ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени доктора химических наук Мещаниновой Марии Ивановны на тему: «Подходы к твердофазному синтезу конъюгатов олигорибонуклеотидов и их структурных аналогов как эффективных инструментов молекулярно-биологических исследований» по специальности 1.4.9 – «биоорганическая химия»

Актуальность темы диссертационной работы

Амидофосфитный метод за последние полвека стал золотым стандартом в твердофазном синтезе олигонуклеотидов, хотя и не является безальтернативным (комбинируемый с ним Н-фосфонатный метод удерживает нишу в синтезе олигонуклеотидных производных). Может показаться, что технология амидофосфитного синтеза доведена, если не до совершенства, то до некоего предела оптимизации. В действительности предел четко не очерчен для протяженных рибоолигонуклеотидов, в особенности – несущих модификации сахарофосфатного остова. Само прояснение возможностей метода применительно к таким олигомерам – значимый вопрос. Хотя набор рекомендуемых активаторов, защитных групп и проч. практически не менялся на протяжении десятилетий и может считаться стандартизованным, показатели эффективности синтеза не вполне прогнозируемы, т.к. зависят от особенностей технической реализации (конструкции синтезатора). С появлением современного отечественного синтезатора вопрос обретает особую остроту. Для оценки целесообразности дальнейшего расширения импортозамещения в области синтетических нуклеиновых кислот он является краеугольным камнем.

В зарубежной литературе последние годы обсуждаются перспективы безматричного ферментативного синтеза олигонуклеотидов с использованием нуклеотидилтрансфераз. Хотя его отработка и масштабирование находятся на зачаточном этапе, в числе потенциальных преимуществ перед амидофосфитным твердофазным синтезом отмечают возможность получения протяженных олигомеров. Высказываются аргументы в пользу того, что прогресс в биотехнологии сделает такой подход рентабельным. Однако, при этом упускают из виду ключевое преимущество классической твердофазной схемы. Речь о возможности конъюгации олигомера с ненуклеотидными компонентами и введения модификаций остова/оснований непосредственно в процессе автоматического синтеза или постсинтетически. Такая возможность обусловлена наличием богатейшего, хотя и не полного, арсенала коммерчески доступных реагентов и методов введения ортогональных группировок. При их описании Мария Ивановна использует вполне уместную аналогию с конструктором для сборки конъюгатов олигонуклеотидов и функциональных молекул (ФМ). Дополнение данного конструктора и демонстрация его возможностей – чрезвычайно актуальная глобальная задача, решение которой в некотором смысле определит вектор развития олигонуклеотидных технологий.

Научная новизна и практическая значимость полученных результатов

Результаты работы Марии Ивановны существенно дополняют набор подходов к введению ФМ в олигонуклеотид, в особенности – к получению конъюгатов терапевтических олигонуклеотидов с адресующими молекулами. Мария Ивановна систематизировала известные подходы, основываясь на комбинациях ортогональных групп и типах реакций, а затем дополнила классификацию, сместив акцент в сторону биохимии и молекулярной биологии с учетом применения конъюгатов. В частности, акцент был сделан на стабильных и деградируемых связях ФМ с олигонуклеотидами. Выбор наиболее стабильных конъюгатов в ряде случаев позволяет улучшить фармакокинетические характеристики терапевтических олигонуклеотидов, добиться желаемого биораспределения. При этом важно избегать негативного влияния ФМ на гибридизационную способность и иные сиквенс-специфические свойства олигонуклеотида, т.е. разделять функциональные части конъюгата за счет адекватного подбора линкера. Предложенные Марией Ивановной стратегии синтеза как раз допускают вариабельность линкеров, что упрощает дальнейший скрининг и структурно-функциональный анализ. Контролируемая деградация конъюгатов требует наличия связей, чувствительных к внешнему стимулу (например, облучению) или параметрам среды (например, pH), что может использоваться для программируемого высвобождения олигонуклеотида в модельных условиях или в целевом клеточном компартменте.

В рамках первого направления (получение устойчивых конъюгатов с вариабельным линкером) предложена стратегия синтеза липофильных производных малых интерферирующих РНК (потенциально – любых нуклеиновых кислот), которая опирается на описанную ранее в литературе комбинацию амидофосфитного и H-фосфонатного методов. Интересной авторской находкой видится получение фосфонатов липофильных соединений с варьируемым аминоспиртовым спейсером. Удобство использования и хранения липофильных фосфонатов позволяет рассматривать их как линейку практически готовых модификаторов для повышения мембрантропности интересующих исследователя олигонуклеотидов, т.е. как потенциально востребованный блок «конструктора». Также в рамках первого направления разработаны протоколы получения устойчивых конъюгатов за счет активации олигонуклеотида на твердой фазе дисукцинимидилкарбонатом для дальнейшего присоединения ФМ через спейсер заданной длины, зачастую выбираемой *in situ*. В рамках второго направления разработаны подходы к получению конъюгатов с кислотолабильными гидразоновыми и фосфамидными связями. Отщепление адресующей или мембранотропной ФМ предусмотрено после эндоцитоза конъюгата по мере созревания эндосомы и слияния с лизосомой. Хотя принцип программируемого высвобождения терапевтических олигонуклеоидов из конъюгатов известен и хорошо себя зарекомендовал, стратегии синтеза лабильных конъюгатов являются оригинальными и имеют высокую фундаментальную значимость.

Практическая значимость полученных результатов раскрывается в последнем разделе главы 2, где обобщены стратегии применения конъюгатов и модифицированных рибоолигонуклеотидов, включая подавление генной экспрессии с помощью siRNA повышенной устойчивости и направленную доставку siRNA, а также активацию интефероного сигналинга первого типа с помощью модифицированных двухцепочечных РНК, получение инструментов редактирования генома с возможностью управляемой

активации за счет использования crRNA и sgRNA с фоточувствительными линкерами, направленную доставку агентов борнейтронзахватной терапии и проч. Разработанные протоколы введения меток и иных модификаций в РНК также нашли применение в создании молекулярных инструментов для структурно-функциональных исследований РНК-белковых комплексов – например, компонентов рибосом в рамках прояснения отдельных аспектов трансляции. Таким образом, востребованность оригинальных стратегий получения модифицированных/меченых/конъюгированных с ФМ олигонуклеотидных производных несомненна.

Краткая характеристика структуры и содержания работы

Диссертация построена традиционно. Во введении изложены цель и задачи работы, обоснована ее актуальность, раскрыта новизна, охарактеризована значимость и сформулированы положения, выносимые на защиту. Первая глава представляет собой обзор литературы, в котором обобщены «пресинтетический» и «постсинтетический» подходы к введению функциональных групп и ФМ в олигонуклеотиды. При рассмотрении первого акцент сделан на использовании коммерчески доступных модификаторов, совместимых с амидофосфитным методом автоматического синтеза; также приводятся репрезентативные примеры оригинальных (lab-made) модификаторов. Выделены три группы модификаторов – носители для введения ФМ или функциональной группы по 3'-коннцу, терминирующие фосфитамиды для модификации 5'-конца и внутрицепочечные модификаторы. Подходы и стратегии постсинтетической модификации олигонуклеотидов классифицированы по типу ключевой реакции сочетания и включают как типичные для химии биоконъюгатов сочетания (активированная карбоксильная группа/амин; тиол/малеимид; азид/алкин и др.), так и сочетания, сравнительно часто применяемые именно в олигонуклеотидной химии. Примером последних служит получение фосфамидов по реакции Аттертона-Тодда, т.е. при взаимодействии амина с фосфонатом в ходе фосфонатного синтеза, или по реакции Штаудингера, т.е. при взаимодействии азида с цианоэтилфосфитом в ходе амидофосфитного синтеза.

Вторая глава («Результаты и обсуждение») содержит 6 разделов. В первом отражена адаптация и оптимизация протоколов фосфитамидного синтеза для получения средних по длине и протяженных олигорибонуклеотидов или их модифицированных производных. Разделы 2-5 посвящены стратегиям получения 5'-конъюгатов олигонуклеотидов. В разделе 2 описаны конъюгаты с липофильными ФМ, присоединными через алифатический линкер на основе аминоспирта. Интересно, что ФМ предложено вводить в олигонуклеотид на твердой фазе в виде фосфонатов, т.е. за счет переключения с амидрофосфитного на Н-фосфонатный протокол на последнем этапе синтеза. Это отчасти отсылает к описанным в литературе стратегиям комбинирования амидофосфитного и фосфонатного подходов, но идея создания линейки готовых липофильных фосфонатов полностью оригинальна. В третьем разделе описано введение ФМ через кислотолабильную гидразоновую связь путем конъюгации альдегид-модифицированного олигонуклеотида с гидразидным производным ФМ с промежуточным выделением альдегидсодержащего олигонуклеотида и без промежуточного выделения (на твердой фазе). Выбор оптимального варианта определяется несколькими факторами, включая соотношение растворимостей олигонуклеотида и ФМ-гидразида в водной и органической фазах, т.е. природой ФМ. В четвертом разделе представлены протоколы функционализации находящегося на твердой фазе

олигонуклеотида дисукцинимидилкарбонатом (фактически – одностадийный перевод концевой гидроксильной группы в активированную карбоксильную) и варианты дальнейшей функционализации/конъюгации с амино-содержащими линкерами и ФМ. Пятый раздел посвящен присоединению ФМ по 5'-концу олигонуклеотида через фосфамидную связь за счет взаимодействия амино-ФМ с активированным концевым остатком фосфата. Этот метод не дублирует описанные в литературе варианты фосфамидной модификации на твердой фазе, т.к. относится к постсинтетическим. В заключительном шестом разделе собраны примеры использования предложенных синтетических стратегий и полученных конъюгатов. В третьей главе («Экспериментальная часть») перечислены использованные материалы и реактивы с указанием производителей (первый раздел); описаны основные использованные методы, включая методы удаления защитных групп, хроматографической очистки/анализа олигонуклеотидов и очистки/анализа с помощью гель-электрофореза и др. (второй раздел); приведены все протоколы синтеза (третий раздел). Новые соединения охарактеризованы данными ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии, методики достаточно детальны. Все результаты коротко обобщены в главе «Заключение». Выводы, сделанные на основании полученных результатов, корректны, обоснованы и отражают содержание диссертации.

Общая характеристика и замечания

Диссертационная работа Мещаниновой М.И. – зрелое и масштабное исследование. При общем высоком уровне можно отметить несколько спорных моментов и мелких неточностей.

1) Первый раздел главы «Результаты и обсуждение» посвящен разработке протоколов синтеза средних по длине и протяженных олигонуклеотидов и их аналогов. В общем виде протокол полностью укладывается в стандартную схему фосфитамидного твердофазного синтеза (сравните Рис 2.1.1 с Рис. 1.1. из обзора литературы). Раз так, вместо «разработки» корректно говорить об оптимизации протокола для получения олигонуклеотидов и их аналогов на отечественном синтезаторе. Действительно, на стр. 85 Мария Ивановна сама позиционирует свои действия как оптимизацию. Однако, этот термин предполагает четкие критерии успеха/неуспеха. Сам факт получения протяженных рибоолигонуклеотидов может считаться колоссальным успехом в отсутствие готовых решений от действующих на российском рынке компаний. Автор уделяет данному вопросу внимание во введении, но оставляет недосказанность. Упомянуты заявленная отечественными компаниями максимальная длина до 150-200 звеньев и возможность включения рибо-звеньев, но не прописано четко, сочетаются ли эти условия в рамках одного предложения, что размывает критерии оптимизации, касающиеся длины и модификаций остова. Условия для выбора альтернативного критерия – по общему выходу олигонуклеотида или эффективности 1 цикла – приведены в Таблице 2.1.1. Там указаны максимально возможные выходы (без потерь на стадии очистки). Приближение к максимуму (путь даже в узком диапазоне длин и загрузок) вкупе с демонстрацией воспроизводимости можно было бы трактовать как оптимизацию общего протокола, но данных для этого нет. Подводя промежуточные итоги на стр. 90, автор указывает выходы 85-97% на стадию и общие выходы 10-25% для олигонуклеотидов от 10 до 100 звеньев. Читателю остается сравнить это качественно с данными в Таблице 2.1.1 и интерпретировать на основании собственной инженерной интуиции. Вероятно, Марии Ивановне стоило

структурировать собственные данные сообразно Таблице 2.1.1., т.к. интегральное сравнение по всему диапазону длин просто невозможно.

2) Мария Ивановна не приводит данные по выходам для представленных на Рис. 2.1.2 120-меров. Из Рис. 2.1.2а косвенно следует, что 100 звеньев – некая критическая длина, превышение которой сопровождается сравнительно резким падением эффективности синтеза. Если это так, стоило раскрыть тезис, проверить воспроизводимость на нескольких последовательностях, обсудить вероятные причины. Если критической длины нет – какую информацию читатель должен извлечь из Рисунка 2.1.2? Я вижу из электрофореграмм только то, что олигонуклеотиды присутствуют. Для подтверждения длин не хватает маркера, для подтверждения чистоты – профилей интенсивности окрашивания полос с интегралами. Тритилограммы доказывают эффективность синтеза в пределах 87 звеньев; наиболее интересный диапазон длин остался за кадром.

3) Если принять тезис про возможность получения протяженных рибоолигонуклеотидов как ключевой критерий успеха первого раздела, во Введении стоило раскрыть ценность таких олигомеров. Мария Ивановна акцентирует внимание на терапевтически значимых коротких олигомерах (Таблица 1), ценность протяженных не раскрыта. Вопрос важен в контексте Раздела 2.1. Подводя итоги раздела на стр. 90, Мария Ивановна апеллирует к опубликованным примерам использования олигонуклеотидов, полученных по разработанным протоколам. Большинство этих олигонуклеотидов – короткие (19-23-звенные siRNA, 22-звенные индукторы интерферонового сигналинга, 22-звенные антисмысловые олигонуклеотиды) или средние (38-звенные антирепликативные РНК, 46-звенные синтетические фрагменты мРНК; 68-звенные аналоги дцРНК). Лишь sgRNA немного превышают по длине 100 нт. Стоило обсудить условия, при которых в технологии CRISP-Cas востребованы именно синтетические sgRNA, а не полученные in vitro-транскрипцией ДНК-матрицы, собранной из коротких олигомеров. Это упоминается, но лишь в последнем разделе главы 2.

4) В разделе 2.3 (стр. 100), посвященном присоединению адресующей молекулы к 5'-альдегидомодифицированному олигонуклеотиду через кислотолабильную гидразоновую связь какой вариант ацетальной защиты использовался для альдегидной группы – диметипропандиольная как на Рис.2.3.3 или всё же диэтилпропандиольная как на Рис. 1.59 (стр. 63)? В том же разделе из Рис. 2.3.6 видно, что выход конъюгатов альдегидо-олигонуклеотидов с липофильными гидразинами не 100%; заметен непрореагировавший альдегид. На следующем рисунке представлен масс-спектрометрический анализ конъюгатов, якобы гомогенных по данным фореза. Стоило показать форез чистых конъюгатов, т.к. сопоставление Рис. 2.3.6 и 2.3.7 побуждает отнести пики альдегида к недосинтезу, а не к деструкции гидразоновой связи в процессе МС, тем более что МС – неколичественный метод. Спектры продуктов восстановления гидразоновой связи (Рис. 2.3.8) могли бы разрешить сомнения, но качество спектров слишком низкое, цифры не читаются. Немного не хватает электрофореграмм продуктов гидролиза связи в средах повышенной кислотности, по которым построены кинетические кривые на Рис. 2.3.9.

5) На стр. 114 высказывается предположение, что побочный продукт конъюгации DSC-активированного олигонуклеотида с диамином, показавший большую форетическую подвижность – 5',5'-димерный продукт сшивки олигонуклеотидов через диамин.

Опечатка? Речь шла о меньшей подвижности? В разделе 2.5, как и в разделе 2.3, немного не хватает форетических данных, по которым построены кинетические кривые, отражающие кислотолабильность фосфамидной связи.

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Работа Мещаниновой М.И. – пример методологически стройного исследования; ее комплексный характер и значимость результатов несомненны. Диссертация соответствует требованиям, установленным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к докторским диссертациям. Диссертация оформлена в соответствии с Приложениями 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Таким образом, соискатель Мещанинова Мария Ивановна заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.9 — «биоорганическая химия».

Варижук Анна Михайловна

Контактные данные:
тел.: +7(916)5027832, e-mail: annavarizhuk@gmail.com
Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.01.03 – Молекулярная биология.
Адрес места работы:
119435, г. Москва, Малая Пироговская ул., д. 1а,
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России
Тел.: +7 (499) 246-4409; e-mail: annavarizhuk@rcpcm.org

Подпись сотрудника
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России
Варижук А.М. удостоверяю:
Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, к.б.н. Кострюкова Е.С.