

**Отзыв официального оппонента, доктора химических наук
Завьяловой Елены Геннадиевны, на диссертационную работу
Брылёва Владимира Анатольевича «Разработка подходов к синтезу разветвлённых
функциональных олигонуклеотидных конъюгатов», представленную к защите на
соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности
1.4.9. – «биоорганическая химия»**

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа имеет традиционную структуру и состоит из разделов «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Обсуждение результатов», «Экспериментальная часть», «Выводы», «Благодарности», «Список литературы» и «Приложения». Работа изложена на 108 страницах, содержит 58 рисунков, 8 схем, 3 таблицы. Список литературы содержит 283 источника.

Во введении кратко обоснована актуальность исследования, обозначены цели и задачи работы, ее научная новизна и практическая значимость, а также описаны основные методы исследования и суммированы основные положения, выносимые на защиту. Последние сформулированы корректно и соответствуют поставленным целям работы. Также приведена информация об апробации результатов работы на конференциях и публикации их в рецензируемых научных изданиях.

В обзоре литературы рассмотрены основные подходы для создания разветвленных функциональных конъюгатов, включая такие подходы как использование разветвляющих реагентов во время твердофазного автоматического олигонуклеотидного синтеза или пост-синтетических процедур. Отдельно рассмотрены подходы, включающие использование биоортогональных реакций.

Глава 2 Результаты и Обсуждение содержит исчерпывающие детали о синтетических процедурах, а также идентификации полученных соединений. Рассмотрены способы очистки и выделения продуктов реакций из сложных смесей. Детально обсуждается оптимизация методик для получения моно-, би-, три- или тетрамерных конъюгатов олигонуклеотидов. Приведены примеры сборки ДНК-наноконструкций из димерных конъюгатов олигонуклеотидов.

Экспериментальная часть содержит исчерпывающее описание синтетических процедур.

Выводы, сделанные автором по результатам работы, не вызывают сомнений, подтверждены экспериментальными данными и соответствуют целям и задачам исследования.

Список литературы содержит достаточное количество релевантных источников.

В приложении представлены одномерные и двумерные спектры ЯМР полученных соединений.

Замечания к диссертационной работе

При ознакомлении с диссертационной работой и авторефератом возникло несколько замечаний. Далее приведен список замечаний, составленный в порядке убывания их значимости:

1. Пункт 6 положений, выносимых на защиту, имеет следующую формулировку: «Получен ряд разветвленных конъюгатов на основе EGFR-специфического аптамера, содержащих в своем составе от 1 до 3 молекул противоопухолевого соединения монометилауристатина E. Конъюгаты обладают цитотоксическим действием». Однако, в работе не приведены экспериментальные данные по цитотоксичности этих конъюгатов. В экспериментальной части отсутствует описание экспериментов по определению цитотоксичности. В разделе «2.6. Синтез разветвлённых конъюгатов EGFR-специфического аптамера, содержащих ферментативно-отщепляемый MMAE» приведено лишь обсуждение эксперимента по определению цитотоксичности с оценочными суждениями об эффективности, такими как «хороший ответ», «более мощная активность» и «практически неэффективен», либо размытыми формулировками, например, «приблизительно наномолярная величина» вместо конкретных значений в виде графика или таблицы. Отсутствие экспериментальных данных, подкрепленных положительными и отрицательными контролями (они даже вскользь не упоминаются), не позволяет сделать вывод о том, что «конъюгаты обладают цитотоксическим действием». На мой взгляд, эта фраза в положении 6 является лишней. Выводы о сделанной работе сформулированы корректнее, а именно, вывод 4: «Разработан метод получения аптамерных кластеров (на примере EGFR-специфического аптамера), конъюгированных с цитостатическим (противоопухолевым) агентом монометилауристатином E на ферментативнорасщепляемом линкере».
2. Следующее замечание касается подтверждения структуры конъюгатов аптамеров с MMAE. В экспериментальной части указывается, что идентификацию проводили ESI MS, однако, этих данных нет ни в главе 2, ни в приложении.

3. 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. Видно большое количество объектов разной структуры, что указывает на отсутствие единообразно собранных структур или хотя бы превалирования какой-либо из собранных структур. Возможно, условия съемки АСМ стоило дополнительно оптимизировать под данный объект. Возможно, межмолекулярные структуры были нестабильны и разрушились во время анализа.
4. 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, которая увеличивает стабильность дуплексов примерно на 10°C. Например, в статье Woo и Rothmund 2014 года (Woo, S., Rothmund, P. Self-assembly of two-dimensional DNA origami lattices using cation-controlled surface diffusion. *Nat Commun* 5, 4889 (2014)) с помощью АСМ показано, что сборка ДНК-оригами оптимально происходит в буфере, содержащем и Na^+ (не менее 0,15 М) и порядка 10 мМ MgCl_2 . Буфер ТАЕ или ТВЕ используют для разделения ДНК, но они неоптимальны для сборки ДНК-наноконструкций.
5. На стр. 43 диссертации описывается «добавление этилендиамина в качестве имитации Mg^{2+} » при сборке ДНК-наноконструкций. Не ясно, как этилендиамин может быть имитацией Mg^{2+} , поскольку смысл добавления катионов магния к нуклеиновым кислотам – координация фосфатных групп, изменение конформации, стабилизация вторичной структуры. Есть ли аналогичные данные про этилендиамин?
6. Вопреки тексту, в работе нет данных, подтверждающих образование конкретной геометрии ДНК-наноконструкций, например, $\text{MN1} + \text{MN2}$. Представленные методы оценивают размер конструкции, но не ее геометрию, а АСМ не показала полноценную сборку циклического продукта. Димерная конструкция явно видна в электрофорезе, но циклическая она или нет? Как отличить циклический продукт от нециклического димера?
7. Стр. 37 содержит оценочное суждение, не подкрепленное экспериментальными фактами из предшествующего ему раздела «2.1. Разветвляющие реагенты на основе пентаэритрита»: «Очевидно, что в случае необходимости достаточно просто могут

быть получены конъюгаты другого состава, в частности, [1+1+1], [2+2], [2+1+1] и [1+1+1+1]».

8. Работа содержит много огрехов в оформлении рисунков и подписях к ним. Так на многих гелях отсутствуют маркеры длины ДНК, а если присутствуют, то не подписаны, что затрудняет оценку размера полученных продуктов. Рис.24 автореферата (он же Рис.49 диссертации) содержит едва различимые схемы ДНК-наноконструкций. Рис.26 автореферата (он же Рис. 51 Диссертации), подписанный как «Доказательство сборки тетрамера по механизму замещения последовательности» не содержит доказательств, это предполагаемая схема сборки, в лучшем случае – схема эксперимента, который автор рассматривает как доказательство сборки. Рис.31 автореферата в подписи содержит фразу «щелчок алкина-GR20 с тетраазидом», в то время как в диссертации этот же рисунок (Рис. 56) подписан аккуратнее: «клик-реакция алкин-GR20 с тетраазидом в молярном соотношении 3:1», а по смыслу это реакционная смесь или продукты клик-реакции. Аналогичное замечание к подписи Рис.32 автореферата (Рис. 57 диссертации) «Типичный профиль ВЭЖХ клик-реакции».
9. В тексте нет терминологического единообразия: для обозначения гомодимеров и гетеродимеров (или гомотримеров и гетеротримеров, гомоолигомеров и гетероолигомеров) олигонуклеотидов используются самые разные названия, которые местами звучат неуместно. Например, 1) «гомогенные и гетерогенные разветвленные олигонуклеотид-олигонуклеотидные конъюгаты» - термины гомогенность и гетерогенность обычно употребляют для указания наличия одного или нескольких фазовых состояний в системе, чего нет в описываемых объектах; 2) *трис-продукт и тетра-продукт* - в целом можно было бы использовать, но нет даже пары предложений, объясняющих что именно имеется в виду; 3) *тетраakis-продукты* – в чем отличие от тетра-продуктов?; 4) *V-образные гомогенные конъюгаты* – если перерисовать схему, то V-образный станет линейным, почему он именно V-образный?
10. Текст диссертации и автореферата содержит немало опечаток и нуждается в тщательном вычитывании. Например: «клик-рекакции», «биортогональный», «олигуклеотидом», «олигонуклеотидамы». В некоторых местах, похоже, имел место неудачный перевод. В экспериментальной части реакционную смесь промывали рассолом (стр.72). В подписи к Рис. 49 диссертации (Рис.25 автореферата) указывается некий «валентный промотор одноцепочечной ДНК». Почему промотор?

Почему валентный? Судя по схеме речь идет об одном из олигонуклеотидов, а не о промоторе.

Приведенные замечания не умаляют значимость синтетической части работы Брылева В.А., в которой убедительно показана возможность получения гомо- и гетероолигомерных конъюгатов ДНК-олигонуклеотидов. Разработанные подходы могут найти применение при конструировании ДНК-наноконструкций.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Брылёва Владимира Анатольевича «Разработка подходов к синтезу разветвлённых функциональных олигонуклеотидных конъюгатов» соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. № 1539; 26.09.2022 г. № 1690; 26.01.2023 г. № 101; 25.01.2024 № 62), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – Биоорганическая химия.

Официальный оппонент

Завьялова Елена Геннадиевна

доцент кафедры природных соединений

химического факультета

Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Доктор химических наук

Шифр специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия»

Адрес: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1

Тел. +7 (495) 939-54-18

E-mail: zlenka2006@gmail.com

