

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Государственного научного центра Института биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН),
по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 18 декабря 2024 г. № 31

О присуждении **Брылёву Владимиру Анатольевичу** ученой степени кандидата
химических наук.

Диссертация «Разработка подходов к синтезу разветвлённых функциональных олигонуклеотидных конъюгатов» по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия принята к защите 16 октября 2024 г. (протокол заседания № 21) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН) (адрес: ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997) и действующим на основании Приказов Минобрнауки России №75/нк от 15.02.2013 г. и № 561 от 03.06.2021 г.

Соискатель Брылёв Владимир Анатольевич, 05 марта 1990 года рождения. 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 В.А. 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». С 2018 года - младший научный сотрудник Лаборатории молекулярного дизайна и синтеза ГНЦ ИБХ РАН.

Диссертация выполнена в лаборатории молекулярного дизайна и синтеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН).

Научный руководитель - доктор химических наук Коршун Владимир Аркадьевич, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярного дизайна и синтеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им.

академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН).

Официальные оппоненты:

Завьялова Елена Геннадьевна, доктор химических наук, доцент кафедры природных соединений химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, и **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), дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук в своем *положительном* отзыве, подписанном ведущим научным сотрудником, руководителем лаборатории нуклеотид-модифицированных нуклеиновых кислот к.х.н. Чудиновым Александром Васильевичем, и утвержденном зам. директора, д.б.н., чл.-корр. РАН Митькевичем Владимиром Александровичем, указала, что диссертация Брылёва Владимира Анатольевича «Разработка подходов к синтезу разветвлённых функциональных олигонуклеотидных конъюгатов» представляет собой законченную научно-квалификационную работу и соответствует всем требованиям «Положения о присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями, внесенными Постановлениями Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 26.05.2020 № 751, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 г. № 1690; от 26.01.2023 г. № 101; от 25.01.2024 № 62), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биорганическая химия.

Соискатель имеет 19 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 6 работ общим объемом 11 п.л. в рецензируемых научных изданиях, входящих в базы SCOPUS и Web of Science. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы, в которые Брылёв В.А. внес основной или существенный вклад:

1. **Брылёв В.А.**, Лысенко И.Л., Кокин Е.А., Мартыненко-Макаев Ю.В., Рязанцев Д.Ю., Шманай В.В., Коршун В.А. Олигонуклеотидные зонды типа «молекулярный маяк» с флуоресцеиновым бифлуорофором. *Биоорг. химия*, **47** (3), 365–372 (2021).
(Engl. transl.: **Brylev V.A.**, Lysenko I.L., Kokin E.A., Martynenko-Makaev Y.V., Ryazantsev D.Y., Shmanai V.V., Korshun V.A. Molecular beacon DNA probes with fluorescein bifluorophore. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **47** (3), 734–740 (2021).)
2. **Brylev V.A.**, Ustinov A.V., Tsvetkov V.B., Barinov N.A., Aparin I.O., Sapozhnikova K.A., Berlina Y.Y., Kokin E.A., Klinov D.V., Zatsepin T.S., Korshun V.A. Toehold-mediated selective assembly of compact discrete DNA nanostructures. *Langmuir*, **36** (49), 15119–15127 (2020).
3. Sapozhnikova K.A., Slesarchuk N.A., Orlov A.A., Khvatov E.V., Radchenko E.V., Chistov A.A., Ustinov A.V., Palyulin V.A., Kozlovskaya L.I., Osolodkin D.I., Korshun V.A.,

- Brylev V.A.** Ramified derivatives of 5-(perylene-3-ylethynyl) uracil-1-acetic acid and their antiviral properties. *RSC Adv.*, **9** (45), 26014–26023 (2019).
4. Farzan V.M., Ulashchik E.A., Martynenko-Makaev Y.V., Kvach M.V., Aparin I.O., **Brylev V.A.**, Prikazchikova T.A., Maklakova S.Y., Majouga A.G., Ustinov A.V., Shipulin G.A., Shmanai V.V., Korshun V.A., Zatsepin T.S. Automated solid-phase click synthesis of oligonucleotide conjugates: from small molecules to diverse *N*-acetylgalactosamine clusters. *Bioconjugate Chem.*, **28** (10), 2599–2607 (2017).
 5. Ponomarenko A.I., **Brylev V.A.**, Sapozhnikova K.A., Ustinov A.V., Prokhorenko I.A., Zatsepin T.S., Korshun V.A. Tetrahedral DNA conjugates from pentaerythritol-based polyazides. *Tetrahedron*, **72** (19), 2386–2391 (2016).
 6. Ponomarenko A.I., **Brylev V.A.**, Nozhevnikova E.V., Korshun V.A. Recent advances in self-assembled fluorescent DNA structures and probes. *Curr. Top. Med. Chem.*, **15** (13), 1162–1178 (2015).

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.х.н. Завьяловой Елены Геннадьевны. Отзыв положительный, содержит следующие замечания и вопросы:

1. В работе не приведены экспериментальные данные по цитотоксичности этих конъюгатов. Следующее замечание касается подтверждения структуры конъюгатов аптамеров с ММАЕ.
2. Рис.37 и 48 с данными атомно-силовой микроскопии представлены в тексте как визуализация собранных ДНК-наноконструкций, однако, данные на этих рисунках не подтверждают данные электрофореза и данные молекулярного моделирования.
3. Сборку ДНК-наноконструкций в данной работе проводили при низкой ионной силе, а именно в ТАЕ буфере (40 мМ трис, 20 мМ уксусной кислоты, 1 мМ ЭДТА), MES буфере и его производных с добавлением этилендиамина или солей магния. В литературе многократно описано, что для сборки ДНК-дуплексов нужна бóльшая ионная сила.
4. На стр. 43 диссертации описывается «добавление этилендиамина в качестве имитации Mg^{2+} » при сборке ДНК-наноконструкций. Есть ли аналогичные данные про этилендиамин?
5. Вопреки тексту, в работе нет данных, подтверждающих образование конкретной геометрии ДНК-наноконструкций, например, MN1 + MN2. Представленные методы оценивают размер конструкции, но не ее геометрию.
6. Стр. 37 содержит оценочное суждение, не подкрепленное экспериментальными фактами из предшествующего ему раздела 2.1.
7. Работа содержит много огрехов в оформлении рисунков и подписях к ним.
8. В тексте нет терминологического единообразия.
9. Текст диссертации и автореферата содержит немало опечаток и нуждается в тщательном вычитывании. Например: «клик-реакции», «биортогональный», «олигуклеотидом», «олигонуклеотидамы».

Отзыв официального оппонента к.х.н. Новопашинной Дарьи Сергеевны. Отзыв положительный, содержит следующие замечания и вопросы:

В диссертации отсутствуют ЯМР спектры, профили хроматографий и спектры флуоресценции полученных конъюгатов с флуоресцентными красителями. В подписях к рисункам, на которых изображены электрофореграммы, отсутствуют данные о способе визуализации олигонуклеотидов в геле. Выражение «анализ реакций» лучше заменить на «анализ продуктов реакции» (рис.26, стр.34; рис.27, стр.35; рис.29, стр.38; рис.32, стр.41; рис.39, рис.40, рис.43).

На странице 34 автор работы утверждает, что выходы элюции конъюгатов из геля зависят от степени замещения разветвляющего реагента. Как это продемонстрировано? Автору необходимо объяснить этот момент.

На странице 39 автор ссылается на приложение, которое в работе отсутствует.

На странице 56 автор использует выражение «сильно модифицированные конъюгаты», что автор подразумевает под этим выражением?

На странице 57 автор пишет «siRNA для нацеливания на белок», что с точки зрения РНК интерференции не верно, так как происходит воздействие на мРНК, кодирующую определенный белок. На мой взгляд не допустимо использование таких формулировок.

На странице 57 присутствует неудачное выражение «Luc является смысловой цепью siRNA люциферазы». Белок люцифераза не содержит в себе цепей РНК.

В подписи к схеме 7 на странице 62 автор ссылается на схему 2, но там нет той информации, о которой пишет автор.

В разделе 2.6 «Синтез разветвлённых конъюгатов EGFR-специфического аптамера, содержащих ферментативно-отщепляемый MMAE» автор сначала приводит синтез и доказательство строения конъюгатов аптамеров с MMAE, а потом обоснование почему выбран именно MMAE и конкретно этот расщепляемый линкер. На мой взгляд логичнее было бы это изложить в другом порядке.

Приведенные замечания не умаляют заслуг автора в выполнении хорошей научно-исследовательской работы, хотя и значительно затрудняют восприятие текста диссертации.

Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный, содержит следующие замечания и вопросы:

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 E (MMAE). Также остается не понятным, как был выбран ферментативно-расщепляемый линкер для связывания конъюгатов олигонуклеотидов с MMAE.
3. В тексте диссертации содержатся опечатки, грамматические ошибки и неудачные выражения.
4. Рис. 49 содержит нечеткие изображения конъюгатов олигонуклеотидов.

Отзыв на автореферат заведующего лабораторией дизайна и синтеза биологически активных соединений Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук, доктора химических наук Тимофеева Эдуарда

Николаевича. Отзыв положительный, содержит в основном замечания по стилистическому и грамматическому оформлению автореферата, а также вопросы о структурах модифицирующих реагентов (фосфорамидитов) и методах их синтеза.

Отзыв на автореферат научного сотрудника лаборатории молекулярной диагностики ГНЦ ИБХ РАН, кандидата биологических наук Стахеева Александра Александровича. Отзыв положительный, содержит в основном замечания по стилистическому и грамматическому оформлению автореферата, а также вопрос о потенциальном применении конъюгатов аптамеров с противоопухолевым соединением монометилауристатином E.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в области биоорганической и органической химии (химия нуклеиновых кислот, синтез модифицированных олигонуклеотидов и аптамеров, разработка модифицирующих реагентов), близких к тематике работы, которые подтверждены серией их публикаций в ведущих российских и международных журналах. Оппоненты и представители ведущей организации обладают большим опытом исследовательской и экспертной работы и высокой квалификацией, которые позволяют им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, а также ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований впервые получены и охарактеризованы новые гидрофильные ди-, три- и тетраазидные реагенты, использованные для синтеза олигонуклеотидных конъюгатов с помощью биортогонального медь(I)-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения. Новый подход на основе сочетания синтезированных разветвляющих реагентов и биортогонального медь-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения позволяет с высоким выходом синтезировать олигонуклеотид-олигонуклеотидные конъюгаты, в том числе модифицированные флуоресцентными красителями. Новый подход на основе последовательного присоединения олигонуклеотидов к разветвляющему реагенту позволяет регулировать стехиометрию конъюгатов изменением соотношения реагентов. Предложен новый твердофазный способ получения олигонуклеотидных конъюгатов с помощью разветвлённого тетразида, содержащих N-ацетилгалактозаминовые кластеры. Разработан метод получения аптамерных кластеров (на примере EGFR-специфического аптамера), конъюгированных с цитостатическим (противоопухолевым) агентом монометилауристатином E на ферментативно-расщепляемом линкере.

Теоретическая значимость исследования состоит в том, что разработанный набор молекулярных инструментов и подходов расширяет возможности в изучении химии нуклеиновых кислот, а также исследовании свойств и взаимодействий конъюгатов. Разработанные соискателем подходы и методы позволяют получать ДНК-наноструктуры, которые могут использоваться для изучения взаимодействия нуклеиновых кислот с крупными биомолекулами и низкомолекулярными соединениями. Разветвленные конъюгаты аптамеров позволяют изучать их активность, взаимодействия с поверхностными

антигенами клеток, а также исследовать зависимость аффинности конъюгатов от их структуры и стехиометрии.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики заключается в следующем: разработанный способ синтеза разветвленных олигонуклеотидных конъюгатов позволяет практически исключить ошибки в последовательностях крупных конъюгатов, которые чаще всего оказываются делециями; 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 к созданию аптамерных конъюгатов с ферментативно-отщепляемой нагрузкой в виде цитостатического агента позволяет синтезировать простым и эффективным способом цитотоксические конъюгаты.

Достоверность результатов исследования обеспечивается применением в исследованиях набора современных научных методов. Доказательство структур синтезированных соединений проводилось с помощью полного набора физико-химических методов исследования (одномерная ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия высокого разрешения, ИК-спектроскопия), экспериментальная часть содержит подробное описание всех методов. Обоснованность выводов диссертации базируется на анализе и обобщении результатов проведенных экспериментов и данных литературных источников по разрабатываемым проблемам, выводы диссертации отвечают поставленной цели и задачам исследования.

Личный вклад соискателя состоит в участии на всех этапах исследовательского процесса, непосредственном участии в выборе направления научной работы, разработке цели и задач исследования, получении исходных данных и разработке методов выделения изучаемых соединений, обработке и интерпретации экспериментальных данных, личном участии в апробации результатов работы на научных конгрессах и конференциях, подготовке основных публикаций по теме работы. Экспериментальные данные получены лично автором или при его непосредственном участии, за исключением регистрации спектров ЯМР и масс-спектров, а также проведения экспериментов по проточной цитометрии, молекулярному моделированию, атомно-силовой микроскопии. Молекулярное моделирование выполнено Цветковым В.Б., атомно-силовая микроскопия выполнены Клиновым Д.В. и Бариновым Н.А. Эксперименты на культурах клеток выполнены Рябухиной Е.В.

Исходя из вышеизложенного, диссертационный совет заключает, что диссертация Брылёва В.А. является законченной научно-квалификационной работой, результаты которой вносят заметный вклад в развитие биоорганической химии. Работа написана автором самостоятельно и содержит новые и актуальные научные результаты. Таким образом, диссертационная работа Брылёва Владимира Анатольевича «Разработка подходов к синтезу разветвлённых функциональных олигонуклеотидных конъюгатов», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9. – биоорганическая химия, соответствует всем требованиям,

предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации (от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 26.05.2020 № 751, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 г. № 1690; от 26.01.2023 г. № 101; от 25.01.2024 № 62).

В ходе защиты диссертации были высказаны следующие критические замечания:

1. В диссертации мало внимания уделено изучению цитостатической активности аптамерных конъюгатов по отношению к опухолевым клеткам, а также не приведена их характеристика масс-спектрометрией и другими методами, кроме высокоэффективной жидкостной хроматографии. 2. Атомно-силовая микроскопия полностью не подтверждает образование тетрамерной ДНК-наноструктуры из пары ДНК-нанономеров. 3. Нет терминологического единообразия, многие структуры имеют в обсуждении результатов несколько названий при описании их свойств и превращений. 4. Не приведены изображения спектров ядерного магнитного резонанса, масс-спектры и ИК-спектры. В описании методик присутствуют только расшифровки спектров. 5. Не описан способ оценки выходов разветвленных олигонуклеотидных конъюгатов после проведения реакций с полиазидами.

Соискатель Брылёв В.А. ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы и привел собственную аргументацию:

Вопрос: Как при сборке ДНК-тетрамера определили, что это действительно тетрамер?

Ответ: Ориентировались на маркеры молекулярного веса, хотя их подвижность не полностью коррелирует с подвижностью наноструктуры из-за значительного отличия в форме и пространственной организации. Также дизайн последовательностей нанономеров был выполнен так, чтобы из них собирался только тетрамер.

Вопрос: Оценивали ли биологические свойства и аффинность разветвленных конъюгатов?

Ответ: Да, оценивали аффинность с помощью флуоресцентно меченых аптамерных конъюгатов. Биологическую активность определяли с помощью МТТ-тестом на выживаемость клеток в присутствии разных концентрация разветвленных аптамерных конъюгатов с отщепляемым противоопухолевым соединением.

Вопрос: Почему для сборки дискретных ДНК-наноструктур использовали буферные растворы с низким содержанием соли?

Ответ: Потому что далее реакционные смеси требовалось анализировать с помощью электрофореза и атомно-силовой микроскопии. Большие концентрации соли могут препятствовать качественному разделению при электрофорезе в геле, а при приготовлении образцов на атомарно ровном графите соли могут выкристаллизовываться и препятствовать проведению микроскопии.

На заседании 18 декабря 2024 г. диссертационный совет постановил: за решение задачи по разработке подходов к синтезу разветвлённых функциональных олигонуклеотидных конъюгатов присудить **Брылёву Владимиру Анатольевичу** ученую степень кандидата химических наук. При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 9 докторов наук (отдельно по научной специальности рассматриваемой диссертации 1.4.9. - Биоорганическая химия), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 21, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель

диссертационного совета

академик РАН Мирощников А.И.

Ученый секретарь

диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

18 декабря 2024 г.

