

ОТЗЫВ

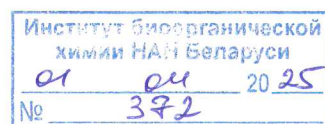
официального оппонента на диссертацию
УЛАЩИКА Егора Александровича «Синтез модифицированных нуклеозидов
и олигонуклеотидов как перспективных терапевтических агентов»,
представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по
специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия

Соответствие диссертации специальности и отрасли науки

Диссертационная работа Улащика Е.А. посвящена актуальной и практико-ориентированной теме, направлена на разработку новых методологических подходов к получению модифицированных нуклеозидов и олигонуклеотидов. На основании результата анализа всех разделов диссертации, автореферата, опубликованных в рецензируемых изданиях данных, а также круга поставленных задач и используемых методических решений считаю, что диссертация Улащика Егора Александровича соответствует специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия по пунктам паспорта специальности ВАК отрасли «химические науки»: 1 – *Низкомолекулярные биорегуляторы: простагландины, стероиды, пептиды, нуклеотиды и нуклеозиды, витамины, липиды, алкалоиды и др. Синтез, выделение из природных источников, установление структуры, изучение свойств. Синтетические биологически активные вещества (лекарства, пестициды);* 2 – *Биологически активные олигомеры: олигопептиды, олигонуклеотиды, олигосахариды. Твердофазный автоматический синтез пептидов и олигонуклеотидов. Создание систем и молекулярных инструментов для генной терапии (РНКи, CRISPR, антисмысловая терапия и др.);* 6 – *Направленная модификация биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов; получение и изучение свойств биоконъюгатов на их основе, в том числе с наноструктурами, для биоаналитических и терапевтических приложений.*

Актуальность темы диссертации

В настоящее время лекарственные препараты на основе нуклеозидов и олигонуклеотидов широко применяется в клинической практике, включая персонализированную терапию злокачественных новообразований и редких наследственных заболеваний, вирусных инфекций и пр. Наряду с, собственно, выбором оптимальных вариантов структуры таких веществ перед современной химической отраслью производства стоит несколько важных нерешенных задач: оптимизация процесса синтеза и очистки, стабилизация готовых форм при хранении и во время использования внутри организма, целевая доставка веществ, а также повышение специфичности и направленность действия. Работа включает несколько направлений, объединённых общей целью создания эффективных малых молекул и молекулярных комплексов для решения научных и практических задач. Диссертация выполнена в рамках ряда финансируемых государственных



программ и соответствует приоритетному направлению научных исследований Республики Беларусь: на 2016–2020 годы 5. Химические технологии, нефтехимия: производство новых химических продуктов (утверждены Указом Президента Республики Беларусь от 22 апреля 2015 г. № инновационной деятельности на 2021 – 2025 годы 2. Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства: тонкий химический синтез (утверждено Указом Президента Республики Беларусь от 7 мая 2020 г. № 156), что также подтверждает ее актуальность.

Степень новизны результатов, полученных в диссертации, и научных положений, выносимых на защиту

Диссертантом разработан ряд методик модификации нуклеозидов и олигонуклеотидов, получены новые химические соединения с заданными свойствами. В работе можно выделить несколько направлений, объединенных общей целью. Например, впервые осуществлен синтез двух соединений с применением гидрофобных защитных групп и LNA модификации углеводного остатка уридинового нуклеозида, обладающих подтвержденной экспериментально высокой противовирусной активностью и потенциально обладающих более высокой стабильностью и пролонгированным действием в составе биологических систем.

Впервые синтезирован дейтерированный по атомам С-5 и С-6 2'-дезоксцитидиновый амидофосфитный реагент, с помощью которого возможно создание модельных систем на основе олигонуклеотидов для изучения механизмов метилирования/деметиления ДНК. Экспериментально подтверждено снижение скорости работы нескольких метилтрансфераз при использовании дейтерированных олигонуклеотидных субстратов на модельных системах.

Автором предложены собственные методики модификации РНК-олигонуклеотидов с использованием азидных и алкиновых моно-GalNAc производных, что открывает новые перспективы получения биоконъюгатов, в том числе с использованием автоматизированного твердофазного синтеза. Также синтезирован моно-GalNAc амидофосфитный реагент, моно-GalNAc носитель и трис-GalNAc(ТЭГ) носитель для модификации нуклеиновых кислот по 3'-, 5'-положениям и в середине цепи в процессе автоматического твердофазного олигонуклеотидного синтеза, что позволяет в автоматическом режиме создавать биологически активные (например siRNA) конъюгаты, оснащенные специфическими средствами доставки (гепатоциты печени). Система доставки siRNA в гепатоциты является важным шагом для лечения заболеваний печени, вызванных вирусными гепатитами, злоупотреблением алкоголем и пр., включая злокачественные новообразования.

Благодаря ряду предложенных автором усовершенствований процесса синтеза длинных (более 40 оснований) РНК-олигонуклеотидов

оптимизирована технология получения направляющих (Guide) РНК, использующихся для редактирования генома с помощью системы CRISPR/Cas на твердофазном автоматическом олигосинтезаторе.

Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность полученных диссертантом результатов и обоснованность выводов подтверждается их опубликованием в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, и рецензируемых зарубежных источниках. В работе также использованы современные методы и подходы, принимаемые научным сообществом. На основании выводов сформулированы положения, выносимые на защиту, которые в полной мере соответствуют поставленной цели и задачам исследования.

Научная, практическая и экономическая значимость результатов диссертации с указанием рекомендаций по их использованию

Полученные Улащиком Е.А. результаты имеют высокую научную значимость, а также обладают значительным потенциалом внедрения в практику.

Впервые синтезированные соединения 5-перилена-3-илэтиниловых производных нуклеозидов уридинового ряда на основе защищенных 5-иодуридиновых блоков с подтвержденной противовирусной активностью и потенциально более стабильные и долгоживущие в условиях живых систем могут быть использованы для разработки и изучения механизмов действия новых типов синтетических лекарственных препаратов пролонгированного эффекта с рядом заданных свойств, открывающих возможности ведения таргетного воздействия. На основе методики синтеза производных конформационно блокированных по углеводному фрагменту нуклеозидов соискателем была разработана и внедрена в производство технология получения амидофосфитных конформационно блокированных реагентов. Диссертантом представлены документальные подтверждения внедрения этих разработок в практику, включая производство реагентов, которые могут быть использованы для синтеза указанных выше соединений (Приложение А диссертационной работы). Благодаря разработкам Улащика Е.А. произведено для целей мелкого товарного производства и реализовано модифицированных нуклеозидов на сумму 259 210,45 белорусских рублей (Приложение В диссертационной работы), что отражает высокую значимость результатов для экономики.

Благодаря разработке методики постсинтетической модификации 2'-F и циклоприсоединения, а также методики получения моно-GalNAc амидофосфитного реагента, моно-GalNAc носителя и трис-GalNAc(ТЭГ) носителя для модификации нуклеиновых кислот по 3'-, 5'-положениям и в середине цепи в процессе автоматического твердофазного олигонуклеотидного синтеза диссертант внес существенный вклад в область

создания конъюгатов РНК-олигонуклеотидов с системами их таргетной доставки, в частности, в печень. Также внес вклад в развитие химических методов создания модифицированных РНК-олигонуклеотидов с заданными свойствами. Внедрение результатов в практическую деятельность также подтверждается соответствующими документами (Приложение Г-Ж диссертационной работы).

Улащик Е.А. провел оптимизацию автоматизированного синтеза длинных РНК-олигонуклеотидов на твердых носителях. Полученные результаты имеют важное значение для создания синтетических направляющих РНК в рамках редактирования ДНК с помощью CRISPR/Cas. В соответствии с приложенными документами (Приложение И-М диссертационного исследования) результаты его работы нашли применение в практике, при этом на основании внедренных методик произведено и реализовано (мелкое товарное производство) направляющих РНК на общую сумму 11 750 белорусских рублей.

Опубликованность результатов диссертации в научной печати

Результаты диссертационного исследования Улащика Е.А. опубликованы в авторитетных рецензируемых научных изданиях и отражают суть сформулированных положений, выносимых на защиту. Общее количество статей в журналах – 10, общее количество тезисов докладов на конференциях – 8. Объем опубликованных результатов составляет 11,5 авторского листа. Также приложены акты о внедрении в производство, акты готовности к производству, акты использования в мелком товарном производстве, всего – 5; технические условия – 2; опытно-промышленные регламенты – 2.

Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК

Диссертационная работа оформлена в соответствии с требованиями ВАК Республики Беларусь – постановление №3 от 28.02.2014 в редакции №5 от 2017 года. Диссертационная работа состоит из оглавления, перечня сокращений и обозначений, введения, общей характеристики работы, трех глав, заключения и библиографического списка. Полный текст диссертации изложен на 178 страницах и содержит 103 иллюстрации на 43 страницах и 12 таблиц на 5 страницах. Список использованных источников включает 234 наименования на 22 страницах. Список опубликованных работ автора состоит из 18 наименований на 3 страницах и 12 приложений на 16 страницах.

В тексте диссертации ссылки приводятся своевременно и вместе с указанием страниц на которые ссылается соискатель. Обоснование положений подкреплено ссылками на собственные опубликованные научные работы автора. В конце каждого раздела приведено краткое обобщение изложенного материала. Автореферат также отражает суть положений, выносимых на защиту, и позволяет сформировать представление о глубине и объеме проведенной экспериментальной и теоретической работы.

Замечания

Текст диссертации Улащика Е.А. представлен доступно и в достаточной степени структурирован, язык изложения строгий, в целом рукопись содержит небольшое количество неточностей и опечаток, что не оказывает принципиального влияния на ее качество. Выявлен ряд неудачных оборотов.

Так, на странице 9 вероятно наличие несогласования падежей... *Модифицированные нуклеозидными реагентами нуклеиновые кислоты находят применение в технологии РНК-интерференции, микроРНК, антогомирах(ов), аптамерах (ов), антисмысловых олигонуклеотидах (ов), в разработке РНК-вакцин, а также в технологии редактирования генома*

На странице 17 в первом абзаце дважды указана ссылка на 19 источник.

Страница 18 первый абзац опечатка... *деструкивное*, следует – деструктивное.

Страница 18 второй абзац опечатка... *используются*, следует – используются.

Страница 62 первый абзац опечатка... *повышен~~о~~й*, следует – повышенной.

Страница 66 последний абзац опечатка... *с использование*, следует – с использованием.

Страница 68 неудачная формулировка... *простого вируса герпеса*, следует – вируса простого герпеса.

Страница 87 второй абзац опечатка... *охлажда~~ли~~*, следует – охлаждали.

Страница 109 первый абзац опечатка... *была~~а~~ улучшен*, следует – был улучшен.

Страница 129 последний абзац опечатка... *с использование*, следует – с использованием.

В обзоре литературы подробно рассмотрены модифицированные олигонуклеотиды, тогда как низкомолекулярные противовирусные соединения, включая нуклеозидные аналоги, представлены фрагментарно. Более широкое освещение этих перспективных направлений позволило бы создать сбалансированную картину современных терапевтических подходов. Объем работы, очевидно, накладывает ограничения на детализацию, однако включение даже краткого анализа ключевых примеров могло бы дополнить представленный материал.

Автор привел обширный список сокращений, однако в тексте встречаются нерасшифрованные аббревиатуры, такие как с-MYB, EDITH, ADTT, DDTT, TBDPSCl, что иногда может затруднять понимание материала.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует

Диссертация Улащика Е.А. представляет собой законченную, хорошо структурированную научную работу, затрагивающую важные аспекты современной биоорганической химии, включает в себя ряд химических методов синтеза и очистки новых соединений, обладающих биологической

активностью и заданными свойствами, опирается на надежные методы контроля качества и анализа физико-химических характеристик химических веществ, учитывает данные, полученные при моделировании биологических процессов и пр., а также обладает высоким потенциалом внедрения в практику. Таким образом, считаю, что Улащик Е.А. обладает достаточной квалификацией, а его работа в полной мере соответствует ученой степени кандидата химических наук специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия.

Формулировка конкретных научных результатов (с указанием их новизны и практической значимости), за которые может быть присуждена учёная степень

Считаю, что Улащик Егор Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия за новые научно-обоснованные теоретические и экспериментальные результаты, включающие:

выполнение синтеза новых 5-периллен-3-илэтиниловых производных нуклеозидов уридинового ряда, в том числе конформационно блокированного по углеводному фрагменту, с использованием защищенных 5-иодуридиновых блоков;

- осуществление синтеза нового дейтерированного по атомам С-5 и С-6 2'-дезоксцитидинового амидофосфитного реагента исходя из 2'-дезоксцитидина и получение содержащих дейтерий олигонуклеотидов;

- разработку метода получения конъюгатов 2'-F и 2'-OMe мРНК с GalNAc лигандом посредством [3+2]-диполярного циклоприсоединения, катализируемого комплексом $\text{CuI} \cdot \text{P}(\text{OEt})_3$, на твердой фазе с использованием синтезированных азидных и алкиновых моно-GalNAc производных;

- получение новых GalNAc производных исходя из D-галактозамина гидрохлорида для модификации олигонуклеотидов в процессе твердофазного синтеза; оптимизацию методики получения 2'-F и 2'-OMe GalNAc-мРНК с использованием синтезированных реагентов;

- улучшение технологии синтеза направляющих РНК длиной 40 оснований с использованием автоматического олигонуклеотидного синтезатора ASM-2000 и ее применение для получения направляющих CRISPR РНК-олигонуклеотидов, действующих в комплексе с эндонуклеазой Cas12a в формате сплит-системы.

Официальный оппонент:

биолог клинико-диагностической
лаборатории Республиканского

научно-практического центра «Кардиология»,
кандидат химических наук, доцент



Подпись удостоверяю

Начальник кадрово-юридического отдела

Число 01.04.2025

Подпись

А.С. Бабенко