 годин показали високий вихід та чистоту основного продукту від високомолекулярних домішок (див. RCCG-CCT на рис. 3.3, RGUG-CCT у додатку А).

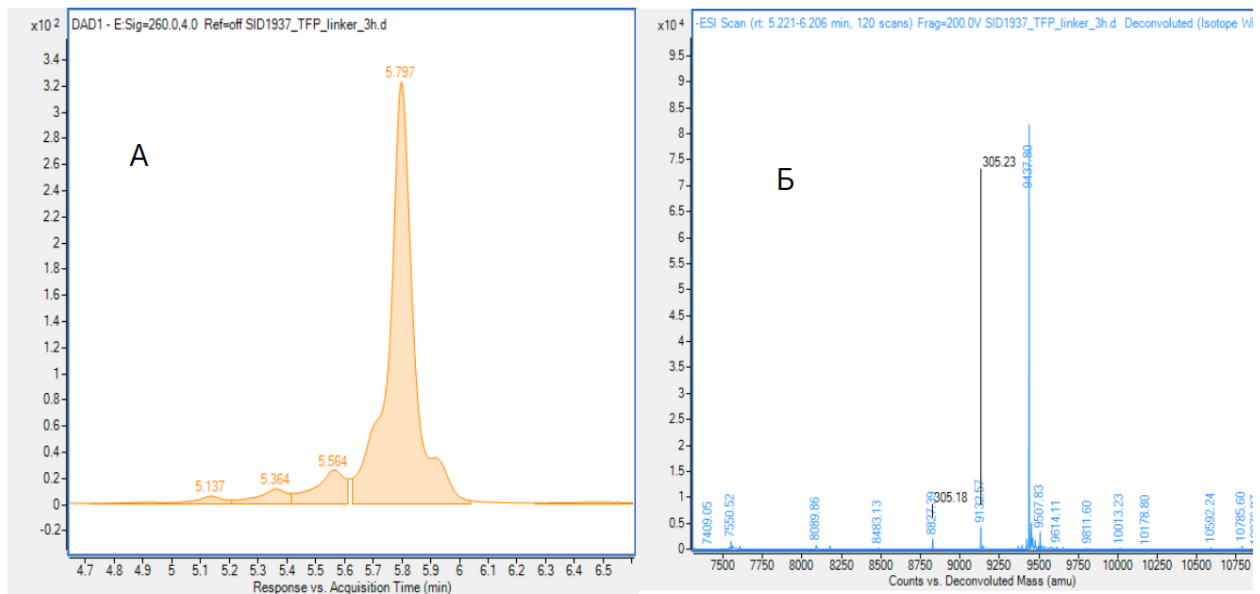


Рис. 3.3. LCMS-аналітика основного піка розділення зразку RCCG-CCT після кон'югації із ПЕГ-лінкером протягом 3 годин на колонці ACQUITY UPLC VEN Amide з використанням лінійного градієнту ацетонітрилу, рН 5.3,. А) DAD-хроматограма оптичного поглинання на $\lambda = 260$ нм. Б) Деконвольований мас-спектр основного піка. Мажорний пік 9437,8 Да відповідає продукту повної довжини, домішки із відхиленнями маси, кратними -305 Да, відповідають втраті кінцевих цитидинфосфатів

На наведених зображеннях профіль піків, що передують основному, та маси домішок вказують на те, що під час кон'югації РНК-фрагмент RCCG-CCT не було пошкоджено у значущій величині, як і очікувалося.

Для кон'югату рСС-СТГ із ПЕГ-лінкером основні результати наведено у рис. 3.4. Для трьох вищенаведених кон'югатів ми спостерігали кількісний вихід після першої половини інкубації, тому ми припинили кон'югацію та перейшли до їхнього очищення.

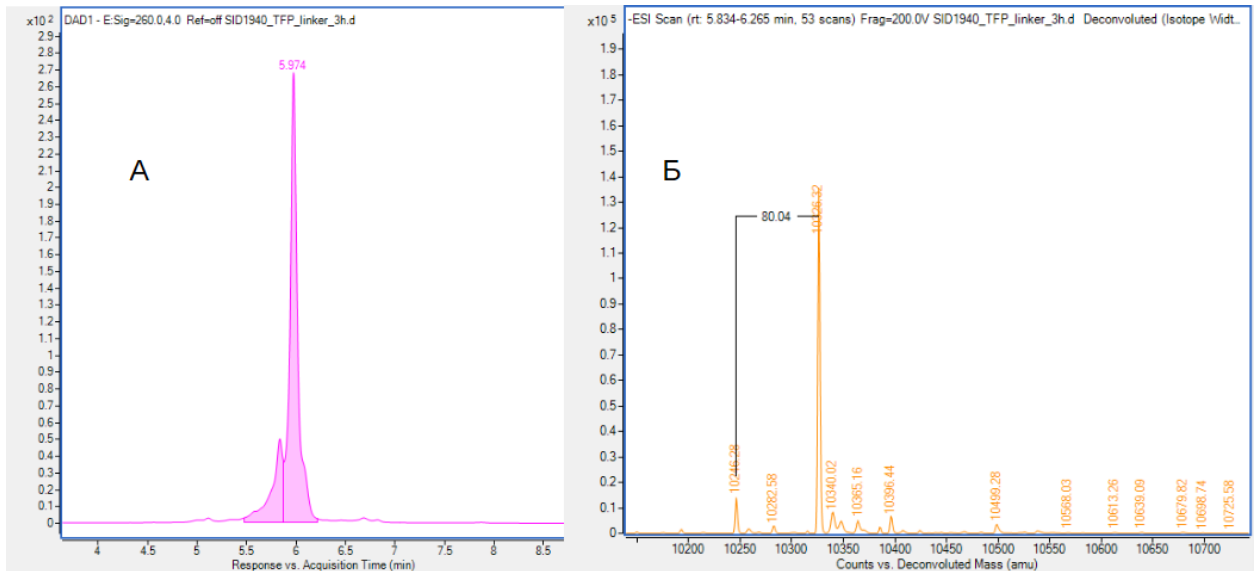


Рис. 3.4. LCMS-аналітика основного піка розділення зразку рСС-СТГ після кон'югації із ПЕГ-лінкером протягом 3 годин на колонці ACQUITY UPLC BEH Amide з використанням лінійного градієнту ацетонітрилу, рН 5.3, DAD-хроматограма оптичного поглинання на $\lambda = 260$ нм (А) та деконвольований мас-спектр основного піка (Б). Мажорний пік 10326,3 Да відповідає продукту повної довжини, домішка із відхиленням маси -80 Да відповідають втраті кінцевого фосфату

Ситуація відрізнялася для двох інших кон'югатів. Після першої інкубації рСС-ССТ та рСС-ОМе-ССТ показали практично нульові виходи під час LCMS-аналізу. Повне збереження інтактних олігонуклеотидів вказувало на те, що проблема була пов'язана не з внутрішньою модифікацією. Ми звернули увагу на дані елюції мертвого об'єму (рис. 3.5 для рСС-СТГ, для RGUG-ССТ та RCCG-ССТ дані не наведено), які зазвичай ігноруються під

час рутинної аналітики олігонуклеотидів, адже у стандартному методі усі олігонуклеотиди елюються пізніше. Пік високої інтенсивності відповідає продукту гідролізу ПЕГ-лінкера із втратою тетрафторфенільної групи. Усі три кон'югати із високим виходом включають таку домішку, що свідчить про неефективність осадження у бутанолі для видалення залишків непрореагованого або деградованого ПЕГ-лінкера.

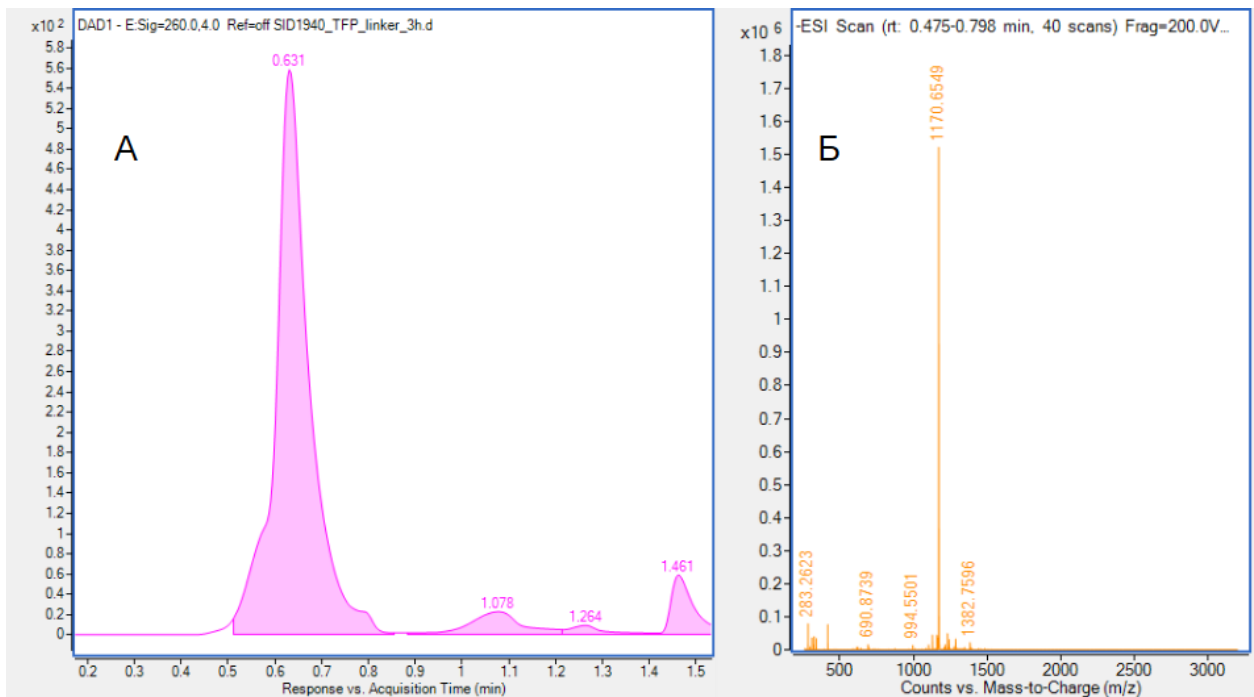


Рис. 3.5. LCMS-аналітика піка елюції мертвого об'єму розділення зразку рСС-СТГ після кон'югації із ПЕГ-лінкером протягом 3 годин на колонці ACQUITY UPLC VEN Amide з використанням лінійного градієнту ацетонітрилу, рН 5.3. DAD-хроматограма оптичного поглинання на $\lambda = 260$ нм (А) та деконвольований мас-спектр основного піка елюції мертвого об'єму (Б). Основному однозарядному кластеру 1170,6 Да відповідає продукт гідролізу ПЕГ-лінкера із втратою TFP-групи

Олігонуклеотиди рСС-СТГ, RGUG-ССТ та RCCG-ССТ були очищені за допомогою іонообмінної хроматографії перед першим етапом кон'югації.

Щодо рСС-ССТ та рСС-ОМе-ССТ, то після кон'югації із ПЕГ-лінкером, окрім основної домішки гідролізу лінкера, ми побачили важчу молекулу із дельтою маси +73,7 Да (рис. 3.6). Ці олігонуклеотиди були очищені лише знесоленням шляхом осадження у надлишку бутанолу. Ми припускаємо, що невизначена низькомолекулярна домішка вступає у реакцію із ПЕГ-лінкером, вичерпуючи його.

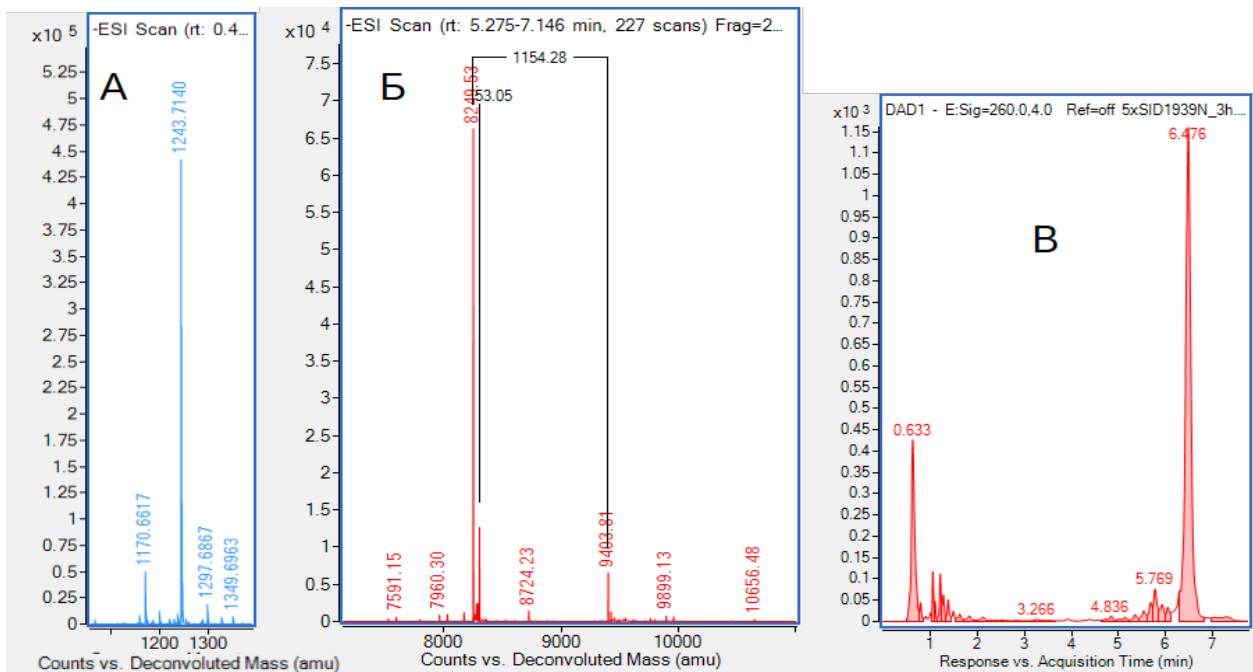


Рис. 3.6. LCMS-аналітика розділення зразку рСС-ССТ після кон'югації із ПЕГ-лінкером протягом 3 годин на колонці ACQUITY UPLC VEN Amide з використанням лінійного градієнту ацетонітрилу, рН 5.3. Деконвольований мас-спектр основного піка елюції мертвого об'єму (А). Основному кластеру 1170,6 Да відповідає продукт гідролізу ПЕГ-лінкера. Деконвольований мас-спектр основного кластера піків олігонуклеотидів (Б). Молекулі із інтактною масою 8249,7 Да відповідає інтактний олігонуклеотид, продукт із дельтою маси +1154,2 Да є кон'югатом із ПЕГ-лінкером DAD-хроматограма оптичного поглинання на $\lambda = 260$ нм (В)

Порівнявши масу адукту із масами протекційних груп, що утворюються у процесі синтезу та депротекції олігонуклеотидів, ми не змогли ідентифікувати цей конкурентний нуклеофіл. Незважаючи на неповні дані, ми можемо зробити однозначний висновок, що очищення олігонуклеотидів знесоленням є недостатнім для усунення домішок, несприятливих для кон'югації із TFP-естерами. Є доречною аніонообмінна хроматографія із використанням рухомої фази на основі солей лужних металів, а також у майбутніх ітераціях варто дослідити можливість переосадження у надлишку солі з метою заміни контрйонів на такі, що інтерферують з реакцією.

3.3.2. Кон'югація ПЕГ-лінкера із бічною пуроміциною групою шляхом азид-алкінового циклоприєднання

Наступною стадією отримання пуроміционних лінкерів розгалуженої архітектури є приєднання власне пуроміцин-вмісної бічної групи до ПЕГ-лінкера. Ми обрали для цього широко відомий підхід промотованого напруження алкінового кільця циклоприєднання. Ця реакція проходить із високою ефективністю за низьких концентрацій біомолекул та не вимагає додавання каталізаторів.

Пуроміцинова група DBCO-Puro (табл. 3.1), отримана в межах попередньої роботи має дуже низький рівень чистоти. Основним олігонуклеотидом у суміші є варіант із втратою кінцевої групи дезокситимидинфосфату, функціоналізованого дибензоциклооктиновим спейсером (DBCO-dT). Оскільки ця домішка не має дибензоциклооктинової групи, що вступає у реакцію кон'югації, ми вирішили не проводити очищення DBCO-Puro шляхом ВЕРХ, щоб уникнути втрати матеріалу. Домішки, що не вступають у реакцію, за масовими та хімічними характеристиками будуть помітно відрізнятися від цільового продукту та

мають легко відділитися під час очищення методом обернено-фазної хроматографії з іон-парним реагентом. У цілому, ми отримали невисокі відносні виходи пуроміцинових лінкерів.

Ми отримали дуже схожі дані другого етапу кон'югації для усіх зразків. Хроматограма розділення рСС-ССТ (рис. 3.7) має характерне праве плече, яке відповідає цільовому продукту – кон'югату основної та бічної групи через ПЕГ-лінкер.

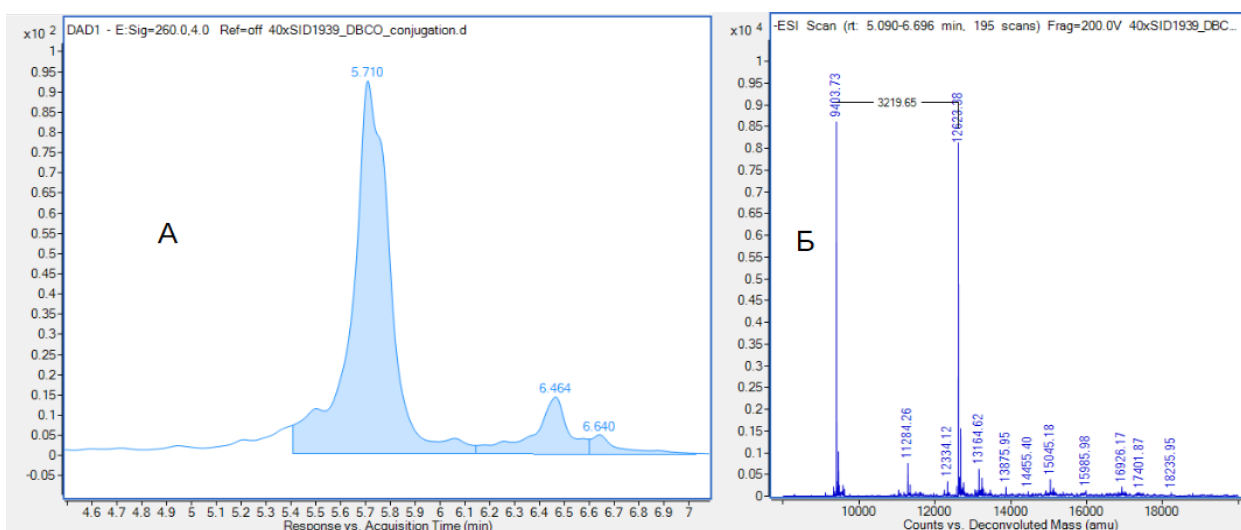


Рис. 3.7. LCMS-аналітика основного піка розділення зразку рСС-ССТ після кон'югації із DBCO-Руго протягом 12 годин на колонці ACQUITY UPLC VEN Amide з використанням лінійного градієнту ацетонітрилу. DAD-хроматограма оптичного поглинання на $\lambda = 260$ нм (А) та деконвольований мас-спектр основного кластера піків олігонуклеотидів (Б). Пік із масою 9403,7 Да відповідає рСС-ССТ із приєднаним ПЕГ-лінкером, пік із дельтою мас +3219,6 належить цільовому продукту

Отримані дані не підходять для визначення відносного виходу реакції циклоприєднання, адже варіанти кон'югатів співелюють та мають різний характер іонізації. Незважаючи на свої переваги, HPLC-хроматографія не

підходить для характеристики таких складних полімерів. Дані для решти зразків наведено у Додатку А.

3.4. Очищення пуроміцинових лінкерів шляхом обернено-фазної хроматографії з іон-парним реагентом

Із метою очищення пуроміцинових лінкерів від неповних кон'югатів, укорочених варіантів та низькомолекулярних домішок ми обрали обернено-фазну хроматографію з іон-парним реагентом (IP-RP-HPLC). Одним із недоліків цього методу є повільність врівноваження хроматографічної системи та утворення артефактів на хроматограмах у вигляді позитивних та негативних піків, від яких складно позбутися.

Ми отримали складні профілі хроматограм розділення методом IP-RP-HPLC (рис. 3.8 для RCCG-ССТ, Додаток Б для решти зразків).

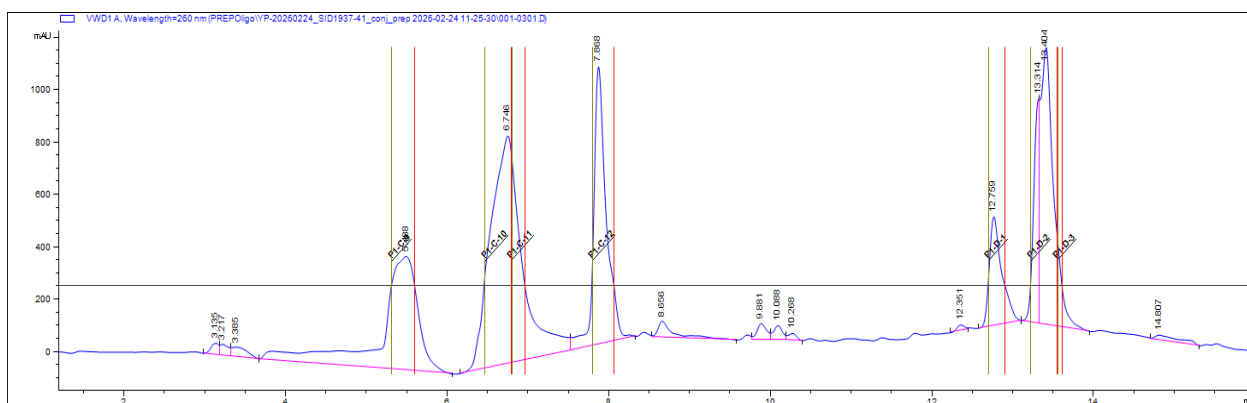


Рис. 3.8. VWD-хроматограма оптичного поглинання на $\lambda = 260$ нм препаративного розділення пуроміцинового лінкера RCCG-ССТ на колонці Pursuit 5 C18 з використанням лінійного градієнту ацетонітрилу

Частково це пов'язано із наявністю у зразку залишків домішок ряду n-x, неповних кон'югатів та вільного ПЕГ-лінкера. Характерне «просідання»

базової лінії (негативний пік на 6 хв), імовірно, є артефактом, пов'язаним із виходу системи із рівноваги внаслідок інжекції водного розчину зразка. Можливо, додавання іон-парного реагенту до зразка, що інжектуються, допоможе уникнути подібних артефактів. Ми припустили, що фракції D1 на 12,7 хв та D2 на 13,3 хв відповідають кон'югату та деякій спорідненій домішці.

Як слідує з даних рис. 3.9, ми дійсно отримали чистий пуроміциновий лінкер у фракції D2. Окрім домішок, пов'язаних із синтезом РНК-фрагмента, ми не бачимо інших нецільових варіантів. Такий патерн розділення відтворився і для інших пуроміцинових лінкерів (див. Додаток Б, В).

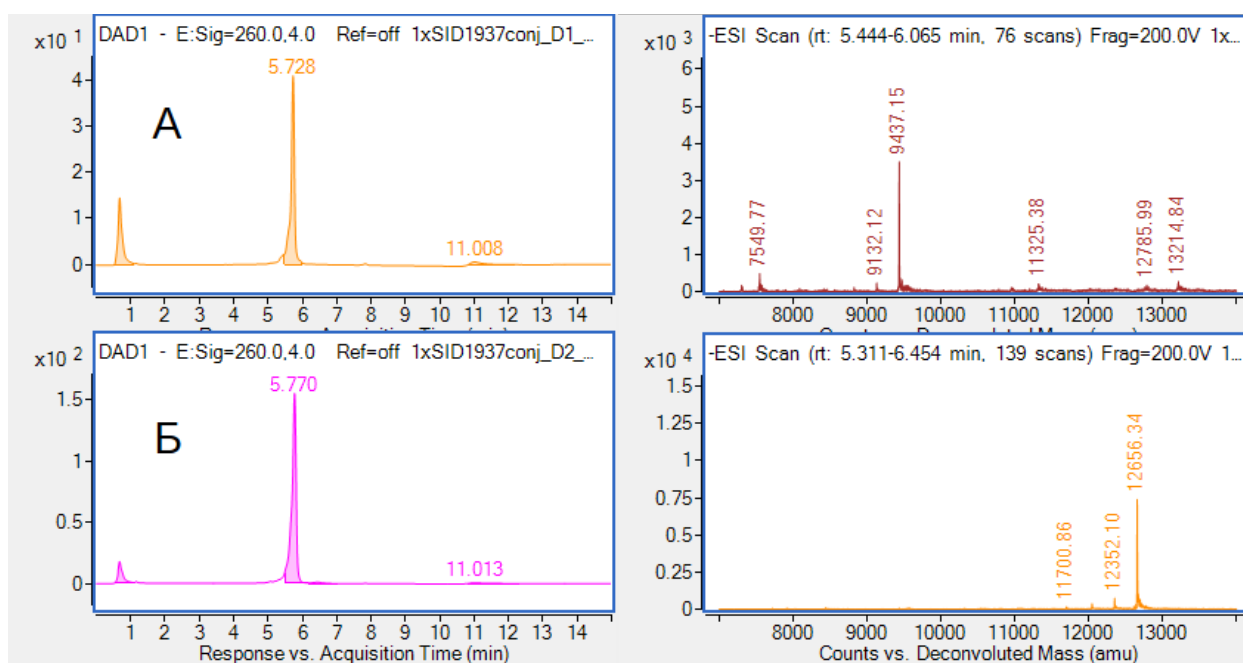


Рис. 3.9. LCMS-аналітика фракцій D1 та D2 розділення пуроміцинового лінкера RCCG-CCT на колонці ACQUITY UPLC VEN Amide з використанням лінійного градієнту ацетонітрилу. Фракція D1 (А). Зліва: DAD-хроматограма оптичного поглинання на $\lambda = 260$ нм. Справа: основний пік 9437,1 Да відповідає основній групі із ПЕГ-лінкером. Фракція D2 (Б). Зліва: DAD-хроматограма оптичного поглинання на $\lambda = 260$ нм. Справа: основний пік 12656,3 Да відповідає цільовому пуроміциновому лінкеру

Усі піки, що відповідають цільовим продуктам — пуроміциновим лінкерам, є дуплетами, які складаються з майже рівних компонентів (рис. 3.10). Але аналіз LCMS-даних свідчить про те, що ці піки належать молекулам однієї маси. Утворення дуплетів у цьому випадку, імовірно, не є артефактом розділення, оскільки інші сполуки, зокрема кон'югати основний ланцюг-ПЕГ-лінкер, утворюють нормальні сінглетні піки. Скоріше за все, це відбувається внаслідок утворення регіоізомерів, що є характерним для реакції азид-алкінового циклоприєднання у нашому випадку, оскільки азидна група є лінійною та DBCO-група не має осі симетрії, перпендикулярної ділянці циклоприєднання.

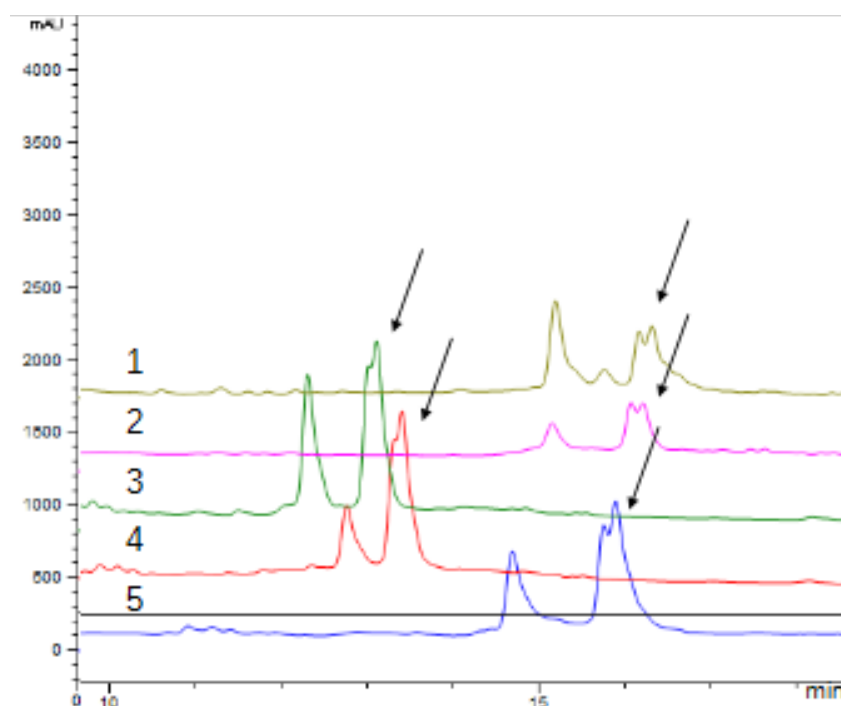


Рис. 3.10. VWD-хроматограми оптичного поглинання на $\lambda = 260$ нм препаративного розділення пуроміцинових лінкерів на колонці Pursuit 5 C18 з використанням лінійного градієнту ацетонітрилу. Стрілками позначено піки-дуплети, що відповідають цільовому продукту. Цифрами позначено хроматограми зразків: 1 – pCC-CCT, 2 – pCC-Ome-CCT, 3 – pCC-CCG, 4 – RCCG-CCT, 5 – RGUG-CCT

Як слідує з рис. 3.11, ми отримали умовно чисті пуроміцинові лінкери. Основними домішками є варіанти із втратою від одного до трьох рибонуклеотидів з 5'-кінця основної групи, обумовлені низьким покроковим виходом синтезу РНК-фрагментів. За площами піків екстрагованих іонних хроматограм, чистота зразків RCCG-CCT та RGUG-CCT складає 90,3 % та 88,2 % відповідно.

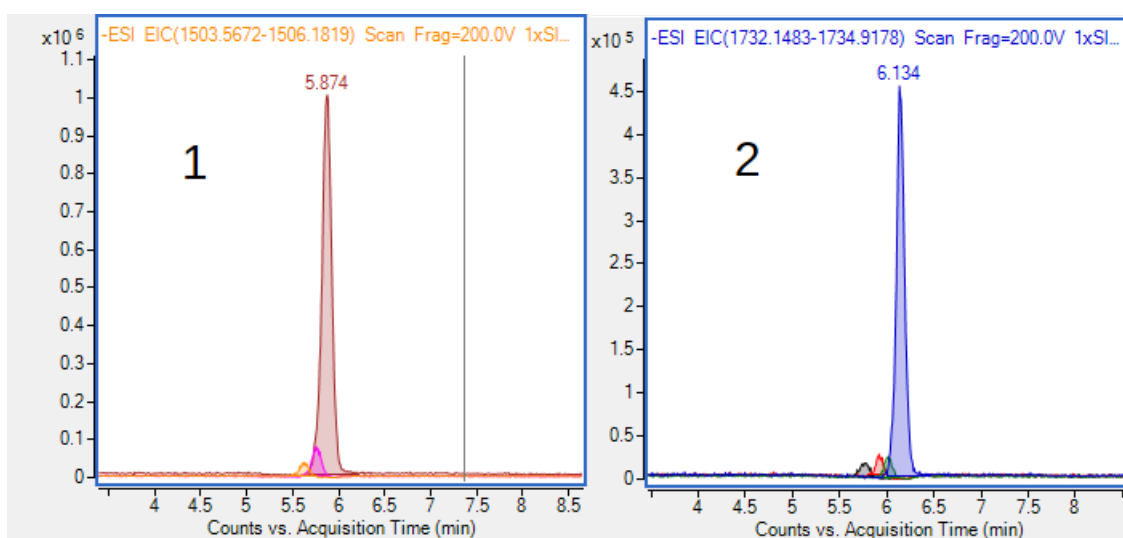


Рис. 3.11. Екстраговані іонні хроматограми кластерів із $z = 8$ цільових продуктів та домішок РНК-вмісних кон'югатів. 1 – RCCG-CCT, 2 – RGUG-CCT. Основні піки відповідають цільовим продуктам, мінорні — варіантам n- домішок

Аналіз чистоти лінкера рСС-СТГ методом ЕІХ продемонстрував вміст основного продукту на рівні 88,6 %. Єдина зафіксована домішка відповідає структурі без 5'-кінцевого фосфату основної групи, поява якої зумовлена обмеженою ефективністю стадії синтетичного фосфорилування (рис. 3.12). У випадку лінкерів рСС-ССТ та рСС-ОМе-ССТ піків достатньої інтенсивності, які могли б свідчити про наявність високомолекулярних

забруднень, виявлено не було, що свідчить про високу гомогенність отриманих зразків.

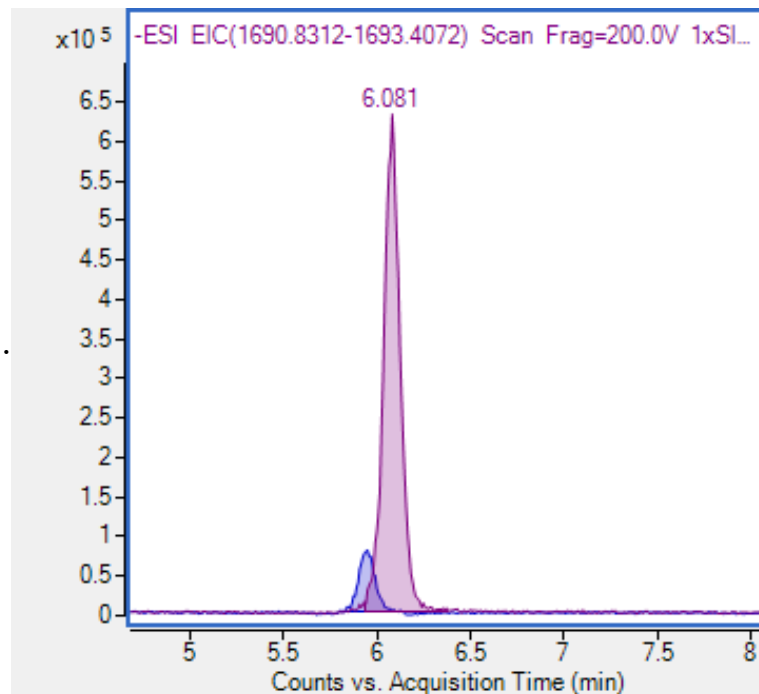


Рис. 3.12. Екстрагована іонна хроматограма кластерів із $z = 8$ цільового продукту та домішки рСС-СТГ. Основний пік із часом елюції 6 хв відповідає цільовому продукту, менший пік відповідає втраті 5'-кінцевого фосфату

Нижче наведено можливі напрями подальшого вдосконалення процесу:

- Попереднє очищення олігонуклеотидів. Якість вихідного матеріалу є критичною, оскільки низькомолекулярні домішки інтерферують із процесом кон'югації, а олігонуклеотидні домішки, близькі за характеристикою до основного продукту, складно відділити від цільового продукту.
- Кон'югація за TFP-естером. Варто дослідити кінетику реакції та підібрати оптимальні час реакції та молярний надлишок ПЕГ-лінкера.
- LCMS-характеристика проміжних продуктів. HILIC не дає достатнього розділення для неповних та повних кон'югатів, тому, можливо, варто використовувати IP-RP-HPLC.

- Хроматографічне очищення кон'югатів. Регіоізмери, утворені внаслідок циклоприєднання, частково розділяються у використаному методі. Варто використати більш повільний градієнт для повного розділення та провести функціональну характеристику очищених ізомерів. Інший підхід – заміна DBCO-групи на таку, що не утворюватиме ізомери за циклоприєднання.

У межах проведеного дослідження було розроблено та реалізовано комплексний процес синтезу й очищення набору пуроміцинових лінкерів для мРНК-дисплею. Спираючись на попередні результати, що включали опис синтезу первинних олігонуклеотидів та ідентифікацію специфічних домішок, зумовлених фосфорамідитним методом і стадією депротекції, було здійснено очищення вихідних сполук. У ході роботи визначено оптимальні параметри реакційного середовища для проведення кон'югації, що дало змогу приєднати ПЕГ-спейсер та пуроміцинову групу розгалуження до основних ланцюгів. Детальний аналіз кожної стадії процесу дозволив виявити низку технологічних перешкод або «вузьких місць», для яких було запропоновано відповідні шляхи оптимізації. Кінцевим результатом роботи стало отримання препаратів пуроміцинових лінкерів із високим ступенем чистоти, що є достатнім для їхньої подальшої функціональної характеристики та використання у біохімічних тестах.

ВИСНОВКИ

Розроблено та реалізовано технологію кон'югації та очищення набору пуроміцинових лінкерів розгалуженої архітектури; проведено їх аналітичну характеристику методом ВЕРХ-МС. Усі зразки мали чистоту, достатню для подальшої функціональної характеристики та використання.

1. Проведено огляд сучасних підходів до мРНК-дисплею з акцентом на особливості та переваги методу, а також розглянуто підходи до аналітичної характеристики та фракціонування синтетичних олігонуклеотидів.

2. Запропоновано поетапну схему синтезу кон'югатів пуроміцинових лінкерів з урахуванням низької стабільності РНК у лужних умовах реакційного середовища.

3. За результатами роботи виявлено низку «вузьких місць» процесу синтезу пуроміцинових лінкерів розгалуженої архітектури та запропоновано шляхи їхнього усунення.

4. Успішно здійснено синтез та очищення пуроміцинових лінкерів; ідентифіковано цільові продукти, готові для подальших досліджень. Для всіх зразків основним продуктом є сполука повної структури. Чистота зразків RCCG-CCT, RGUG-CCT та pCC-CTG складає 90,3 %, 88,2 % та 88,6 % відповідно, причому усі ідентифіковані домішки зумовлені якістю вихідних реагентів. Зразки pCC-CCT та pCC-OMe-CCT не містять ідентифікованих високомолекулярних домішок, що свідчить про їх високу гомогенність.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Abe, A., Časar, Z. (2025). Overview and Recent Advances in the Purification and Isolation of Therapeutic Oligonucleotides. *Organic Process Research & Development*, 29(1), pp. 15-33.
Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.4c00382>.
2. Aviner, R. (2020). The science of puromycin: From studies of ribosome function to applications in biotechnology. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 18, pp. 1074-1083. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.04.014>
3. Chheda, U., Pradeepan, S., Esposito, E., Strezsak, S., Fernandez-Delgado, O. i Kranz, J. (2024). Factors Affecting Stability of RNA – Temperature, Length, Concentration, pH, and Buffering Species. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 113(2), pp. 377-385. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.11.023>.
4. Cook, B.E. et al. (2025). PET imaging of an antisense oligonucleotide in the living non-human primate brain using click chemistry. *BioRxiv*, pp. 2025-02. Available at: <https://doi.org/10.1101/2025.02.06.636694>
5. Dérerová, T., Vosáhlová, Z. Kalíková, K. (2025). Recent advances in analytical separation techniques for therapeutic oligonucleotides. *Bioanalysis*, 17(18), pp. 1165-1180. Available at: <https://doi.org/10.1080/17576180.2025.2565141>.
6. Dhara, D., Hill, A.C., Ramesh, A., Traore, D., Radzikowska-Cieciura, E., Wood, M.J., Brown, T. (2025). Biophysical and biological properties of splice-switching oligonucleotides and click conjugates containing LNA-phosphothiotriester linkages. *Nucleic Acids Research*, 53(21). Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaf1263>
7. Ellington, A. and Pollard, J.D. (2000). Introduction to the Synthesis and Purification of Oligonucleotides. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* 00(1). Available at: doi.org/10.1002/0471142700.nca03cs00.

8. Enmark, M., Rova, M., Fornstedt, T. (2025). A Comparative Study of Ion Exchange vs. Ion Pair Chromatography for Preparative Separation of Oligonucleotides. *Journal of Chromatography A*, 1746, pp. 465790. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.465790>
9. Fan, Y. Et al. (2024). Encoding and display technologies for combinatorial libraries in drug discovery: The coming of age from biology to therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 14(8), pp. 3362-3384. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2024.04.006>.
10. Fleming, S.R., Himes, P.M., Ghodge, S.V., Goto, Y., Suga, H., Bowers, A.A. (2020). Exploring the Post-translational Enzymology of PaaA by mRNA Display. *Journal of the American Chemical Society*, 142(11), pp. 5024-5028. Available at: <https://doi.org/10.1021/jacs.0c01576>.
11. Fornstedt, T., Enmark, M. (2023). Separation of therapeutic oligonucleotides using ion-pair reversed-phase chromatography based on fundamental separation science. *Journal of Chromatography Open*, 3, pp. 100079. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2023.100079>.
12. Fukuda, I., Kojoh, K., Tabata, N., Doi, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Yanagawa, H. (2006). *In vitro* evolution of single-chain antibodies using mRNA display. *Nucleic acids research*, 34(19), pp. e127-e127. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkl618>
13. Gilar, M., Stoll, D.R. (2025). Challenges and Solutions in Oligonucleotide Analysis, Part II: A Detailed Look at Ion-Pairing Reversed-Phase Separations. *LCGC International*, 2(3).
14. Guillarme, D. (2024). Recent advances and current challenges in hydrophilic interaction chromatography for the analysis of therapeutic oligonucleotides. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 176, pp. 117758. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117758>
15. Jiramongkol, Y. et al. (2025). An mRNA-display derived cyclic peptide scaffold reveals the substrate binding interactions of an N-terminal cysteine

- oxidase. *Nature Communications*, 16(1), pp. 4761. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-025-59960-3>
16. Josephson, K., Ricardo, A., Szostak, J.W. (2014). mRNA display: from basic principles to macrocycle drug discovery. *Drug Discovery Today*, 19(4), pp. 388-399. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.10.011>
17. Kamalinia, G., Grindel, B.J., Takahashi, T.T., Millward, S.W., Roberts, R.W. (2021). Directing Evolution of Novel Ligands by mRNA Display. *Chemical Society reviews*, 50(16), pp. 9055-9103. Available at: <https://doi.org/10.1039/d1cs00160d>.
18. Kondo, T. et al. (2020). Antibody-like proteins that capture and neutralize SARS-CoV-2. *Science Advances*, 6(42), pp. eabd3916. Available at: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd3916>.
19. Krop, U., Pöhlmann, T., Schneider, N. (2023). *Large scale purification of oligonucleotides with ion exchange chromatography*. Knauer Wissenschaftliche Geräte GmbH. Available at: <https://www.advancingrna.com/doc/large-scale-purification-of-oligonucleotides-with-ion-exchange-chromatography-0001>
20. Lipovsek, D., Plückthun, A. (2004). *In vitro* protein evolution by ribosome display and mRNA display. *Journal of immunological methods*, 290(1-2), pp. 51-67. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.04.008>
21. Liu, R., Barrick, J.E., Szostak, J.W., Roberts, R.W. (2000). Optimized synthesis of RNA-protein fusions for in vitro protein selection. *Y: Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 268-293. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)18058-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)18058-9)
22. Minkner, R., Boonyakida, J., Park, E.Y., Wätzig, H. (2022). Oligonucleotide separation techniques for purification and analysis: What can we learn for today's tasks? *Electrophoresis*, 43(23-24), pp. 2402-2427. Available at: <https://doi.org/10.1002/elps.202200079>
23. Mochizuki, Y., Biyani, M., Tsuji-Ueno, S., Suzuki, M., Nishigaki, K., Husimi, Y., Nemoto, N. (2011). One-Pot Preparation of mRNA/cDNA Display by a

Novel and Versatile Puromycin-Linker DNA. *ACS Combinatorial Science*, 13(5), pp. 478-485. Available at: [https://doi.org/ 10.1021/co2000295](https://doi.org/10.1021/co2000295).

24. Mochizuki, Y., Suzuki, T., Fujimoto, K., Nemoto, N. (2015). A versatile puromycin-linker using *cnvK* for high-throughput *in vitro* selection by cDNA display. *Journal of Biotechnology*, 212, pp. 174-180. Available at: [https://doi.org/ 10.1016/j.jbiotec.2015.08.020](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.08.020).

25. Naimuddin, M., Kubo, T. (2016). A High Performance Platform Based on cDNA Display for Efficient Synthesis of Protein Fusions and Accelerated Directed Evolution. *ACS Combinatorial Science*, 18(2), pp. 117-129. Available at: [https://doi.org/ 10.1021/acscombsci.5b00139](https://doi.org/10.1021/acscombsci.5b00139).

26. Nemoto, N., Miyamoto-Sato, E., Husimi, Y., Yanagawa, H. (1997). *In vitro* virus: bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome *in vitro*. *FEBS Letters*, 414, pp. 405-408. Available at: [https://doi.org/ 10.1016/s0014-5793\(97\)01026-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)01026-0).

27. Newton, M.S., Cabezas-Perusse, Y., Tong, C.L., Seelig, B. (2020). *In Vitro* Selection of Peptides and Proteins-Advantages of mRNA Display. *ACS Synthetic Biology*, 9(2), pp. 181-190. Available at: [https://doi.org/ 10.1021/acssynbio.9b00419](https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00419).

28. Oikonomou, P., Salatino, R., Tavazoie, S. (2020). *In vivo* mRNA display enables large-scale proteomics by next generation sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(43), pp. 26710-26718. Available at: [https://doi.org/ 10.1073/pnas.2002650117](https://doi.org/10.1073/pnas.2002650117).

29. Roberts, R.W., Szostak, J.W. (1997). RNA-peptide fusions for the *in vitro* selection of peptides and proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(23), pp. 12297-12302. Available at: [https://doi.org/ 10.1073/pnas.94.23.12297](https://doi.org/10.1073/pnas.94.23.12297).

30. Ross, R.L. et al. (2025). Liquid chromatography - high resolution mass spectrometry analysis of intact ribonucleic acid through hydrogen bonding of

alkylamines. *Journal of Chromatography A*, 1761, pp. 466407. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.466407>.

31. Sanghvi, Y.S. (2019). Large-scale Automated Synthesis of Therapeutic Oligonucleotides: A Status Update. Y: Agrawal, S., Gait, M. J. ред. *Advances in Nucleic Acid Therapeutics*. The Royal Society of Chemistry, pp. 453-473. Available at: <https://doi.org/10.1039/9781788015714-00453>

32. Schneider, S., Boll, M., Eder, M., Eder, A. (2026). High Yield Branched Puromycin Linker Design Enables Efficient cDNA Display and Chemical Modification of Peptides. *Biotechnology and Bioengineering*, pp. bit.70164. Available at: <https://doi.org/10.1002/bit.70164>.

33. Seelig, B. (2011). mRNA display for the selection and evolution of enzymes from *in vitro*-translated protein libraries. *Nature protocols*, 6(4), pp. 540-552. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.312>

34. Semenyuk, A. et al. (2006). Cartridge-based high-throughput purification of oligonucleotides for reliable oligonucleotide arrays. *Analytical Biochemistry*, 356(1), pp. 132-141. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.05.008>.

35. Seshadri, S. (2026). Agilent extends MassHunter BioConfirm to oligonucleotides for purity analysis and sequence confirmation. *Analytical Science News*.

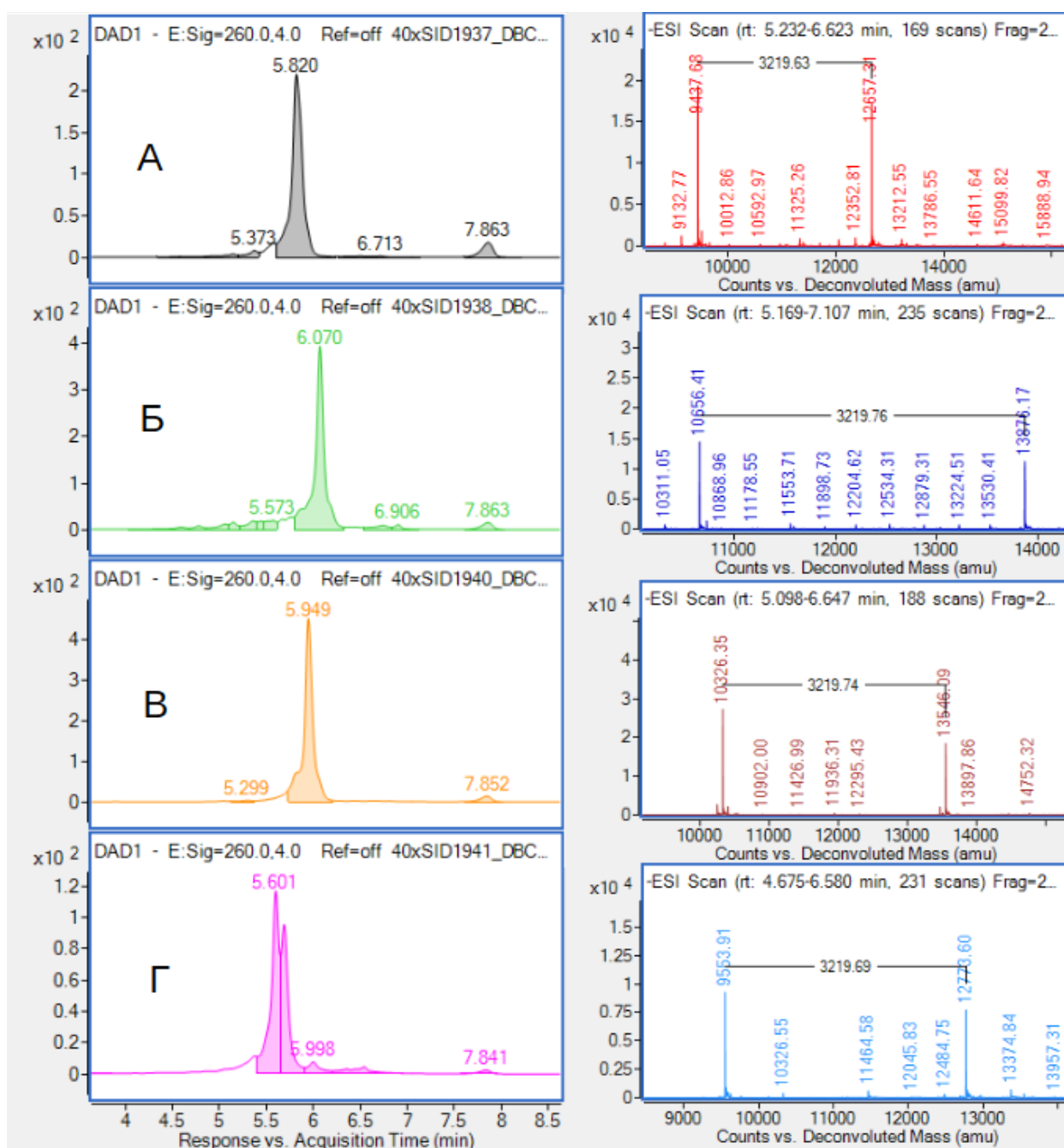
36. Takahashi, T.T., Austin, R.J., Roberts, R.W. (2003). mRNA display: ligand discovery, interaction analysis and beyond. *Trends in biochemical sciences*, 28(3), pp. 159-165. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00036-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00036-7)

37. Todorov, A., Verkhnyatskaya, S., Nijdam, I., Gilar, M., Fasth, M. (2025). *Method Development for Preparative Purification of Long Oligonucleotides*. Waters Corporation. Available at:

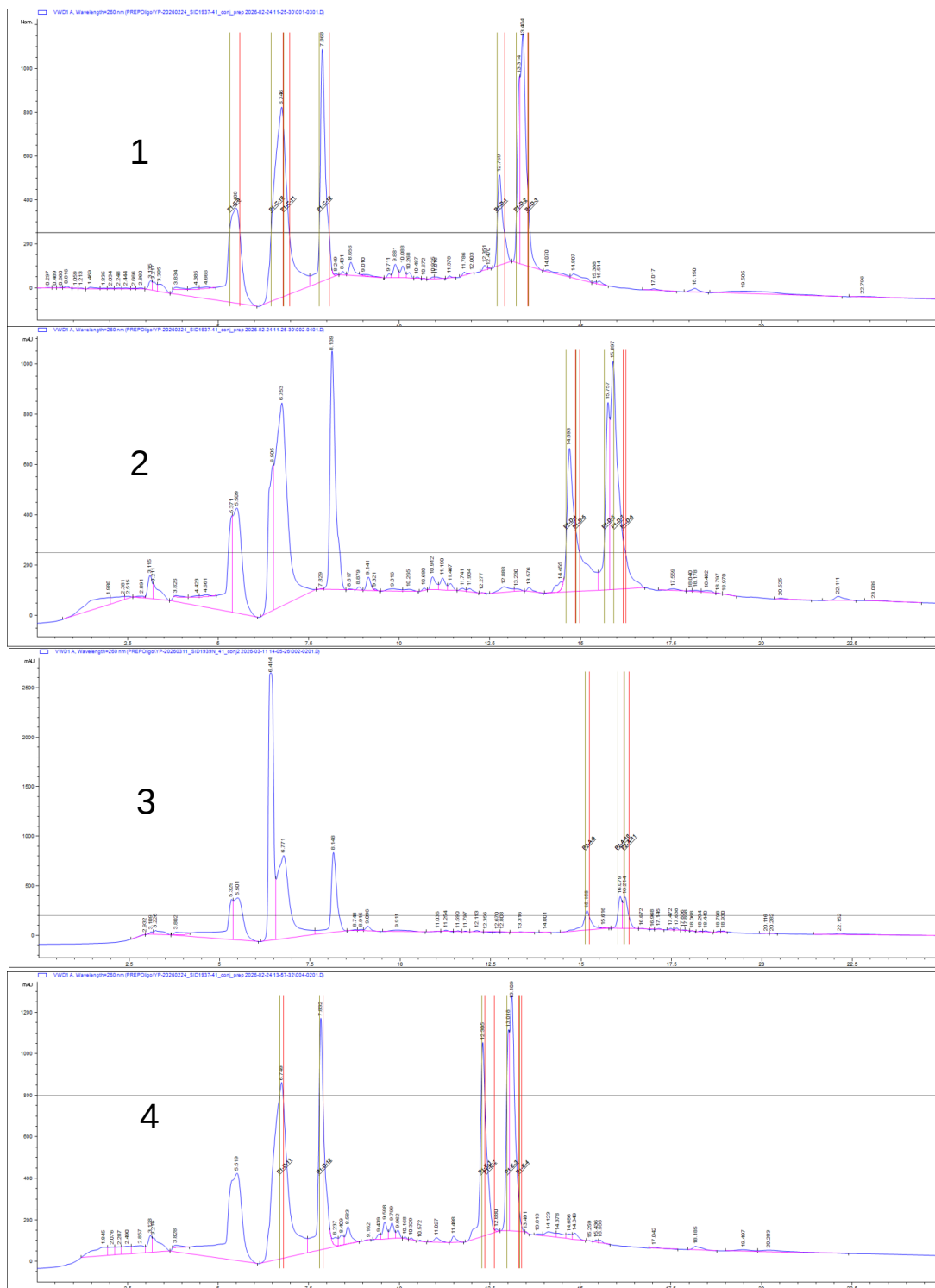
<https://www.waters.com/nextgen/pl/en/library/app.lication-notes/2025/method-development-for-preparative-purification-of-long-oligonucleotides.html?srsId=AfmBOorTE7V23BwBTIGaqmpCjHI9GivEGrhLuN1yT0fj1ycW9uTfKsD>

38. Wang, H., Liu, R. (2014). Advantages of mRNA display selections over other selection techniques for investigation of protein–protein interactions. *Expert Review of Proteomics*, 8(3), pp. 335-346. Available at: <https://doi.org/10.1586/epr.11.15>.
39. Wilson, D.S., Keefe, A.D., Szostak, J.W. (2001). The use of mRNA display to select high-affinity protein-binding peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(7), pp. 3750-3755. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.061028198>.
40. Wong, D.L., Rye, P. (2025). *An Integrated Workflow for the Analysis of Oligonucleotides and Their Impurities by Agilent High-Resolution LC/(Q-)TOF Mass Spectrometry*. Agilent Technologies, Inc.
41. Xu, L. et al. (2002). Directed evolution of high-affinity antibody mimics using mRNA display. *Chemistry & biology*, 9(8), pp. 933-942. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00187-4](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00187-4)
42. Zheng, B., Wang, X., Guo, M., Tzeng, C.M. (2025). Therapeutic Peptides: Recent Advances in Discovery, Synthesis, and Clinical Translation. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(11), pp. 5131. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms26115131>.

Зліва: хроматограми розділення основних піків пуроміцинових лінкерів RCCG-CCT (А), RGUG-CCT (Б), рСС-Ome-CCT (В), рСС-CTG (Г) Справа: відповідні деконвольовані мас-спектри після інкубації протягом 12 годин із DBCO-Puro; на колонці ACQUITY UPLC VEN Amide з використанням лінійного градієнту ацетонітрилу, рН 5.3, оптичне поглинання на $\lambda = 260$ нм. На усіх мас-спектрах спостерігається продукт приєднання бічної групи із дельтою маси +3219,6 Да



Хроматограми препаративного розділення пуроміцинових лінкерів із оптичним поглинанням на $\lambda = 260$ нм на колонці Pursuit 5 C18 з використанням лінійного градієнту ацетонітрилу. Цифрами позначено хроматограми зразків: 1 – RCCG-CCT, 2 – RGUG-CCT, 3 – рСС-СТГ, 4 – рСС-Ome-CCT



Деконвольовані мас-спектри очищених пуроміцинових лінкерів.

1) RGUG-ССТ: цільовому продукту відповідає пік 13875,4 Да, вказані домішки відповідають втраті одного, двох та трьох кінцевих рибонуклеотидів основного ланцюга. 2) рСС-ССТ: основний пік 12622,4 Да належить цільовому продукту. 3) рСС-СТГ: основний пік із масою 13545,3 Да відповідає цільовому продукту, пік із дельтою маси -80 Да відповідає варіанту із втратою 5'-кінцевого фосфату основної групи. 4) рСС-ОМе-ССТ: пік із масою 12774,2 Да відповідає цільовому продукту.

