

## Отзыв официального оппонента

д.х.н. Готтих Марины Борисовны на диссертационную работу

**Елецкой Барбары Златковны на тему:**

**«Биосинтез модифицированных нуклеозидов**

**с нетипичными гетероциклическими основаниями»,**

представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук  
по специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия»

Создание лекарственных препаратов, направленных на борьбу как с онкологическими заболеваниями, так и опасными инфекциями, является крайне актуальной задачей для научных лабораторий и фармацевтических компаний. Ежегодно возникает потребность в создании новых противоопухолевых и противовирусных агентов в результате возникновения резистентности к клинически используемым лекарственным препаратам, быстрой генетической изменчивости вирусов и возникновения новых штаммов. Пандемия COVID-19, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, обнажила проблему нехватки эффективных противовирусных средств для купирования вспышек и предотвращения последующих волн заболеваний.

Одним из наиболее перспективных классов соединений для поиска новых лекарственных средств являются производные нуклеозидов, на основе которых в настоящее время разработано и введено в клиническую практику около 100 лекарственных препаратов, половина из которых приходится на противовирусные, а четверть на противоопухолевые препараты. Успешные примеры терапевтического применения модифицированных нуклеозидов в совокупности с возникающей к существующим препаратам резистентностью стимулируют поиск новых аналогов нуклеозидов с более высокой активностью и низкой токсичностью. В этой связи, разработка эффективных методов получения модифицированных нуклеозидов является крайне актуальной задачей современной биоорганической химии и биотехнологии.

Вплоть до настоящего времени, подавляющее большинство модифицированных нуклеозидов были получены химическими методами. Тем не менее, получение многих противовирусных и противоопухолевых лекарств, а также биологически активных соединений продолжает оставаться серьезной проблемой, что обуславливает высокую стоимость этих препаратов и ограничивает их применение. В последнее время все более пристальное внимание направлено на развитие комбинированных химико-ферментативных методов синтеза биологически активных модифицированных нуклеозидов.

Таким образом, работа Елецкой Барбары Златковны, посвященная синтезу и изучению биологических свойств новых производных пуриновых нуклеозидов является чрезвычайно актуальной.

Диссертационная работа Елецкой Б.З. изложена на 119 страницах машинописного текста, построена по стандартному принципу и состоит из следующих разделов: список используемых сокращений, введение, обзор литературы, обсуждение результатов, экспериментальная часть, выводы, и список литературы, который содержит 131 ссылку. Содержание диссертации полностью соответствует специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия».

Во введении четко обоснована актуальность исследования, его научная новизна, практическая значимость работы, сформулированы её цели и задачи.

Обзор данных литературы самым непосредственным образом связан с темой диссертации и помогает читателю лучше понять выбор направления исследований и значимость проделанной автором работы. Обзор литературы охватывает очень широкий круг вопросов, посвященных как структуре и областям применения модифицированных нуклеозидов, так и основным подходам к их синтезу. На примере противоопухолевого препарата неларабина проводится сравнение химических и ферментативных подходов к синтезу модифицированных нуклеозидов. Отдельно в обзоре рассматривается структура и субстратная специфичность пуриннуклеозидфосфорилазы из *E. coli*. Этот раздел очень органично включен в обзор, поскольку пуриннуклеозидфосфорилаза является одним из основных ферментов, используемых в синтезе нуклеозидов. Надо, однако, отметить, что крайне большой объем рассматриваемого в обзоре материала привел к тому, что некоторые разделы написаны очень кратко и представляют собой своеобразный справочный материал. Тем не менее, обзор легко и с интересом читается и может быть интересен широкому кругу специалистов в области биоорганической и медицинской химии, а также фармакологии нуклеозидов.

Раздел «Обсуждение результатов» содержит подробное описание синтетических методов и подходов, предложенных для получения трех серий пуриновых нуклеозидов: 1) соединений, модифицированных по С6 положению 2,3-дигидро-7,8-дифторбензоксазином и содержащих в качестве углеводных фрагментов остатки рибозы, 2-дезоксирибозы и арабинозы; 2) арабинозидов, содержащих 2-хлор-пурин, замещенный хиральными аминокислотами в С6 положении; 3) флексимерных аналогов пуриновых нуклеозидов, содержащих в качестве углеводных фрагментов остатки рибозы и 2-дезоксирибозы. Попытка получить арабинозиды, содержащие флексимерные аналоги пурина в качестве основания, оказалась не очень успешной из-за крайне низкой

эффективности реакции. Всего в работе Елецкой Б.З. получено 32 новых пуриновых нуклеозида, их структура подтверждена методом ЯМР. Все синтезированные в работе соединения получены методом ферментативного трансгликозилирования, причем надо отметить, что для получения новых производных нуклеозидов с необычными модификациями Елецкая Б.З. специально проводила оптимизацию ферментативных реакций. Была детально исследована субстратная специфичность пурииннуклеозидфосфорилазы *E. coli* и впервые показано, что этот фермент может быть успешно использован для гликозилирования пуриновых оснований, имеющих объемные заместители в С6 положении гетероцикла.

Очень важным этапом работы явилась оптимизация синтеза арабинозидов, содержащих 2-хлор-пурин, замещенный хиральными аминокислотами в С6 положении с использованием арсенолиза. Известно, что при синтезе арабинозидов из соответствующих рибозидов конкурентная реакция арсенолиза позволяет существенно сдвинуть равновесие ферментативного трансгликозилирования в сторону синтеза арабинозидов за счет вывода рибозы из сферы реакции. В присутствии солей мышьяковой кислоты в активном центре пурииннуклеозидфосфорилазы из рибозида образуется  $\alpha$ -D-рибозо-1-арсенат, который в водных растворах быстро гидролизует до рибозы и неорганического арсената, в результате чего реакция становится необратимой.

Для всех нуклеозидов, содержащих замещенные пуриновые основания (серии 1 и 2), Елецкой Б.З. была исследована их способность выступать субстратами (ингибиторами) аденозиндезаминаз: рекомбинантной аденозиндезаминазе *E. coli* (ADA *E. coli*) и аденозиндезаминазы, выделенной из кишечника теленка (ADA *CI*). Выбор ADA *CI* был обусловлен тем, что этот фермент по своим характеристикам близок к ADA человека. Это исследование было необходимо, поскольку целью работы Елецкой Б.З. являлось получение соединений, которые потенциально могли бы выступать в качестве терапевтических препаратов, а действие внутриклеточной аденозиндезаминазы может привести к деактивации аналогов аденозина и, соответственно, потере терапевтического эффекта. В результате проведенного исследования было установлено, что синтезированные соединения не являются субстратами ферментов ADA *E. coli* и ADA *CI*. Более того, наличие атома хлора/фтора в положении С2 пурина предотвращает связывание нуклеозидов с активным центром ADA. Интересно при этом, что 2-хлораденозин оказался ингибитором аденозиндезаминазы *E. coli*.

Для всех синтезированных Елецкой Б.З. соединений были проведены испытания их биологической активности: антивирусной, антибактериальной, а также цитотоксической на клетках лейкоцитарной моноцитарной лимфомы человека. В результате этой работы из

первой серии С6 замещенных рибозидов удалось отобрать соединения, проявляющие значительную активность в отношении вируса простого герпеса, включая устойчивый к ацикловиру штамм вируса (HSV-1, штамм L<sub>2</sub>/R). Во второй серии соединений были обнаружены два арабинозида, проявляющие дозозависимую цитотоксическую активность по отношению к клеткам Т-лимфобластного лейкоза человека, сопоставимую с активностью стандарта сравнения, в качестве которого использовали неларабин. Флексимерные аналоги нуклеозидов из третьей серии показали некоторую антивирусную и антибактериальную активность. Так, 4-(4-аминопиридин-3-ил)-1H-пиразол подавлял репликацию вируса желтой лихорадки с EC<sub>90</sub> 11.3 мкМ и норовируса с EC<sub>50</sub> 4.2 мкМ, а 1-(β-D-рибофуранозил)-4-(2-аминопиридин-3-ил)-1H-пиразол проявил избирательное воздействие на *Mycobacterium smegmatis* в концентрации 10 мкг/мл.

Интересно, что значительную часть своей работы Елецкая Б.З. посвятила исследованию побочных продуктов реакции трансгликозилирования флексимерного основания 4-(4-аминопиридин-3-ил)-1H-пиразола. Была установлена структура побочных продуктов, отработаны условия получения максимально возможного количества минорных продуктов и предложен механизм их образования. Для подтверждения этого механизма Елецкой Б.З. был проведен кванто-химический анализ (*ab initio*) структуры основания при разных значениях pH, а также моделирование взаимодействий 4-(4-аминопиридин-3-ил)-1H-пиразола с аминокислотными остатками в активном центре пурииннуклеозидфосфорилазы *E. coli*. В результате были предсказаны возможные структуры комплексов региоизомеров и продуктов бисгликозилирования в активном центре PNP *E. coli*.

В разделе «Экспериментальная часть» с необходимыми подробностями описаны методики получения всех синтезированных Елецкой Б.З. соединений и приведены данные анализа их чистоты и подтверждения структуры, а также физико-химические свойства полученных соединений. Также в данном разделе приведены методики исследования субстратно-специфических свойств нуклеозидфосфорилаз и субстратной специфичности аденозиндезаминазы *E. coli* и из кишечника теленка.

Из полученных Елецкой Б.З. результатов видно, что как новизна, так и практическая значимость данной работы в первую очередь определяется тем, что были предложены эффективные методы ферментативного синтеза модифицированных нуклеозидов, позволяющие получить большую библиотеку целевых соединений с хорошими выходами. Помимо этого, расширены представления о возможностях ферментативного синтеза модифицированных нуклеозидов с нетипичными гетероциклическими основаниями. Проведенное исследование позволило лучше понять механизмы катализа и

специфичности фермента в отношении новых гетероциклических оснований. Получены также данные первичного *in vitro* скрининга противовирусной активности соединений первой и третьей серий и противоопухолевой активности второй серии соединений. Полученные результаты в дальнейшем могут быть использованы для создания на основе полученных соединений прототипов новых лекарственных средств, используемых как в противовирусной терапии, так и в комбинированной противоопухолевой терапии.

Необходимо подчеркнуть, что все указанные выше результаты являются оригинальными и ярко отражают новизну данной работы. По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, в том числе 4 статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК, 1 патент, 12 тезисов докладов конференций.

Публикации по итогам работы и автореферат в полной мере отражают основное содержание диссертации. Все выводы диссертации хорошо обоснованы и их достоверность не вызывает сомнений.

Подводя итог, следует отметить высокое качество не только экспериментальной работы диссертанта, но и подготовки диссертации. Вся работа написана хорошим литературным языком, достаточно хорошо структурирована, снабжена четкими и аккуратными рисунками и понятными таблицами. Принципиальных замечаний к содержанию диссертации нет. Можно отметить стилистические и грамматические ошибки и опечатки, однако их число не очень велико.

Тем не менее, к работе есть некоторые вопросы и замечания. В первую очередь, необходимо указать на несколько ошибок в названии нуклеозидов. Так, 9-β-D-арабинофуранозиаденозин назван 1-β-D-арабинофуранозиаденозином, в обзоре литературы на стр. 18 присутствует ошибка в написании структурных формул декойинина и психофуранина: они представлены в виде L-изомеров.

В разделе «Исследование противовирусной активности бензоксазиновых нуклеозидов Серии I» в диссертации присутствует таблица, в которой приведены значения цитотоксичности и противовирусной активности нуклеозидов, и текст с некоторыми комментариями. В автореферате таблица отсутствует, а в приведенных комментариях нет конкретных значений активности соединений. В результате, читая только автореферат, невозможно оценить уровень противовирусной активности исследуемых соединений.

В разделе, посвященном синтезу соединений из второй серии (стр. 57 диссертации и 9 автореферата) присутствуют два предложения, которые, по мнению оппонента, несколько противоречат друг другу: «Лучшим донором арабинозы оказался AraU: концентрация продукта в смеси достигала 82% (по данным ВЭЖХ) при пятикратном избытке донора AraU (зеленая линия тренда). Конверсия рибозидов в арабинозид была

максимальной (до 90 % за 5 дней) при 5-кратном избытке AraU». Непонятно, какой же была конверсия: 82 или 90%?

На стр. 65 диссертации и 12 автореферата в разделе, посвященном исследованию устойчивости полученных арабинозидов к действию аденозиндезаминазы *E. coli*, присутствует предложение «При изучении кинетики фосфоролиза аденозина в присутствии изучаемых аналогов, было показано, что соединения являются конкурентными ингибиторами». Не очень понятно, о каком фосфоролизе идет речь. Скорее всего диссертант просто написал «фосфоролиз» вместо «дезаминирования». Но главный вопрос к этому разделу в другом. Елецкая Б.З. сначала пишет, что атом хлора/фтора в положении С2 пурина предотвращает связывание нуклеозидов с активным центром аденозиндезаминазы, а затем утверждает, что три исследуемых соединения, **23**, **24** и **12b**, являются конкурентными ингибиторами этого фермента. Все эти соединения содержат атом хлора в положении С2, поэтому непонятно, как соединения, которые не связываются с активным центром аденозиндезаминазы, могут быть ее конкурентными ингибиторами.

И наконец, в работе Елецкой Б.З. большое внимание уделено анализу механизма получения побочных продуктов при реакции трансгликозилирования 4-(4-аминопиридин-3-ил)-1H-пиразола (соединение 27) и для подтверждения предложенного механизма проведено моделирование взаимодействий этого соединения с аминокислотными остатками в активном центре пуриннуклеозидфосфорилазы *E. coli*. Эта красивая часть работы стала бы еще красивее и весомее, если бы Елецкая Б.З. смоделировала расположение в активном центре фермента соединений 28 и 29, при получении которых побочных продуктов не образуется. Этот эксперимент позволил бы лучше понять причину образования побочных продуктов именно в случае 4-(4-аминопиридин-3-ил)-1H-пиразола.

Помимо этого, в работе присутствует некоторое число явно неудачных выражений, например: «скорость дезаминирования ... проявила следующую зависимость», «исходный рибозид ... гидролизовался до соответствующего гетероциклического основания». В последнем случае необходимо было добавить «и рибозы». Неудачно название раздела «Моделирование взаимодействия флексимеров в активном сайте PNP *E. coli*», поскольку необходимо было указать взаимодействие с чем. В предложении «...образовании водородной связи между протоном и Asp204» необходимо было указать донор этого самого протона.

«Вместе с тем, указанные недочеты никоим образом не умаляют значимости диссертационного исследования и не снижают общего высокого уровня работы. Диссертация Елецкой Б.З. является научно-квалификационной работой, направленной на

решение важнейшей задачи создания новых лекарственных соединений на основе нуклеозидов и их аналогов. Работа представляет собой целостное и завершенное научное исследование, выполненное на высоком экспериментальном уровне. Результаты работы изложены чётко и ясно. Сделанные выводы обоснованы и подтверждаются полученными экспериментальными данными. По актуальности поставленных задач, научной новизне, объёму выполненных исследований и практической значимости полученных результатов диссертационная работа, представленная соискателем Елецкой Барбарой Златковной, полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции с актуальными изменениями, включая постановление Правительства РФ от 26 сентября 2022 г. №1690), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия».

Официальный оппонент,  
доктор химических наук, профессор,  
зав. отделом химии нуклеиновых кислот  
НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского  
МГУ имени М.В. Ломоносова

/М.Б. Готтих/

специальность 02.00.10 – Биоорганическая химия  
почтовый адрес: 119991 Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 40  
телефон: +7 (495) 939 5407  
адрес электронной почты: [gottikh@belozersky.msu.ru](mailto:gottikh@belozersky.msu.ru)

Данные Готтих М.Б. подтверждаю  
И.о. директора НИИ физико-химической биологии  
имени А.Н. Белозерского  
МГУ имени М.В. Ломоносова  
Член-корреспондент РАН



/П.В. Сергиев/

«17» ноября 2023 г.