

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Государственный научный центр Российской Федерации  
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук**

**СТЕНОГРАММА**

Заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при ГНЦ ИБХ РАН

18 декабря 2024 года

Защита диссертации  
на соискание учёной степени кандидата химических наук

**Брылёва Владимира Анатольевича**

«Разработка подходов к синтезу разветвлённых функциональных  
олигонуклеотидных конъюгатов»

по специальности 1.4.9. – биоорганическая химия

Москва, 2024 г.

СТЕНОГРАММА  
Заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при ГНЦ ИБХ РАН  
18 декабря 2024 года

Председатель диссертационного совета  
академик, д.х.н.

А.И. Мирошников

Учёный секретарь диссертационного совета  
д.ф.-м.н.

В.А. Олейников

Из 30 членов совета присутствует 21 человек, из них докторов по профилю диссертации – 9.

1. Академик РАН, д.х.н.	Мирошников Анатолий Иванович	(1.5.6)
2. Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(1.4.9)
3. Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(1.5.6)
4. Д.б.н.	Ажикина Татьяна Леодоровна	(1.5.3)
5. Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(1.4.9)
6. Д.х.н.	Белогуров Алексей Анатольевич	(1.5.3)
7. Д.х.н.	Генералова Алла Николаевна	(1.5.6)
8. Академик РАН, д.б.н.	Деев Сергей Михайлович	(1.5.3)
9. Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(1.4.9)
10. Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(1.5.3)
11. Академик РАН, д.х.н.	Донцова Ольга Анатольевна	(1.4.9)
12. Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(1.5.3)
13. Академик РАН, д.б.н.	Лукьянов Сергей Анатольевич	(1.5.3)
14. Член-корр. РАН, д.х.н.	Мирошников Константин Анатольевич	(1.5.6)
15. Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(1.4.9)
16. Д.б.н.	Рубцов Юрий Петрович	(1.5.3)
17. Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(1.5.3)
18. Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(1.4.9)
19. Член-корр. РАН, д.х.н.	Цетлин Виктор Ионович	(1.4.9)
20. Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(1.4.9)
21. Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(1.4.9)

**Мирошников А.И.:**

Коллеги, у нас защита. Брылёв Владимир Анатольевич «Разработка подходов к синтезу разветвлённых функциональных олигонуклеотидных конъюгатов» на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия. Научный руководитель - доктор химических наук Владимир Аркадьевич Коршун. Официальные оппоненты: Завьялова Елена Геннадиевна, доцент кафедры природных соединений химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Новопашина Дарья Сергеевна, кандидат химических наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории химии РНК, заместитель директора Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН). Ведущая организация Институт молекулярной биологии имени Энгельгардта Российской академии наук.

**Олейников В.А.:**

Материалы личного дела.

Брылёв Владимир Анатольевич в 2013 г. окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева» по специальности «Химическая технология синтетических биологически-активных веществ».

С 2013 по 2017 гг. Брылёв Владимир Анатольевич обучался в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН) по специальности «Биоорганическая химия». Кандидатский экзамен по специальности "биоорганическая химия" сдан с оценкой "отлично". С 2018 года младший научный сотрудник Лаборатории молекулярного дизайна и синтеза ГНЦ ИБХ РАН. Работа выполнена в Лаборатории молекулярного дизайна и синтеза Государственного научного центра Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Научный руководитель диссертационной работы д.х.н., Коршун Владимир Аркадьевич (ГНЦ ИБХ РАН, рук. лаборатории молекулярного дизайна и синтеза). По теме диссертации опубликовано 6 научных статей. Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайте ВАК 17.10.2024. Все необходимые документы в деле имеются.

**Мирошников А.И.:**

Спасибо. Владимир Анатольевич, пожалуйста, изложите основные положения вашей диссертационной работы.

**Брылёв В.А.:**

*(излагает основные положения диссертационной работы)*

**Мирошников А.И.:**

Спасибо! Вопросы, пожалуйста, коллеги.

**Белогуров А.А.:**

Будьте любезны, 14 слайд верните пожалуйста. У меня здесь два вопроса.

Первое – когда вы говорите, что в дорожках 4, 5 и 8 структура-тетрамер, то вопрос, как вы его отличаете от структуры, которая представлена на изображении вот тут, когда два хвостика зацепились, а эти еще не раскрылись?

**Брылёв В.А.:**

Они отличаются по подвижности, потому что других способов их различить нет. Масс-спектры с таких конъюгатов снять сложно – они, во-первых, находятся в буфере, во-вторых, это дуплексы, соответственно снимать масс-спектры с дуплексов нетривиальная задача. Мы ориентировались на подвижность на электрофорезе, а также на результаты атомно-силовой микроскопии. Но она не позволяет полностью достоверно сказать, что это действительно тетрамер, т.к. длина олигонуклеотидов маленькая и разрешение атомно-силовой микроскопии находится на грани. Также атомно-силовая микроскопия работает на поверхности, а иммобилизованный конъюгат на поверхности может плавиться и терять свою структуру и форму.

**Белогуров А.А.:**

Да, у меня собственно второй вопрос был – смотрели ли вы какими-то методиками вроде электронной микроскопии?

**Брылёв В.А.:**

Да, смотрели, давайте я вам сейчас покажу.

*(показывает дополнительный слайд)*

Вот картина атомно-силовой микроскопии сборки этого тетрамера. Картинка А и картинка В – это атомно-силовая микроскопия димеров, содержащих одноцепочечные «хвостики», а картинка С – результат их смешивания. Микроскопия делалась на атомарно ровном графите, видны структуры, которые возможно плавятся на поверхности.

**Белогуров А.А.:**

Пробовали ввести какие-нибудь последовательности в ваши олигонуклеотиды, которые бы формировали сайты, специфичные для эндонуклеаз рестрикции? Чтобы доказать что эти димеры гибридизуются.

**Брылёв В.А.:**

Нет, мы не думали такие сайты ввести. Пробовали только физическими методами это доказать.

**Белогуров А.А.:**

Какое применение этих структур вы предполагаете, поскольку это выглядит как фундаментальная задача?

**Брылёв В.А.:**

Я понял ваш вопрос, спасибо, действительно мы хотели показать в этой работе, что можно химическими методами получить конъюгат, а потом дальше его использовать для построения более сложных структур. На базе ДНК-наноструктур делают сенсоры и, я думаю, что здесь что-то подобное тоже можно сделать – например для детекции мишени, которая может запускать перегибридизацию и образование более крупной структуры.

**Белогуров А.А.:**

Спасибо.

**Брылёв В.А.:**

Спасибо за вопросы.

**Мирошников А.И.:**  
Пожалуйста, вопросы.

**Слонимский Ю.Б.:**

Спасибо за доклад, у меня есть вопросы. Один познавательный для меня, второй технический.

Познавательный следующий – может быть, мной пропущено, а какие мишени ваших аптамеров и с чем взаимодействуют?

А вторая часть вопроса – можно ли измерить силу взаимодействия аптамеров с мишенью по аналогии с антителами? Я не знаю какая мишень, мне не очень понятно будет ли связывание сильнее?

**Брылёв В.А.:**

Да, смотрите, первая часть вопроса – мишень это рецептор эпидермального фактора роста. Это рецептор присутствует на всех клетках, а идея таргетирования заключается в том, что как правило его мутантные формы гиперэкспрессированы и на 1-2 порядка экспрессируются сильнее. Поэтому будет таргетирование за счет его большей представленности на раковых клетках. А сам аптамер связывается с рецептором. Его функция – связывание с нативным лигандом – эпидермальным фактором роста. Происходит интернализация внутрь клетки и переносит лиганд внутрь клетки. Таким же образом это должно работать с аптамером – он должен проникать внутрь. Могут быть разные пути, но самый наилучший – попадание в лизосому, где работают протеолитические ферменты, например катепсин В. Мы изучаем этот процесс, когда цитостатический препарат высвобождается.

А что касается много центрального связывания – это преимущество, про которое я не совсем внятно сказал. Действительно такие конъюгаты могут содержать три аптамера. И можно развивать структуру конъюгата по-разному – три одинаковых аптамера дают многоцентровое связывание. Вторая возможность – полиспецифичность с разными аптамерами. У многих опухолевых клеток может вырабатываться резистентность при терапии таргетными препаратами. А когда в конъюгате содержится несколько таргетирующих начал, то клетке сложнее выработать резистентность.

**Слонимский Ю.Б.:**

Спасибо большое, это действительно интересно. Второй технический вопрос, на 15 слайде я химию не могу оценить, а электрофорез могу. Мне не очень понятно как оценивается здесь что там мономер, димер или тетрамер судя по подвижности, потому что я не знаю какие размеры у маркеров, что меня сразу начинает смущать. Какую массу вы ожидаете, а также количество шмера, тетра- или октамеров. Есть некое распределение олигомеров. Можете пожалуйста пояснить?

**Брылёв В.А.:**

*(показывает дополнительный слайд)*

Действительно, когда мы занимались анализом с помощью электрофореза, я начну издали. Картины на полиакриламидном геле лесенки нанесены, и эти структуры соответствуют примерно 100-нуклеотидным полосам. На самом деле, те структуры, которые делаем мы – компактные и их подвижность не соотносится с линейными маркерами лесенки. За счет образования структур искажается подвижность по сравнению с лесенками. А вот эти картины получены на агарозном геле, тут я не доработал – надо было нанести значения масс маркеров.

**Слонимский Ю.Б.:**

А как у вас тетрамер в такой коформации будет соответствовать по массе в бр маркеру?

**Брылёв В.А.:**

Да, действительно. Я об этом и говорю, что мы не можем точно соотнести.

**Слонимский Ю.Б.:**

А как вы тогда делаете вывод, что это тетрамер?

**Брылёв В.А.:**

Потому что из этих структур больше образоваться ничего не может, и структура с наивысшей подвижностью является тетрамером. В каждом дуплексе олигонуклеотиды уникальны.

**Слонимский Ю.Б.:**

Спасибо большое.

**Брылёв В.А.:**

Пожалуйста.

**Мирошников А.И.:**

Да, пожалуйста, еще вопросы.

**Пахомов А.А.**

Когда вы сделали триммер аптамера, у вас получился мол. вес примерно 50 кДа. Вы думали как еще увеличить молекулярную массу конъюгата? Например, альбуми 65 кДа. Кажется 50 маловато.

**Брылёв В.А.:**

Можно увеличить. Сейчас развивается направление биспецифических белков и антител. Тут можно сделать конструкцию, когда один из аптамеров будет аффинным к белку альбумину, но его константа будет не такая сильная, как константа других аптамеров к нашей интересующей мишени. Чтобы повысить время полувыведения, можно делать такие интересные конструкции, работающие на разнице констант связывания и тогда даже не надо увеличивать массу аптамерного конъюгата. Конечно, можно дополнительно навешивать линкеры, либо увеличивать длину части, которая крепится к точке разветвления (стебель). Так вырастет масса целевого конъюгата. Также аптамеры могут быть более стабильны по отношению к нуклеазам. Дизайн разветвленных конъюгатов предполагает сразу много интересных решений – стабильность, адресность, поливалентность, время полувыведения.

**Мирошников А.И.:**

Спасибо, еще вопросы. Нет. Владимир Аркадьевич, вам слово.

**Коршун В.А.:**

Я должен охарактеризовать соискателя. Ну, конечно, поскольку защита происходит только сейчас, а не состоялась, к примеру, несколько лет назад, то, конечно, нельзя сказать, что полностью благостно. Ясно, что были проблемы, объективные, тема менялась. Ну и сам Владимир, он тоже несколько разбрасывался, проявлял интерес к различным областям. Это значительно задержало работу. Понятно, что в процессе написания самой диссертации тоже немножко распыление было, что привело к

недостатку времени на нормальное редактирование. Но такие черты, конечно, есть, у людей бывают, но, соответственно, приводят к таким результатам. Ну а теперь, наверное, о хорошем, что Владимир очень интересуется наукой и очень хорошо осваивает методы. У него золотые руки, и он получает хорошие экспериментальные результаты. Педагогическая работа – тоже несколько противоречивые результаты, но, тем не менее, он руководит дипломниками. Из этих вот дипломников одна девочка сейчас, которая выполнила бакалаврскую работу, она сейчас в Парижском университете очень рейтинговом выполняет магистерскую работу. Еще один дипломник сейчас в аспирантуре в Оксфорде. Ну и еще одна дипломница уже полтора года назад защитила кандидатскую диссертацию в нашем институте. Сейчас Владимир полностью состоялся, на мой взгляд, как исследователь, он задачи ставит, выполняет, пишет статьи и посылает.

**Мирошников А.И.:**

Коллеги, есть вопросы к руководителю? Нет вопросов? Тогда Владимир Александрович, пожалуйста, отзывы.

**Олейников В.А.:**

*(Зачитывает положительное заключение организации, где выполнялась диссертация).* Диссертация выполнена в нашем институте, у меня в руках заключение семинара по поводу этой диссертации. И пишется следующее, что в 2013 году (биографические данные) окончил Менделеевский университет, с 2013 по 2017 обучался в очной аспирантуре, вот эту часть уже мы так рассматривали. Научный руководитель только что выступил. Тема диссертационной работы еще в 2013 году, в первом варианте она была утверждена, а в окончательной редакции 22 мая 2024 года. Далее подчеркивается актуальность исследований. Тема актуальна, так как разработаны новые подходы синтеза разветвленных олигонуклеотидных конъюгатов, значительно расширяют возможности их применения в таких направлениях, как ДНК-нанотехнологии, разработка терапевтических аптамерных и олигонуклеотидных конъюгатов, получение диагностических инструментов и так далее. Научная новизна подчеркивается теоретической и практической значимостью, что предложен оригинальный биоортогональный подход к синтезу и выделению разветвленных олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов, разработан принцип дизайна наномономеров. Достоверность сомнений не вызывает. Основные результаты получены лично автором или при его непосредственном участии. Подчеркивается, что опубликовано все в шести статьях, которые входят в перечень научных изданий, рекомендованных Минобрнауки для опубликования результатов диссертаций. Перечислены вот эти вот статьи. Ну и в конечном итоге эта работа рекомендована к защите. И заключение принято на открытом заседании отдела функционирования живых систем. Присутствовало много народу, 36 человек. Единогласное голосование. Ну и подписано секретарем Михура Ирина Владиславовна, замдиректора Ямпольским И.В. И утверждено директором нашего института Александром Габировичем Габировым это заключение.

Теперь отзыв ведущей организации. *(Зачитывает отзыв ведущей организации.. Отзыв положительный).* У нас ИМБ РАН. Опять же, начинается с актуальности, подчеркивается, что тема является действительно актуальной. Повторяется формулировка цель и задачи исследований. Научная новизна подчеркивает, что впервые получен гидрофильный тетраазид. Показано его успешное применение в качестве эквивалентного разветвляющего реагента. Разработан принцип дизайна наномономеров, способных вступать в реакцию перегибридизации по механизму замещения последовательностей. Практическая значимость работы заключается в том,

что разработанный подход сборки простых дискретных ДНК-наноструктур может использоваться для создания более сложных динамических супрамолекулярных конструкций на основе ДНК. К структуре и объёму – 108 страниц, 283 наименования, введение. Литературный обзор, который содержит 4 раздела, посвящен рассмотрению способов получения и применения разветвлённых олигонуклеотидных конъюгатов. Диссертация, следующая за литобзором, посвящена обсуждению собственных результатов и является логическим продолжением обзора литературы. Экспериментальная часть, подробное описание синтезов всех химических соединений, автореферат полностью соответствует, и ведущая организация выдвигает некие вопросы и замечания. Первое. На изображении гелей отсутствуют маркеры длины ДНК, либо они не подписаны, что затрудняет оценку размера полученных продуктов. Второе. В работе не описано, оценивалась ли противоопухолевая активность разветвленных конъюгатов аптамеров с отщепляемым противоопухолевым соединением монометилауристатином Е. Также остаётся непонятным, как был выбран ферментативно расщепляемый линкер для связывания конъюгатов олигонуклеотидов с этим ММАЕ. В тексте диссертации содержатся опечатки, грамматические ошибки, неудачные выражения. И четвёртое, рисунок 49 содержит нечёткие изображения конъюгатов олигонуклеотидов. Заключение. Данная диссертационная работа соответствует всем требованиям пункта девятого положения порядка присуждения ученых степеней со всеми изменениями и дополнениями к постановлению правительства номер 842, а сам автор, Брылёв Владимир Анатольевич, заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – Биорганическая химия, и все это рассмотрено на межлабораторном коллоквиуме и соответственно отзыв подготовлен Чудиновым Александром Васильевичем, ведущим научным сотрудником, руководителем лаборатории нуклеотид-модифицированных нуклеиновых кислот, соответственно, Института молекулярной биологии имени Энгельгардта. Соответственно, отзыв утвержден заместителем директора, доктором биологических наук, членкором РАН В.А. Митькевичем. Вот это ведущая организация.

**Мирошников А.И.:**

Да, спасибо. Объясняйте, что непонятно Институту молекулярной биологии.

**Брылёв В.А.:**

В первую очередь, конечно, я согласен с замечаниями по поводу стилистики, грамматических ошибок. Да, действительно, это есть. Также мы уже обсудили в ответах на вопросы, что нет подписи, маркеров молекулярной массы. Тут тоже я признаю, это недоработка. Был вопрос по поводу выбора линкера, как раз вот этот слайд.

*(показывает дополнительный слайд)*

Я тоже уже рассказал принцип выбора, то есть это ферментативно отщепляемый линкер. Мы стремились взять линкер, который уже одобрен к применению, который показал себя и его вообще работоспособность доказана. То есть на этом был основан наш выбор.

**Мирошников А.И.:**

Все, спасибо.

**Олейников В.А.:** *(Зачитывает отзывы на автореферат)*

В Совет поступили два отзыва на автореферат. Отзывы положительные, но удивительное дело, они с замечаниями. Соответственно, **первый отзыв на автореферат**. По тексту автореферата следует отметить следующие замечания и



комментарии. Первое. В тексте встречаются несогласованные предложения, опечатки и ошибки. Второе. Синтез гидрофильных полифункциональных азидов сопряжен с образованием набора продуктов разной степени замещения. Хроматографическое разделение сложной смеси соединений на силикагели может представлять заметные трудности и удорожать получение азидных производных. Третье. Получение олигонуклеотидных гетерофункциональных конъюгатов требует подбора соотношения реагентов, неизбежно приводит к образованию смеси продуктов, что в свою очередь потребует использования ВЖХ или геля электрофореза для выделения целевых продуктов. Таким образом, заявленная в работе возможность контролировать стехиометрию сопряжена с заметными сложностями. Четвертое. На странице 16 упомянуты азидные фосфорамидиты. Хотелось бы узнать о каких фосфорамидитах идет речь. Восемнадцатая страница. Как проводилась идентификация конъюгатов с девятью и восемнадцатью остатков Gal-NAc? По субъективному восприятию, раздел синтеза разветвленных конъюгатов представляет собой слабо адаптированный перевод с английского. В любом случае, стиль изложения требует доработки. Перечисленные замечания не умаляют высокой общей оценки, и, соответственно, законченное исследование, и рекомендуется к присуждению искомой степени. Это ведущий научный сотрудник Института молекулярной биологии Тимофеев, доктор химических наук.

*И второй отзыв на автореферат*, как это интересно, он тоже с замечаниями. Первое, объем автореферата кажется несколько избыточным. Предпочтительнее было бы более лаконичное изложение результатов диссертации. Второе, количество рисунков в автореферате, вероятно, следовало бы сократить, а для имеющихся увеличить размер, поскольку они содержат слишком мелкие элементы, для изучения которым лучше обращаться к полному тексту диссертации. Третье, в автореферате грамматические ошибки и неточности имеются. Четвертое, последняя часть автореферата посвящена синтезу аптамерных конъюгатов, содержащих цитостатический отщепляемый препарат. Однако неясно, изучались ли противоопухолевые свойства конъюгатов и какое практическое применение они в дальнейшем получили.

Но замечания не снижают общей высокой оценки, и автор, несомненно, заслуживает. Подписано научным сотрудником Лаборатории молекулярной диагностики ГНЦ ИБХ РАН, Стахеевым Александром Алексеевичем.

#### **Брылёв В.А.:**

Так, ну я сначала на более простые вопросы отвечаю. Да, действительно был автоматический перевод, признаю, но мы вдумывались, когда переводили, всё равно. Значит, теперь был вопрос по поводу того, как анализировали олигонуклеотиды, содержащие кластеры Gal-NAc? Как отличали 3 от 9? Легко, масс-спектры снимали и смотрели по полученной массе. Ещё был вопрос. Владимир Александрович, поможете, пожалуйста? Вопрос такой интересный - разделение продуктов после синтеза полиазидов может представлять большую трудность. На самом деле нет. Там различие в молекулах на одну гидроксильную группу очень сильно приводит к изменению подвижности, поэтому мы не заметили никаких проблем тут в разделении. Да, конечно, продукты получаются в виде смесей, но они абсолютно легко разделяются, и я думаю, что это не является проблемой. Был ещё вопрос, что в работе заявляется возможность контролировать стехиометрию, но она сопряжена с заметными сложностями. Да, она сопряжена с заметными сложностями, но эти сложности все решаются с помощью хроматографии. Мы видим, что времена удерживания между конъюгатами отличаются очень сильно, поэтому вся сложность сводится только к постановке хроматографии, поэтому, в принципе, разделять эти продукты не

представляет большой сложности. Также есть замечания по поводу оформления рисунков, но тут я согласен, сказать больше нечего. Спасибо.

**Мирошников А.И.:**

Елена Геннадьевна, пожалуйста.

*(Приглашает выступить официального оппонента)*

**Завьялова Е.Г.:** *(Излагает отзыв. Отзыв положительный)*

Добрый день. Во-первых, я хочу сказать, что работа очень интересная. Там главная проблема в оформлении и в нескольких местах, где должна была бы подтвердиться функциональность полученных олигомерных продуктов, но с ее подтверждением возникли некоторые сложности. Позвольте начать сначала. Так мне очень понравился обзор литературы. Во-первых, он действительно вычитан, и в нем минимальное количество ошибок. На хорошем русском языке проанализирован большой объем информации, информация современная, приятно читать, и впечатление было очень хорошее. А основные замечания, с моей стороны, к результатам и обсуждению. Ну, во-первых, видно, что очень торопились, видимо, подходил дедлайн, и текст плохо вычитан. Там среди моих любимых неудачных переводов «рассол», которым промывали какое-то соединение при очистке. Ну совсем уж, не вычитали совсем, видимо в последний момент переводили. Так, но хочу сказать, что синтетические процедуры в целом очень подробно описаны и действительно доказано, что эти соединения получены. Описано, как проводили очистку, как оптимизировали состав гомо-, ди-, три-, тетра- производных. И с этой точки зрения всё хорошо. Синтетическая часть замечательная. Хочу перейти к своим замечаниям. У меня самое большое возмущение возникла по поводу шестого пункта положений, выносимых на защиту. Дело в том, что там последний раздел аптамеры, к которому пришивается этот цитостатический агент. Там написано, что они прямо обладают цитотоксическим действием, при том, что в самом тексте работы и в автореферате эти данные просто отсутствуют. То есть нет ни сырых данных, ни обработанных данных. Есть некий текст, в котором описывается в стиле: «Есть цитотоксичность, мы её видим, она примерно наномолярного порядка,  $EC_{50}$ ». Но всё-таки хочется видеть конкретные данные и хочется видеть положительные и отрицательные контроли. Вот их не было. Мне очень нравится четвёртый вывод, который был представлен в презентации сегодня и в диссертацию, он тоже хорошо сформулирован. Поскольку в работе доказано, что были синтезированы эти конъюгаты, и действительно вот эта часть хорошо описана. А вот по поводу их свойств, такое ощущение, что, видимо, эта работа относительно новая, возможно, ее не успели доделать. Тогда не стоило выносить в положение, выносимое на защиту. Следующее мое замечание по поводу подтверждения структуры этих конъюгатов. В тексте написано, что делали масс-спектр, но масс-спектров нет, их забыли, видимо, вставить. Следующее моё замечание уже активно обсуждали, это по поводу тетрамерных конструкций, там, где у них наноэтилен образуется, так его называли в работе иногда. Действительно, очень хорошо видно, что у них получается тетрамер, но доказательства, что это циклическое соединение с перегруппировкой, с образованием более длинного дуплекса, его просто нет. И видимо, те методы, которые были выбраны, они не способны не подтвердить, не опровергнуть. С этой точки зрения, мне кажется, что и на гель-электрофорезе вполне видно его сборку. Меня очень удивило, что ДНК наноконструкции собирали в буфере с низкой ионной силой. В частности, трис-ацетатный буфер. Хотя для ДНК оригами есть работы, в которых прямо показано, что при добавлении катионов натрия до концентрации хотя бы 100 мМ, 150 мМ, это сильно увеличивает эффективность сборки. Известно, что ДНК-дуплексы стабильны при физиологической ионной силе, а

в воде они градусов на 10, на 15 менее стабильны. Вроде бы это было заранее известно, в работе почему-то они оптимизировали состав буфера, добавляя катионы магния, но не варьируя ионную силу. Непонятно почему. Как-то упустили. Дальше у меня тут много замечаний по поводу того, как описано в тексте, но я это списываю на то, что люди торопились и просто не вычитали. И вот, например, из того, что я хочу все-таки обсудить, это терминологическое единообразие, потому что где-то называют одно и то же гомогенный разветвлённый олигонуклеотид-олигонуклеотидный конъюгат, где-то он превращается в трис-продукт или тетра-продукт, где-то он уже V-образный гомогенный конъюгат, и какая-то большая путаница в разных местах. Мне кажется, можно было сказать, что это гомодимер, как-то более просто, либо сделать отдельный абзац, где объясняется, как они выбрали эти названия и чему они соответствуют, чтобы было более понятно. Но в целом мне работа понравилась. Во-первых, она интересная. Сборка ДНК-наноконструкций — это тренд последних нескольких десятилетий. Это довольно дорогая технология, но тем не менее интересно создать какие-то сложные конструкции из маленьких блоков, заставить их самопроизвольно собираться. Синтетические процедуры описаны идеально, к ним никаких замечаний нет. У автора работы много публикаций, много выступлений на конференциях. На мой взгляд, он заслуживает присуждения в степени кандидата химических наук по специальности биоорганическая химия. Позвольте не зачитывать все эти даты и номера постановлений, просто сказать, что я за.

**Мирошников А.И.:**

Спасибо, Елена Геннадиевна. Давайте отвечайте.

*(Приглашает выступить диссертанта)*

**Брылёв В.А.:**

В первую очередь хотелось бы поблагодарить Елену Геннадьевну за очень тщательное изучение моей работы. И сейчас я отвечу на такие ключевые замечания и вопросы. Основное замечание, которое было, по поводу активности. Да, действительно, мы не стали включать в диссертацию это, потому что, да, действительно, торопились, но мы послали статью, и она у нас находилась как раз в процессе рецензирования, поэтому эти данные я, с вашего позволения, приведу сейчас здесь.

*(Показывает дополнительный слайд)*

Мы сделали ряд экспериментов по проточной цитометрии, чтобы оценить специфичность, и ряд экспериментов по изучению выживаемости клеток в присутствии конъюгатов аптамеров с цитостатическими препаратами. Но я скажу так, выводы пока делать рано, потому что этот материал опубликован, и там действительно получились активности порядка одного-десяти наномолей на литр в зависимости от структуры. Можно даже видеть какие-то тенденции, что, например, конъюгат структуры 1 к 3, где у нас один аптамер1 аптамер и 3 полезных нагрузки, он во всех экспериментах гораздо более активнее по сравнению с другими конъюгатами. Но тут мы изучаем сейчас еще вопрос стабильности этих конъюгатов, потому, что их дизайн тут был не совсем правильно сделан с моей стороны, потому, что я сделал прикрепление аптамера по 5'-концу, а соответственно 3' - конец был свободен, поэтому я подозреваю, что могла просто произойти ферментативная дегградация в присутствии клеток, нуклеазами этого аптамера, и, соответственно, высвободившаяся нагрузка могла проявить активность. Мы могли получить положительный результат. Поэтому я не стал эти результаты добавлять в диссертацию. Потому что это на самом деле предмет такого изучения детального, как раз это то, что мы сейчас делаем и разбираемся, насколько стабильны конъюгаты при разных способах конъюгации, по 5'-концу, по 3'-концу, а также при введении дополнительных модификаций, например,

тиофосфатной группы. Также у Елены Геннадьевны был вопрос по поводу ионной силы. Но я скажу, чем руководствовались. Мы хотели анализировать потом получаемые смеси после гибридизации. И, соответственно, наносить на форец образцы с высокой ионной силой невозможно, потому что они на фореце потом очень плохо разделяются, и та вся соль, которая есть в образце, она, конечно, мешает нормальному электрофоретическому разделению. Вот это первое, второе, там был вопрос в отзыве по поводу этилендиамина в буфере. Да, действительно, были аналогичные эксперименты. Это данные опубликованные о том, что этилендиамин способствует образованию дуплексов и иногда может применяться в качестве такой добавки для повышения качества гибридизации сборки ДНК на структуру. Вот. Ну, я надеюсь, ответил на все ключевые вопросы. Еще раз хотел поблагодарить Елену Геннадьевну за проделанную работу. Спасибо.

**Мирошников А.И.:**

Спасибо. А у нас по зуму.

*(Приглашает выступить второго официального оппонента)*

**Новопашина Д.С.:** *(Излагает отзыв. Отзыв положительный)*

Добрый вечер. У нас уже тут добрый вечер. Сама диссертация работы Владимира Анатольевича мне понравилась. По содержанию, по научной новизне и актуальности соответствует кандидатской диссертации. Но, как и всех остальных, меня сильно огорчило наличие большого количества опечаток, кандидатских выражений, переводов, а также то, что практически все иллюстрации, как в автореферате, так и в диссертации, приведены на английском языке. Удивительным также оказалось, что во введении первых пяти страниц диссертации приводится 121 ссылка, что составляет примерно половину всех ссылок, использованных в диссертации. Цель работы сформулирована четко, перечислены задачи. Все в обсуждении прямо соответствует тому, что должно быть. Обзор литературы достаточно подробный, хорошо иллюстрирован. В нем практически не содержится опечаток, как уже Елена Геннадьевна сказала. Мне очень понравилось, что в конце каждого раздела есть обоснование той работы, которая будет проделана, то есть заключение по литературе, и понятно, что еще там не доделано, куда надо развиваться, и как раз эти направления и потом описанные в работе диссертанта. Глава результатов и обсуждения посвящена разработке подходов к синтезу разветвленных олигонуклеотидных конъюгатов, содержащая шесть разделов, которые достаточно хорошо с точки зрения информации изложены, полно представлены в тексте и проиллюстрированы, и результаты потом не противоречат сделанным предложениям. Описание обсуждения результатов не противоречит экспериментальным данным. Экспериментальная часть тоже очень подробная, несмотря на то, что содержит много ошибок, действительно имеет большую ценность в плане большого количества методик, где помимо описания, собственно, синтеза, приводятся и некоторые структуры, за которыми не приходится обращаться к основному тексту диссертации, что очень удобно. Выводы не вызывают сомнений. Они соответствуют экспериментальным данным. Список литературы достаточно большой и содержит современные источники информации. Достаточно много замечаний по оформлению у меня возникло. Чувствуется переводчик, не до конца отредактированный текст. Отсутствуют в диссертации, как уже Елена Геннадьевна сказала, спектры ЯМР, хотя в некоторых местах на них идет ссылка, что они как бы должны быть в приложении. Есть там неудачное выражение типа «анализ реакции» электрофорезом, хотя это анализ собственно продуктов, и такое выражение встречается практически во всем тексте диссертации. Вопросы, не буду, наверное, про

всякие неудачные выражения много рассказывать, Вопросы, какие у меня возникли. На 34 странице написано, что выходы элюции конъюгатов из геля зависят от степени замещения отцепляющего реагента. Вывод сделан, а собственно на каком основании, не совсем понятно. Хотелось бы уточнить этот момент, как же это было продемонстрировано. На странице 56 используются выражения «сильно модифицированные конъюгаты». В данном случае было непонятно, что значит «сильно», насколько «сильно», что они из себя представляют. Остальное относится, наверное, к неудачным выражениям, но все проведённые замечания не умаляют заслуг автора, поскольку работа сделана объёмная, интересная и вносит большой вклад в развитие этой области науки. В результате хочу сказать, что диссертационная работа соответствует критериям с новым положением присуждения ученых степеней, а сам диссертант Брылёв Владимир Анатольевич заслуживает присвоение степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 биоорганическая химия. У меня все. Спасибо.

**Мирошников А.И.:**

Спасибо, Дарья Сергеевна. Отвечайте.  
(Приглашает выступить диссертанта)

**Брылёв В.А.:**

Дарья Сергеевна, спасибо большое, что прооппонировали диссертацию и за конструктивную критику и замечания. Сейчас я отвечу на вопросы и замечания. Первый вопрос был по поводу наличия масс-спектров, ЯМР-спектров. Ну, я уточню, что, да, действительно, мы не стали включать сами изображения спектров в диссертацию. Но их расшифровки, они, конечно, полностью представлены в экспериментальной части к описанию синтеза каждого из соединений, поэтому, ну, мне кажется, тут достаточно этого материала. А картинки, да, я согласен, можно было бы добавить, тогда диссертация выглядела бы более проиллюстрированной в области синтеза этих соединений. Следующий вопрос был о выходах элюций олигонуклеотидных конъюгатов. О чем вопрос? Вопрос о том, что сначала синтезируются олигонуклеотидные конъюгаты, какие-то разветвленные, затем они разделяются с помощью препаративного электрофореза. И вот Дарью Сергеевну интересовал вопрос, как мы оценивали количество, которое образуется после уже всех процедур синтеза, очистки и выделения. Я написал, действительно такую фразу, мы это в статье более подробно рассмотрели, но я как-то в диссертации решил не уделять этому внимания, что просто с ростом размеров олигонуклеотидного конъюгата я заметил, что ему труднее выходить из геля, что, в принципе, логично, потому, что масса и размеры становятся больше, там, подвижность снижается, и, соответственно, при элюции тоже идут потери, потому, что не полностью удаётся извлечь тот продукт, который находится в геле. Собственно, вот это я и имел в виду, когда писал о том, что выходы зависят от структуры. Так, еще один вопрос был о сильно модифицированных олигонуклеотидах, разьясню. Да, это неудачное выражение, значит, должно быть что-то вроде полностью модифицированного, потому что речь шла о малых интерферирующих РНК, это как правило олигонуклеотиды, либо в виде морфолиновых производных, либо в виде каких-то производных по углеводной части, например, 2'-фторарабино производные, 2'-метокси, 2'-метоксиэтильные производные. В общем, имелось в виду это, что продукты, а именно олигонуклеотиды модифицированные, как по углеводной части, так может быть по азотистому основанию и по фосфатной группе в виде тиофосфатов. Со всеми остальными замечаниями я согласен, тут я уже не буду больше ничего дополнять.

**Мирошников А.И.:**

Спасибо. Ну что, открываем дискуссию? Да, пожалуйста.

**Генералова А.Н.**

Добрый день. Я была в составе комиссии, которая рекомендовала данную диссертацию к защите. И мне хочется сказать пару слов как раз об этой диссертации с точки зрения, что эта работа является результатом очень кропотливого труда, который позволил адаптировать методы клик-химии на основе азид-алкинового присоединения к получению разветвленных олигонуклеотидных конъюгатов на основе некой органической молекулы. То есть это можно даже рассматривать как какой-то универсальный инструмент получения таких конъюгатов. И авторам продемонстрировано развитие этих методов. То есть показано, что предложенные способы синтеза можно использовать для получения как димеров, так и тетрамеров циклической структуры. Кроме того, можно вводить различные флуоресцентные метки. И дальше это нужно использовать для получения конъюгатов с какой-то таргетной молекулой для многоцентрового мечения необходимых каких-то компонентов на поверхности клеточных, например, структур. И также этот подход, позволяет получать уже и тераностические агенты, когда вводится аптамерная молекула в качестве таргета, и лекарственная какая-то нагрузка, которая позволяет, может отщепляться в процессе ферментативной реакции. И вот это все как бы дает, имеет очень большое значение для дальнейшего развития и создания уже супрамолекулярных структур, что считается сейчас очень таким актуальным и перспективным направлением. И я призываю членов диссертационного совета голосовать за эту работу.

**Мирошников А.И.:**

Спасибо. Коллеги, кто еще хотел бы выступить?

Ну, вам заключительное слово.

**Брылёв В.А.**

Да. Ну, я хотел озвучить благодарности, более детально. Во-первых, я благодарю руководителя Владимира Аркадьевича Коршуна за то, что он, собственно, руководил моей работой. Благодарю состав диссертационного совета за то, что дали возможность выступить и доложить о своих результатах. Благодарю сотрудников нашей лаборатории – Ксению Сапожникову, Евгения Гуляка, Алексея Устинова. Также благодарю наших коллег из других организаций. Это Тимофей Зацепин, Клинов Дмитрий Владимирович, Баринов Николай, Цветков Владимир Борисович, Пронин Игорь Николаевич, Павлова Галина Валерьевна и наших коллег из Беларуси. Я также хотел поблагодарить фонд Минобрнауки, который частично профинансировал тоже выполнение этой работы. Благодарю Яковлеву Татьяну Игоревну за помощь в организации защиты и всех, кто как-то принимал участие в завершении этой работы. Спасибо.

*(Далее объявляется перерыв на голосование. Проходит тайное голосование)*

**Мирошников А.И.:**

Коллеги, пока идет подсчет голосов, давайте, если у кого-то есть замечания, по проектам заключений.

*(Проходит обсуждение проекта заключения совета. Диссертационный совет единогласно принимает заключение.)*

**Мирошников А.И.:**

Владимир Александрович, огласите, пожалуйста, результаты тайного голосования.

**Олейников В.А.:**

Счетная комиссия выполнила свою работу. Защита Брылёва Владимира Анатольевича на соискание степени кандидата химических наук. Присутствовало на заседании - 21 член диссертационного совета, роздано - 21 бюллетень, оказалось в урне - 21 бюллетень, «за» - 21, «против» и не действительных нет.

*(Проходит утверждение результатов работы счетной комиссии. Результаты работы счетной комиссии утверждены единогласно)*

**Мирошников А.И.:**

Спасибо! Поздравляем! Спасибо всем присутствующим! Заседание объявляю закрытым.

Председатель диссертационного совета  
академик, д.х.н.

Мирошников А.И.

Ученый секретарь диссертационного совета  
д.ф.-м.н.

Олейников В.А.

