

“УТВЕРЖДАЮ”

И.о. директора Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Института
органической химии им.

Н.Д. Зелинского Российской
академии наук

Член-корр. РАН А.О. Терентьев



“24” ноября 2023 г.

24.11.2023
№12104-688.1/2171-01

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук на диссертационную работу Берзиной Марии Яновны «Новые аналоги аденозина: химико-ферментативный подход к получению» представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия.

Диссертационная работа Берзиной Марии Яновны посвящена разработке химико-ферментативного метода синтеза новых модифицированных адениновых нуклеозидов на базе рибозы и 2-дезоксирибозы. Предметом исследования являлась возможность проведения последовательного комбинированного химико-ферментативного синтеза новых нуклеозидов аденина с модификациями в структуре пуринового гетероцикла и углеводного остатка. В результате были получены новые модифицированные адениновые *N*-гликозиды рибозы, 2-дезоксирибозы и 2-дезоксидезокси-2-фтор арабинозы, модифицированные по гетероциклическому основанию. Применение метода ферментативного синтеза позволило

проводить замену стабильной в условиях химического синтеза рибозы на менее стабильные углеводные остатки.

Ниже рассматриваются соответствующие характеристики работы Берзиной М.Я.

Актуальность работы. Аденозин занимает особое место среди нуклеозидов, поскольку выполняет в клетке множество различных уникальных функций. Помимо того, что он является одним из мономеров нуклеиновых кислот, он входит в структуру коферментов S-аденозилметионина и кофермента А. Его 5'-нуклеотиды аденозинмонофосфат, аденозиндифосфат и аденозинтрифосфат играют ключевую роль в биохимических процессах: участвуют в процессах передачи энергии, а циклоаденозинмонофосфат является важнейшим вторичным посредником, реализующим передачу сигнала внутри клетки. Также аденозин регулирует межклеточные взаимодействия, выступая ингибиторным нейротрансмиттером для аденозиновых рецепторов нескольких подтипов, имеющих разнообразное распределение в тканях организма и регулирующих внутриклеточные процессы.

Вовлеченность аденозина и его нуклеотидов в разнообразные биологические процессы делает его интересной целевой молекулой для исследования механизмов взаимодействия с различными мишенями и поиска структурных аналогов с иным клеточным метаболизмом. Диссертационная работа Берзиной М.Я. связана с решением задачи по разработке новых аналогов аденозина, потенциально обладающих антипролиферативной, антибактериальной, противовирусной или агонистической по отношению к аденозиновым рецепторам активностью. Используемые в клинической практике модифицированные нуклеозиды обладают системным действием на организм человека, часто вызывая нежелательные побочные эффекты, поэтому актуален синтез новых нуклеозидов со специфичностью действия. Проведенный комплекс химико-ферментативных синтезов позволил

синтезировать четыре серии новых С2,Н6-дизамещенных аналогов аденозина и получить первичные данные скрининга их биологической активности.

Целью работы является разработка химико-ферментативного метода синтеза новых модифицированных аденозиновых нуклеозидов рибозы, 2-дезоксирибозы и 2-деокси-2-фтор арабинозы. Сочетание химического и ферментативного синтеза позволяет методами химического синтеза внести модификации по гетероциклическому основанию, а методом ферментативного синтеза проводить замену стабильной в условиях химического синтеза рибозы на менее стабильные углеводные остатки. Экспериментальные работы, выполняемые в рамках настоящей диссертационной работы, проводились в соответствии со следующими задачами:

- модифицировать гетероциклическое пуриновое основание по С2 и Н6-положениям с получением 2,6-дизамещенных аналогов аденозина с применением методов классического химического синтеза и оптимизировать условия синтеза, выделить продукты и подтвердить их структуры физико-химическими методами анализа;

- исследовать субстратную специфичность пуриннуклеозидфосфорилазы *E. coli* по отношению к полученным рибонуклеозидам и оптимизировать условия ферментативного синтеза 2'-дезоксирибонуклеозидов, выделить продукты и подтвердить их структуры физико-химическими методами анализа;

- исследовать возможности ферментативного синтеза 2'-деокси-2'-фторарабинозидов из полученных рибонуклеозидов;

- провести ферментативный синтез новых аналогов аденозина из модифицированных по Н6-положению или по С2 и Н6-положению аденинов, выделить продукты и подтвердить их структуры физико-химическими методами анализа;

- определить биологическую активность полученных модифицированных аденозиновых рибо- и 2'-дезоксирибонуклеозидов.

Научная новизна проведенного исследования не вызывает сомнений. Все положения, выносимые на защиту, являются новыми и основываются на современных методах органического и ферментативного синтеза. Научная новизна исследования заключается в разработке новых химико-ферментативных подходов к синтезу аналогов 2-хлор- и 2-амино-аденозина, замещенных по N6 атому. Показано наличие высокой агонистической активности по отношению к аденозиновым A1 рецепторам у нуклеозидов, имеющих остатки линейных и разветвленных аминоспиртов в N6-положении. Впервые методом спектроскопии ЯМР доказано существование внутримолекулярной водородной связи N6CH...N7 в 2-хлор-N6-замещенных аналогах аденозина.

Обоснованность и достоверность результатов и выводов. Анализируя предоставленные результаты работ, можно заключить, что достоверность экспериментальных данных не вызывает сомнений – все необходимые методики приведены в полном объеме в главе «Экспериментальная часть», использованные методы физико-химического анализа и исследования антибактериальной активности адекватны поставленным задачам и соответствуют современному уровню научных изысканий. Полученные выводы хорошо обоснованы в ходе работы и являются закономерным результатом анализа полученного объема экспериментальных данных. Сформулированные в работе выводы соответствуют поставленным целям и задачам, подтверждаются результатами экспериментов, степень достоверности которых не вызывает сомнения.

Диссертация изложена логично и последовательно. В работе приведены ссылки на литературные источники, относящиеся к предмету исследования. Результаты, описанные в диссертационной работе, опубликованы в 4 статьях в рецензируемых журналах мирового уровня, а также доложены на российских и международных конференциях.

Практическая и научная значимость работы Берзиной М.Я. заключается в разработке основных подходов к проведению химико-

ферментативных синтезов 2-хлор- и 2-амино-аденозинов, замещенных по N6 атому основания. Доказана высокая эффективность и региоселективность реакции трансгликозилирования для получения серий нуклеозидов с разнообразными углеводными остатками. Полученные данные первичного скрининга активности синтезированных соединений позволили провести корреляцию «структура-активность» в ряду рибозидов и синтезировать новые, более эффективные агонисты аденозиновых A1 рецепторов, перспективных для дальнейших медико-биологических испытаний.

Проведенный комплекс исследований структуры полученных нуклеозидов очевидно доказал возможность применения методов двумерной гетероядерной спектроскопии ЯМР для расшифровки аномалий в структуре нуклеозидов, связанных с образованием внутримолекулярных водородных связей.

Общая характеристика работы. Объем, структура и апробация диссертации. Диссертация изложена на 193 страницах и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, обсуждение результатов, экспериментальная часть, заключение, список сокращений и список использованной литературы. Материал проиллюстрирован 54 рисунками, 21 схемой и 19 таблицами. Библиографический указатель включает ссылки на 265 источников, относящихся к предметной области. Текст диссертации изложен литературным языком. В нем имеется небольшое количество грамматических ошибок и англицизмов, которые не мешают пониманию излагаемого в работе материала.

Во **Введении** диссертант обосновывает актуальность темы исследования, формулирует цель и задачи предстоящей работы, характеризует научную новизну и практическую значимость полученных результатов, формулирует положения, выносимые на защиту, и приводит сведения об апробации и публикациях по теме диссертации.

Обзор литературы посвящен всестороннему рассмотрению имеющихся на сегодня данных о биологической активности нуклеозидов

модифицированного аденина, их использовании в терапевтической практике и проводящихся клинических испытаниях. В первой части достаточно подробно проанализировано действие используемых в клинической практике противоопухолевых аналогов аденозина (кладрибина, флударабина, клофарабина), рассмотрены исследования N6-замещенных производных аденозина. Особое внимание уделено перспективе использования аналогов аденозина как низкомолекулярных иммуноонкологических препаратов – ингибиторов фермента CD73, что позволит устранить основной путь продукции аденозина в микроокружении опухоли. Во второй части обзора литературы автор описывает роль разных типов аденозиновых рецепторов в организме и рассказывает о современных клинических исследованиях аденозиновых рецепторов как мишеней для терапии различных заболеваний. Третья часть посвящена обзору использования аналогов аденина и аденозина как флуоресцентных соединений. В четвертой части описаны подходы к методам химической модификации пуринового гетероцикла, а в пятой дан обзор ферментативного синтеза нуклеозидов с применением различных нуклеозидфосфорилаз. В целом, проведенный автором анализ публикаций дает достаточно полное представление по исследуемому вопросу. В обзоре присутствует авторский анализ массива литературных данных, позволяющий успешно и обоснованно определить наиболее актуальные направления экспериментальной диссертационной работы. Уровень изложения текста достаточно высокий, тем не менее, в нем встречаются опечатки и пунктуационные ошибки, что не снижает общего положительного впечатления.

В разделе *Результаты и их обсуждение* представлены оригинальные экспериментальные данные и их интерпретация. Изложенный материал позволяет сделать вывод, что поставленные в диссертационной работе цели и задачи были выполнены. В первом подразделе описаны разработанный химический синтез серии 2-хлорзамещенных рибонуклеозидов с разнообразными заместителями в N6 положении аденозина и проведенные

биологические испытания: определение цитостатической и рецепторной активности полученных соединений. Отмечено, что полученные соединения обладают низкой цитотоксичностью и являются частичными агонистами аденозиновых рецепторов типа A1.

Во втором подразделе описана химическая модификация пуринового основания при помощи азид-алкинового циклоприсоединения. Получены 6-1,2,3-триазол-1-илзамещенные пуриновые рибонуклеозиды.

В третьем подразделе изложено описание ферментативного синтеза новых аналогов аденозина из модифицированных аденинов при помощи реакции трансгликозилирования. Дано подробное описание подбора условий реакции трансгликозилирования. При помощи ферментативного синтеза получены рибонуклеозиды 2-Н-пурина и 2-амино-пурина.

В четвертом подразделе описан ферментативный синтез 2'-дезоксирибонуклеозидов из синтезированных рибонуклеозидов, чей синтез был описан в первом и втором подразделе.

В пятом подразделе описывается изучение фотофизических свойств нуклеозидов триазолил-замещенных пуринов в разных растворителях. Приведены максимумы возбуждения и эмиссии, даны значения стоксова сдвига.

В шестом подразделе автором показана принципиальная возможность биосинтеза 2'-деокси-2'-фтор-арабинозидов N6-замещенных производных 2-хлораденозина, являющихся структурными аналогами клофарабина, из соответствующих 2-хлорзамещенных рибоаденозинов.

Седьмой подраздел посвящен анализу аномалии в спектрах ЯМР нуклеозидов 2-хлораденозина. Благодаря анализу данных двумерной гетероядерной спектроскопии ЯМР и проведенным экспериментам показано наличие внутримолекулярной водородной связи между N7 атомом пурина и СН протоном заместителя при N6 атоме аденина, приводящее к образованию заторможенной структуры нуклеозида. Стоит отметить грамотную последовательность изложения материала и удобные для восприятия

графические иллюстрации. Сделанные ниже замечания по опечаткам и незначительным ошибкам не снижают общего положительного впечатления от работы.

Экспериментальная часть выполнена в соответствии с современными стандартами, содержит полное описание методик и физико-химические и спектральные параметры всех синтезированных в рамках данной работы веществ. Автором подробно описаны методики химического и ферментативного синтеза и приведены физико-химические характеристики всех полученных соединений. Эта часть работы изложена четко и понятно и дает представление о высоком методическом уровне поставленных экспериментов.

Раздел **Заключение** завершает исследовательскую часть работы, выводы диссертации составлены убедительно и опираются на заключения критического анализа экспериментальных результатов диссертационного исследования. В этом разделе автор суммирует ключевые данные, полученные в ходе работы, и формулирует выводы, которые соответствуют изложенным результатам.

Вопросы и замечания, возникшие при прочтении диссертации. По работе Берзиной М.Я. можно сделать следующие замечания:

1. В разделе **Введение** сказано: «...что среди рибозидных аналогов аденина нет препаратов, которые использовались бы в качестве антиметаболитов или противовирусных соединений». Непонятно, что такое «рибозидные аналоги аденина».

2. В подразделе 2.3. **Ферментативный синтез новых аналогов аденозина из модифицированных аденинов при помощи реакции трансгликозилирования** легенда «Рисунка 30 – Конверсия гетероциклического основания 40-НС в рибонуклеозид в зависимости от донора остатка рибозы, синтез рибозида 40» не позволяет понять, какая линия какому процессу соответствует.

3. В подразделе 2.7. *Изучение аномалии в спектрах ЯМР аналогов аденозина* сказано: «Отчетливо наблюдался кросс-пик описанной ранее водородной связи между 5'-ОН и пурином N3 [264.0] в спектре (Рисунок 51, кросс-пик [5.26; 221.56])». Однако невозможно оценить наличие указанного пика на означенном рисунке, поскольку шкала химических сдвигов атома азота заканчивается на 230 м.д. При этом в автореферате приведен фрагмент того же спектра $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -НМВС (Рисунок 9), где указанный пик виден.

4. Подраздел *Разработка способа получения 2'-дезоксиде-2'-фтор-арабинозидов N6-замещенных производных 2-хлораденозина* выглядит незаконченным: не проведена наработка соединений, получение которых доказано данными LC-MS.

5. В разделе 3. *Экспериментальная часть* величины времён удерживания в экспериментах по ВЭЖХ указаны в минутах с точностью до 3-его знака после запятой, тогда как обычно погрешность такого рода измерений составляет не менее 0,01 мин. В работе не указано, проводились ли исследования, подтверждающие точность измерения времён удерживания до 3-его знака после запятой.

6. В работе присутствует некоторое количество опечаток, несогласованных предложений и пунктуационных ошибок.

Указанные замечания не носят принципиального характера и никак не снижают общей очень положительной оценки представленной к защите работы Берзиной М.Я., которую отличают научная новизна, актуальность и практическая перспективность.

Апробация результатов работы. Материалы работы были представлены на 9 международных и российских конференциях. По материалам диссертации опубликованы 4 статьи в рецензируемых журналах, глава в книге и получен патент.

Рекомендации по использованию результатов диссертации. Результаты работы могут быть использованы и развиты в исследованиях, посвящённых химическому и ферментативному синтезу аналогов аденозина,

которые проводятся в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Институте органической химии имени Н. Д. Зелинского РАН, Институте биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН и Институте органического синтеза имени И.Я. Постовского УрО РАН.

Заключение

Диссертация Берзиной Марии Яновны является законченным научным трудом, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для развития биоорганической химии: показано, что полученные модифицированные нуклеозиды являются агонистами аденозиновых рецепторов. Диссертационная работа представляет собой законченную научно-квалификационную работу и соответствует всем требованиям, включая п. 9, «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ № 335 от 21 апреля 2016 г., ред. от 01 октября 2018 г. № 1168, ред. от 24 февраля 2021 г. № 118, ред. от 20 марта 2021 г. № 426, ред. от 11 сентября 2021 г. № 1539, ред. от 26 сентября 2022 г. № 1690, ред. от 26.01.2023 г. №101), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Берзина Мария Яновна заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – Биоорганическая химия.

Отзыв рассмотрен, обсужден и одобрен на заседании расширенного семинара лаборатории химии гликоконъюгатов ИОХ РАН (Присутствовало на семинаре 20 человек, результаты голосования: «за» – единогласно, протокол № 27 от 24 ноября 2023 г.).

Отзыв подготовила старший научный сотрудник лаборатории химии гликоконъюгатов Государственного бюджетного учреждения науки Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН),

К.х.н.

Е.А. Хатунцева

Председатель научного коллоквиума лаборатории химии гликоконъюгатов ИОХ РАН, заведующий лабораторией лаборатории химии гликоконъюгатов,

Чл.-корр. РАН

Н.Э. Нифантьев

Секретарь научного коллоквиума лаборатории химии гликоконъюгатов ИОХ РАН, старший научный сотрудник,

к.х.н.

О.Н. Юдина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН). 119334, г. Москва, Ленинский проспект, 47. Телефон: +7 499 137-29-44. E-mail: secretary@ioc.ac.ru. Сайт: <https://zioc.ru/>

Подписи Н.Э. Нифантьева и О.Н. Юдиной заверяю.

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского,

К.Х.Н.

МП

Коршевец И.К.