

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Жаркова Тимофея Дмитриевича

«РАЗВИТИЕ ПОДХОДА К ПОЛУЧЕНИЮ

ТРИАЗИНИЛАМИДОФОСФАТНЫХ МОДИФИЦИРОВАННЫХ

ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, ОСНОВАННОГО НА РЕАКЦИИ

ШТАУДИНГЕРА С ПРИМЕНЕНИЕМ АЗИДО-ТРИАЗИНОВ»»,

представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия

Актуальность исследования

Модифицированные олигонуклеотиды находят широкое применение в биотехнологии, молекулярной биологии и медицине. В отличие от природных олигонуклеотидов, их модифицированные аналоги могут быть более устойчивы к ферментативному расщеплению, обладать повышенной способностью проникать в клетку, кроме того, модифицирование позволяет модулировать селективность и эффективность взаимодействия с целевыми мишенями. Особенно привлекательными модификациями является те, которые могут быть адаптированы для использования в стандартном автоматическом фосфитамидном синтезе олигонуклеотидов. В этой связи, ставшее целью диссертационной работы Жаркова Т.Д. систематическое исследование возможности разработки эффективного подхода к модифицированию олигонуклеотидов введением по атому фосфора замещенных триазиниламидофосфатных фрагментов является важным и актуальным.

Объем и структура работы.

Диссертационная работа изложена на 152 страницах, включая 6 приложений, в которых приведены данные масс-спектрометрического анализа реакционных смесей гетероолигонуклеотидов, а также дополнительные материалы для нескольких экспериментов, проводившихся

коллегами автора. Работа построена традиционным способом и состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, главы, посвященной обсуждению результатов, заключения и выводов, а также списка цитируемой литературы, насчитывающего 177 источников.

Литературный обзор посвящен описанию типов модифицированных по различным положениям олигонуклеотидов и основным подходам к их получению. Обзор написан хорошо и очень полезен и для полноценного введения читателя в тему исследования, и для постановки задач диссертационной работы.

В **экспериментальной части** описываются методы исследований и приводятся данные, необходимые для анализа полученных автором результатов и проверки их достоверности. Высокая достоверность полученных результатов и выводов обоснована применением комплекса современных научных экспериментальных подходов.

В главе «**Результаты и обсуждение**» приведены описание и анализ основных результатов, полученных автором.

На первом этапе автором были протестированы различные варианты получения азидо-триазинов и триазиниламидофосфатных групп и оценена эффективность получения с их использованием по реакции Штаудингера модельных олигонуклеотидов, в качестве которых были выбраны олиготимидилаты. Проведенные работы позволили выявить условия введения замещенных по 4-му и 6-му положениям 2-азидо-1,3,5-триазинов, показано значительное влияние степени замещения атомов хлора и типа введенных заместителей в исходном 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазине на ход присоединения. Обнаружено, что важным является включение в синтетическую схему этапа β -элиминирования 2-цианоэтильной группы, ведущего к образованию стабильной амидофосфатной формы.

С использованием полученных данных, Жарковым Т.Д. впервые синтезирована большая библиотека функционализированных триазиниламидофосфатных модельных олигонуклеотидов. Показана

принципиальная возможность многостадийной пост-модификации, позволяющей получать разнообразные сложные продукты. На примере 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина продемонстрирована возможность применения разработанного подхода для введения модификаций в состав различных гетероолигонуклеотидов и некоторых 2'-модифицированных олигонуклеотидов. С применением 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов были получены триазиниламидофосфатные олигонуклеотиды с несовпадающими заместителями в 1,3,5-триазиновом ядре. Важно, что использование в качестве функционализирующего агента 2-азидо-4-метиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина позволяет вводить модификацию в полностью автоматическом режиме, значительно повышая удобство проведения процесса и потенциально облегчая трансляцию разрабатываемого подхода в практику.

Проведенное исследование физико-химических свойств некоторых полученных триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов показало их высокую устойчивость к ферментативной деградации, а также к сильноокислым или сильнощелочным растворам. Была обнаружена лишь незначительная дестабилизация дуплексов, полученных с использованием модифицированных олигонуклеотидов, величина которой зависела от количества и расположения введенных модификаций.

Показано, что введение двух додецильных заместителей в 1,3,5-триазиновый фрагмент позволяет резко повысить проникновение модифицированных олигонуклеотидов в клетку, что может быть связано и с продемонстрированной способностью таких модифицированных олигонуклеотидов образовывать мицеллы.

Заклучение и выводы обобщают полученные результаты и полностью подтверждаются приведенными данными.

Научная новизна и практическая значимость результатов связаны, прежде всего, с впервые проведенным систематическим исследованием синтетических возможностей введения замещенных 2-азидо-1,3,5-триазинов

в олигонуклеотиды по реакции Штаудингера. Выявленные возможности и ограничения метода позволяют подобрать подходящую синтетическую стратегию для получения того или иного целевого модифицированного олигонуклеотида. Потенциально высокое практическое значение имеет и продемонстрированная возможность введения модификации в полностью автоматическом режиме, что значительно повышает удобство проведения процесса. Изучение некоторых свойств модифицированных олигонуклеотидов позволило выявить и возможные направления практического использования разрабатываемых систем, включая облегчение проникновения модифицированных олигонуклеотидов в клетку.

Достоверность и обоснованность результатов

Достоверность результатов обусловлена применением комплекса современных методов исследования и не вызывает сомнений. Выводы обоснованы и полностью основаны на полученных данных. Основные результаты исследований приведены в 4 статьях, опубликованных в рецензируемых научных журналах, индексируемых Web of Science и Scopus и рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, и были представлены на значительном количестве конференций. Практическая значимость работы подтверждается и получением патента РФ на созданные конструкции.

Публикации полностью отражают основное содержание диссертации. Содержание автореферата соответствует основным идеям и выводам диссертации. Работа хорошо написана, легко читается и содержит минимальное количество опечаток и неудачных выражений.

Замечания

Работа лишена принципиальных недостатков, тем не менее, при прочтении возникли следующие вопросы:

1. Автору стоило конкретно описать, что точно было известно по итогам «первых пилотных экспериментов с использованием 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина, проведенных в лаборатории ранее».

2. Есть ли объяснение, почему в случае замещенного октатимидилата на хроматограмме ВЭЖХ (рис. 37) наблюдалось два пика от предполагаемых диастереомеров, а для аналогичного производного пентатимидилата (рис. 36) – только один?
3. В Таблице 1 приведены данные по конверсии олигонуклеотидов в целевые производные, но насколько селективно протекали эти процессы? Наблюдалось ли образование продуктов, отличных от «целевых соединений»?
4. В работе часто употребляется фраза «повышение параметров реакции». Хотя из контекста и понятно, что речь идет об ужесточении условий, сама по себе формулировка не удачна и не однозначна.
5. Для известных соединений стоило сопоставить спектры ЯМР ^1H с литературными данными. Действительно ли автора записывали эти спектры и на давно выведенном из эксплуатации ЯМР спектрометре «Bruker AC 200»?
6. При приведении данных масс-спектров нередко масса наблюдаемого иона несколько отличалась, причем и в меньшую, и в большую сторону, от теоретически рассчитанного значения. Стоило бы сопроводить эту информацию соответствующими объяснениями.

Видно, что все приведенные выше замечания носят технический или дискуссионный характер и не затрагивают существа работы.

Заключение

Представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук диссертация Жаркова Тимофея Дмитриевича выполнена на высоком научном уровне и является завершенной научно-квалификационной работой, в которой решена важная задача по разработке нового варианта получения модифицированных олигонуклеотидов, широко востребованных в современных науке и медицине.

