



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: isinfo@eimb.ru
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

Чер. от 02.12.2024 № 12312-13/470

На № _____ от _____



«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора ИМБ РАН
доктор биологических наук
член-корреспондент РАН

В.А. Митькевич

«02» декабря 2024 г

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию **Брылёва Владимира Анатольевича** «Разработка подходов к синтезу разветвлённых функциональных олигонуклеотидных конъюгатов», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности: 1.4.9 – биоорганическая химия.

Актуальность избранной темы

Тема диссертационной работы Брылёва В.А. «Разработка подходов к синтезу разветвлённых функциональных олигонуклеотидных конъюгатов» является актуальной. Работа посвящена созданию разветвляющих модифицирующих реагентов и синтезу разветвлённых функциональных олигонуклеотидных конъюгатов, потенциально полезных для применения в диагностических и терапевтических задачах, а также в супрамолекулярной химии и нанотехнологии для создания простых дискретных ДНК-наноструктур.

Актуальность работы обусловлена тем, что большинство современных способов получения разветвленных олигонуклеотидных конъюгатов основаны на нековалентных подходах, использующих трех- и четырехходовые сочленения, либо на подходах, не позволяющих синтезировать конъюгаты с несколькими различными олигонуклеотидными последовательностями. На данный момент постсинтетические методы синтеза разветвленных

олигонуклеотидов с помощью биортогональных реакций мало представлены. Данная работа раскрывает потенциал применения биортогональных реакций и полиазидов в качестве разветвляющих реагентов, что позволяет получать конъюгаты различной стехиометрии и состава.

Цели и задачи исследования

Основной целью диссертационной работы является создание методологии биортогональных способов синтеза разветвлённых функциональных олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов. Для достижения поставленной цели предполагалось решение следующих задач:

1. Химический синтез ряда разветвляющих гидрофильных реагентов на основе пентаэритрита, содержащих от двух до четырех азидо-групп, способных вступать в биортогональную медь(I)-катализируемую реакцию азид-алкинового циклоприсоединения.
2. Отработка условий биортогональной клик-реакции, анализа и разделения разветвляющих реагентов.
3. Подбор условий твердофазной клик-реакции между азидом и алкин-модифицированными олигонуклеотидами для синтеза конъюгатов, содержащих разветвленные кластеры N-ацетилгалактозамина.
4. Синтез модифицированных олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов на основе аптамеров, содержащих ферментативно-отщепляемое противоопухолевое соединение – монометилауристатин E.

Научная новизна

Впервые получен гидрофильный тетраазид и показано его успешное применение в качестве ковалентного разветвляющего реагента. Разветвляющий реагент должен быть гидрофильным, содержать функциональные группы, подходящие для биортогонального конъюгирования. Разработанные новые подходы синтеза позволяют получать олигонуклеотид-олигонуклеотидные конъюгаты, в том числе модифицированные флуоресцентными красителями, кластерами N-ацетилгалактозамина, или ферментативно-отщепляемыми производными цитостатического агента монометилауристатина E. Разработан принцип дизайна «нанономеров», способных вступать в реакцию перегибридизации по механизму замещения последовательностей с образованием циклического тетрамера, простейшей динамической ДНК-наноструктуры. Впервые показано протекание мезо-реакции с образованием тетрамерной структуры из пары нанономеров.

Теоретическая и практическая значимость результатов

Методы получения олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов разнообразны, но наиболее трудными задачами оказываются контроль стехиометрии и простота выделения конечных целевых конъюгатов. Работа имеет теоретическую значимость: разработанные реагенты и подходы позволяют избежать накопления шибок (делеций) в конечном конъюгате за счет дивергентного подхода в синтезе олигонуклеотидных конъюгатов. В сравнении с разветвляющимися амидофосфитными реагентами, использование полиазидов открывает широкий спектр доступных стехиометрий конъюгатов, т.к. рост цепей может происходить последовательно. Стехиометрия конъюгатов регулируется соотношением реагентов.

Практическая значимость данной работы заключается в следующем: разработанный подход сборки простых дискретных ДНК-наноструктур может использоваться для создания более сложных динамических супрамолекулярных конструкций на основе ДНК; способ синтеза N-ацетилгалактозаминовых кластеров открывает более простой путь к синтезу олигонуклеотидных конъюгатов с таргетирующими GalNAc-кластерами; подход создания аптамерных конъюгатов с ферментативно-отщепляемой нагрузкой в виде цитостатического агента позволяет синтезировать простым и эффективным способом цитотоксические конъюгаты.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа Брылёва В.А. представляет собой завершённое исследование и состоит из списка сокращений, введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, благодарностей и списка литературы. Основная часть работы изложена на 108 страницах, включает 58 рисунков, 8 схем и 3 таблицы. Список цитируемой литературы включает 283 наименования.

Во введении автор кратко описывает историю развития методов получения разветвленных олигонуклеотидных конъюгатов и их применение, обосновывает актуальность и новизну выбранной темы. Автор обозначает практическую значимость данной работы, а также формулирует цель в виде разработки с помощью биоортогональных реакций удобных методов получения разветвленных олигонуклеотидных конъюгатов, применимых в качестве потенциальных терапевтических агентов, диагностических инструментов, или в качестве элементов динамических ДНК-наноструктур.

Литературный обзор содержит четыре раздела и посвящен рассмотрению способов получения, а также применения разветвлённых олигонуклеотидных конъюгатов. В первом разделе литературного обзора рассмотрены Разветвляющие реагенты для использования в твердофазном автоматическом олигонуклеотидном синтезе. Вторая часть литературного обзора посвящена синтезу олигонуклеотидов, содержащих разветвлённую N-ацетил-галактозаминовую

модификацию. В третьей части литературного обзора рассмотрены биортогональные реагенты и конъюгаты олигонуклеотидов на их основе. В последней части обзора литературы автор рассматривает синтез и применение разветвлённых конъюгатов аптамеров, а также делает заключение о необходимости развития постсинтетических методов синтеза конъюгатов олигонуклеотидов.

Следующая глава диссертации посвящена обсуждению собственных результатов и является логическим продолжением обзора литературы. Она начинается с подробного описания синтеза использованных в работе полиазидов. Далее на основе впервые синтезированных и охарактеризованных соединений автор описывает первые успешные попытки синтеза олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов. Для анализа стехиометрии получаемых конъюгатов используются методы аналитического электрофореза, а также высокоэффективная жидкостная хроматография. В следующем разделе обсуждения результатов описано получение конъюгатов с несколькими разными последовательностями, предложен способ синтеза димерных простых дискретных ДНК-наноструктур. На основе конъюгатов, содержащих различные двухцепочечные ДНК-дууплексы и свободные одноцепочечные фрагменты, автор показал возможность проведения мезо-реакции с образованием более крупной циклической тетрамерной ДНК-наноструктуры. В последних двух разделах обсуждения результатов основная работа была проведена с использованием нового тетраазидного реагента в качестве разветвляющего центра. Были получены конъюгаты, содержащие N-ацетилгалактозаминовые кластеры, потенциально обладающие таргетирующей способностью в клетки печени (гепатоциты). Также на основе тетразида получены аптамерные конъюгаты различного строения, описана их стехиометрия. Разветвленные конъюгаты использовались для получения производных с отщепляемым цитостатическим противоопухолевым агентом монометиладельтином E.

Материал, изложенный в этой главе, полностью отражает весь ход проделанной работы и выводы по диссертации.

Экспериментальная часть содержит подробное описание синтезов всех химических соединений, а также конъюгатов олигонуклеотидов и аптамеров. Применение и умелое использование современных и традиционных методов выделения, идентификации и анализа (^1H , ^{13}C ЯМР спектроскопии, масс-спектрометрии высокого разрешения и др.) обеспечивает высокую степень достоверности полученных данных.

Выводы, изложенные автором, обоснованы, соответствуют результатам исследования, поставленной цели и задачам, вынесенным на защиту, полученные результаты не вызывают сомнения.

Материалы, приведенные автором в приложениях, дополняют экспериментальную часть и позволяют убедиться в достоверности приведенных данных.

Резюмируя, можно сказать, что диссертация Брылёва В.А. выполнена на высоком методическом уровне.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации. Основные научные результаты диссертационной работы адекватно отражены в публикациях автора по теме работы, в том числе в шести научных статьях, опубликованных в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, а также в 10 тезисах всероссийских и международных конференций.

Вопросы и замечания:

1. На изображениях гелей отсутствуют маркеры длины ДНК, либо они не подписаны, что затрудняет оценку размера полученных продуктов.

2. В работе не описано, оценивалась ли противоопухолевая активность разветвленных конъюгатов аптамеров с отщепляемым противоопухолевым соединением монометилауристатином Е (ММАЕ). Также остается не понятным, как был выбран ферментативно-расщепляемый линкер для связывания конъюгатов олигонуклеотидов с ММАЕ.

3. В тексте диссертации содержатся опечатки, грамматические ошибки и неудачные выражения.

4. Рис. 49 содержит нечеткие изображения конъюгатов олигонуклеотидов.

Заключение

Таким образом, данная диссертационная работа соответствует всем требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями и дополнениями в последней редакции от 25.01.2024), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а сам Брылёв Владимир Анатольевич заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – Биоорганическая химия.

Межлабораторный коллоквиум лаборатории биологических микрочипов, лаборатории нуклеотид-модифицированных нуклеиновых кислот и лаборатории молекулярной диагностики ИМБ РАН считает, что диссертационная работа Брылёва Владимира Анатольевича «Разработка подходов к синтезу разветвлённых функциональных олигонуклеотидных конъюгатов», полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и рекомендует ее к защите по специальности 1.4.9 - «Биоорганическая химия».

Заключение принято по результатам проведения объединенного коллоквиума лаборатории биологических микрочипов, лаборатории нуклеотид-модифицированных нуклеиновых кислот и лаборатории молекулярной диагностики ИМБ РАН 02 декабря 2024 г. (протокол №4)

Отзыв на диссертационную работу Брылёва В.А. подготовлен ведущим научным сотрудником ИМБ РАН Чудиновым Александром Васильевичем.

Ведущий научный сотрудник
руководитель лаборатории нуклеотид-модифицированных нуклеиновых кислот
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН,
кандидат химических наук

 Чудинов А.В.

119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32

Тел.: +7(499)135-9850

E-mail: chud@imb.ru

Я, Чудинов Александр Васильевич, настоящим даю согласие на размещение моих персональных данных на официальном сайте ФГБУ ИБХ и в Федеральной информационной системе государственной научной аттестации, включение их в аттестационное дело соискателя и дальнейшую обработку.

 Чудинов А.В.

Подпись к.х.н. Чудинова А.В. удостоверяю

Ученый секретарь ИМБ РАН,

к.ф.-м.н. Коновалова Е.В.





« 02 » декабря 2024 года