

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН),
по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 20 декабря 2023 г. № 31

О присуждении **Берзиной Марии Яновне** ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация «Новые аналоги аденозина: химико-ферментативный подход к получению» по специальности 1.4.9 – Биоорганическая химия принята к защите 9 октября 2023 г. (протокол заседания № 25) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), 117997, Москва, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10.

Соискатель Берзина Мария Яновна, 09 августа 1986 года рождения. В 2010 году окончила магистратуру Московской государственной академии тонкой химической технологии имени (МИТХТ) им. М.В. Ломоносова по специальности "Химическая технология и биотехнология". В 2020 году окончила аспирантуру Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (ИБХ РАН) по направлению подготовки «Химические науки» с присвоением квалификации «Исследователь. Преподаватель-исследователь». Кандидатский экзамен по специальности "Биоорганическая химия" сдан с оценкой "отлично".

С 2010 по 2020 гг. – младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии, с 2020 г. по настоящее время – младший научный сотрудник лаборатории биосинтеза низкомолекулярных физиологически активных соединений Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Диссертация выполнена в лаборатории биосинтеза низкомолекулярных физиологически активных соединений Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель – кандидат химических наук Константинова Ирина Дмитриевна, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией биосинтеза низкомолекулярных физиологически активных соединений Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Хомутов Алексей Радиевич, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений ФГБУН Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, и **Есипов Дмитрий Станиславович**, кандидат химических наук, доцент кафедры биоорганической химии Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН), Москва, в своем *положительном* отзыве, подписанном д.х.н., чл.-корр. РАН Нифантьевым Николаем Эдуардовичем, заведующим лабораторией химии

гликоконъюгатов, и утвержденном д.х.н., чл.-корр. РАН Терентьевым Александром Олеговичем, и.о. директора Института, указала, что диссертация Берзиной Марии Яновны «Новые аналоги аденозина: химико-ферментативный подход к получению» 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.

Соискатель имеет 10 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 6 работ, из них 4 работы общим объемом 8 печ.л. опубликованы в рецензируемых научных изданиях, входящих в базы SCOPUS и Web of Science, а также патент РФ. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы, в которые Берзина М.Я. внесла основной или существенный вклад:

1) **Berzina M.Ya.**, Eletskaia B.Z., Kayushin A.L., Dorofeeva E.V., Lutonina O.I., Fateev I.V., Zhavoronkova O.N., Bashorin A.R., Arnautova A.O., Smirnova O.S., Antonov K.V., Paramonov A.S., Dubinnyi M.A., Esipov R.S., Miroshnikov A.I., Konstantinova, I.D. Intramolecular Hydrogen Bonding in N6-Substituted 2-Chloroadenosines: Evidence from NMR Spectroscopy //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – V. 24. – №. 11. – P. 9697. DOI: 10.3390/ijms24119697 IF 6.208 (Q1);

2) **Berzina M.Ya.**, Eletskaia B.Z., Kayushin A.L., Dorofeeva E.V., Lutonina O.I., Fateev I.V., Paramonov A.S., Kostromina M.A., Zayats E.A., Abramchik Yu.A., Maltsev D.V., Naumenko L.V., Taran A.S., Yakovlev D.S., Spasov A.A., Miroshnikov A.I., Esipov R.S., Konstantinova I.D. Synthesis of 2-chloropurine ribosides with chiral amino acid amides at C6 and their evaluation as A1 adenosine receptor agonists //Bioorganic Chemistry. – 2022. – V. 126. – P. 105878. DOI: 10.1016/j.bioorg.2022.105878 IF 5.275 (Q1);

3) Fateev, I.V.; Kostromina, M.A.; Abramchik, Y.A.; Eletskaia, B.Z.; Mikheeva, O.O.; Lukoshin, D.D.; Zayats, E.A.; **Berzina, M.Ya.**; Dorofeeva, E.V.; Paramonov, A.S.; Kayushin, A.L.; Konstantinova, I.D.; Esipov, R.S. Multi-enzymatic cascades in the synthesis of modified nucleosides: Comparison of the thermophilic and mesophilic pathways //Biomolecules. – 2021. – V. 11. – №. 4. – P. 586. DOI: 10.3390/biom11040586 IF 4.879 (Q2);

4) Kharitonova M.I., Antonov K.V., Fateev I.V., **Berzina M.Ya.**, Kaushin A.L., Paramonov A.S., Kotovskaya S.K., Andronova V.L., Konstantinova I.D., Galegov G.A., Charushin V.N., Miroshnikov A.I. Chemoenzymatic Synthesis of Modified 2'-Deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosyl Benzimidazoles and Evaluation of Their Activity Against Herpes Simplex Virus Type 1. // Synthesis. – 2017. – V. 49. – № 05. – P. 1043. DOI: 10.1055/s-0036-1588625 IF 3.157 (Q2);

5) Патент РФ № RU 2563257 C1 от 20.09.2015. Бюл. №26. Константинова И.Д., Елецкая Б.З., Дорофеева Е.В., Фатеев И.В., **Берзина М.Я.**, Лутонина О.И., Мирошников А.И. *Способ получения 9-(бета-D-арабинофуранозил)-6-(N^α-L-сериламидо)-2-хлорпурина.*

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.х.н. Хомутова Алексея Радиевича. Отзыв положительный, содержит следующие замечания и вопросы:

1) Обзор литературы оказался при первом прочтении весьма фрагментарно написанным. Например, подраздел 1.4. «Методы химической модификации пуринового основания» занимает 7 стр., а подраздел 1.3. «Флуоресцентные нуклеозиды» занимает 2 стр., что *a priori* не может позволить раскрыть заявленное в заглавиях содержание. Следует отметить, что подробное описание биологической активности кладрибина, флударабин и клофарабина, веществ близкородственным объектам диссертационной работы, весьма уместно и полезно читателю.

2) Стр. 13 – «Среди производных аденозина не найдено активных соединений, обладающих избирательным действием на опухолевые клетки или вирусы», что достаточно спорно, т.к. адефовир и тенофовир, представляющие собой ациклические аналоги АМФ, достаточно широко используются при лечении гепатита В, герпеса и ВИЧ.

3) Стр. 4 автореферата (п.3 положения, выносимые на защиту) – почему роль заместителя во 2-м положении пурина исследована не для самых активных агонистов, например, соединений **18b** и **27b**, а для рибозидов 2-Н-пурина и 2-амино-пурина, замещенных остатками глицина и глицинглутаминовой кислоты в С6 положении основания?

4) Стр. 55 диссертации и стр. 4 автореферата. Следовало бы расшифровать обоснование синтеза нуклеозидов 2-хлор-N-(пурин-6-ил) аминокислот: «...представляет интерес, так как заместитель в виде аминокислоты по С6 положению пурина влияет на физиологическую и биологическую активность соединения [61, 62, 64, 68]». В приведенных ссылках и на стр.75 указано, что некоторые N-(пурин-6-ил) аминокислоты активны в отношении *Mycobacterium tuberculosis*, включая и резистентные штаммы, однако эти литературные данные не нашли отражения в обосновании синтеза соответствующих N⁶-замещенных производных 2-хлораденозина.

5) Стр. 60, Табл. 2 – аномально низкий 8% выход соединения **9b** (производное Пe) требует комментариев.

6) Стр. 60, Схема 14 – нет R₃ на Схеме 14, а в Табл. 2 присутствует графа с R₃.

7) Стр. 66, Табл. 5 – активность аденозина в сериях 1 и 2 отличается в 1.5 раза, что делает не вполне корректным перекрестное сравнение активности вещества из серии 1 с другим веществом, испытанном лишь в серии 2.

8) Стр. 66, Табл. 5 и стр. 67 – «Для соединений **18b** и **27b** показана значительная стимулирующая аденозиновые рецепторы типа A₁ активность, превосходящая даже активность известного агониста A₁ ССРА». Вместе с тем, как следует из Табл.5, активности **18b**, **27b** и ССРА составляют 95.6±4, 95.2±4 и 94.9±3.2, соответственно, что не может быть интерпретировано как активность превосходящая таковую для ССРА.

9) Стр. 142 и далее – в химической литературе не принято указывать выходы соединений с точностью до сотой %. Для т.пл. необходимо указывать растворитель для кристаллизации. Кроме того, растирание полутвердого или маслообразного вещества с хлороформом приводит к твердому, но не кристаллическому веществу (метод В), которое для определения т.пл. необходимо дополнительно перекристаллизовать.

10) Автореферат соответствует содержанию диссертации. Однако представляется, что он местами перегружен излишними деталями, заставившими М.Я. Берзину использовать мелкий шрифт, что затрудняет чтение.

Отзыв официального оппонента к.х.н. Есипова Дмитрия Станиславовича.
Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1) излишне подробное описание модифицированных аденозинов в качестве противоопухолевых препаратов в первой части обзора литературы;

2) при обозначении L/D-изомеров аминокислот и аминокислот диссертантом использовалось курсивное начертание вместо прямого шрифта, как рекомендовано правилами ИЮПАК;

3) неудачное использование стереохимических формул, особенно при объяснении заторможенной конфигурации заместителя при азоте в случае исследования нуклеотидов с помощью ЯМР

4) в качестве рекомендаций напрашивается расширение биологического эффекта полученных соединений, проверка их на антипролиферативную и противовирусную активность. Эта работа должна быть продолжена с расширением спектра биологических объектов.

Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный, содержит следующие замечания и вопросы:

1) В разделе *Введение* сказано: «...что среди рибозидных аналогов 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 «Рисунок 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 №3 [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 ¹H, ¹⁵N-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 времен 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.

Отзыв на автореферат доцента кафедры биотехнологии и промышленной фармации Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова РТУ МИРЭА, кандидата химических наук **Чудинова Михаила Васильевича**. Отзыв положительный, замечаний не содержит.

Отзыв на автореферат старшего научного сотрудника лаборатории алюминий- и борорганических соединений Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, кандидата химических наук **Дружиной Анны Александровны**. Отзыв положительный, содержит следующее замечание: несмотря на то, что выводы структурированы и отражают результаты проделанной научной работы, было бы целесообразно отразить в них потенциальное практическое применение всех полученных

аналогов аденозина и выделить из них наиболее перспективные, а также сравнить полученные результаты с уже используемыми в клинике производными аденозина.

Отзыв на автореферат старшего научного сотрудника Лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, кандидата химических наук **Александровой Людмилы Александровны**. Отзыв положительный, замечаний по существу работы нет, но есть замечания по оформлению.

Отзыв на автореферат старшего научного сотрудника лаборатории ассиметрического катализа Института органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук, кандидата химических наук по специальности 02.00.03 – Органическая химия **Вигорова Алексея Юрьевича**. Отзыв положительный, содержит следующий **вопрос**: чем вызваны заметные отличия в изменении хронотропизма при действии аденозина в серии 1 и серии 2 (таблица 4)? Стоит заметить, что для 2-хлораденозина (соединение 30) изменение хронотропизма в серии 1 и серии 2 весьма близко.

В качестве **замечаний** можно отметить:

1) жаргонизм «аммонолиз ацетильных защит». Корректнее, наверное, говорить «аммонолиз ацетильных защитных групп»;

2) на наш взгляд термин «алкильная компонента» (стр. 10) использован неверно. В данном случае следует говорить «алкильная компонента» (от слова алкин);

3) к сожалению, в автореферате, в частности в таблице 2, не указано, что в реакции аммонолиза изолейцинового производного **9a** основным продуктом реакции является не амид **9b**, а соответствующий метиловый эфир. Чтобы это понять, приходится обращаться к тексту самой диссертационной работы (стр.143-144);

4) при прочтении текста автореферата осталось неясным зачем (с какой целью) изучали фотофизические свойства замещенных пуринов (раздел 5, стр. 15-16). Обращение к тексту диссертационной работы (раздел «Обзор литературы», п. 1.3. Флуоресцентные нуклеозиды) позволяет понять актуальность и практическую значимость этого фрагмента работы;

5) соединения **7d** и **10d** (схема 7 и таблица (2)), весьма интересные в плане изучения их противоопухолевой активности, к сожалению, не были выделены в индивидуальном виде, а только лишь зафиксированы методом LC-MS, а также оценена конверсия в данной реакции.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в близкой к тематике работы области биоорганической химии, что подтверждается сериями их публикаций в ведущих российских и международных журналах. Оппоненты и представители ведущей организации обладают большим опытом исследовательской и прикладной работы в области биоорганической химии, в частности, являются экспертами в области ферментативного синтеза нуклеозидов, модификации углеводных структур и в исследованиях биологической активности модифицированных нуклеозидов. Все оппоненты и представители ведущей организации обладают высокой квалификацией, которая позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, а также ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований разработан химико-ферментативный подход к синтезу аналогов 2-хлор-, 2-

амино аденозина, замещенных по N⁶ атому остатками амидов хиральных аминокислот, линейных и разветвленных аминспиртов, и получен ряд соответствующих производных. В результате исследования показано наличие высокой агонистической активности по отношению к аденозиновым рецепторам A₁ у нуклеозидов, имеющих остатки линейных и разветвленных аминспиртов в N⁶-положении пурина. При помощи ферментативного синтеза из упомянутых выше рибонуклеозидов синтезирован ряд 2'-дезоксирибонуклеозидов, а также разработан способ получения 2'-дезокси-2'-фтор-арабинонуклеозидов. Получена серия нуклеозидов замещенных 2-амино-6-(1,2,3-триазол-1-ил)-пуринов и изучены их фотофизические свойства. Предложена гипотеза существования внутримолекулярной водородной связи N⁶CH...N7 в 2-хлор-N⁶-замещенных аналогах аденозина, а ее наличие доказано методом спектроскопии ЯМР

Теоретическая значимость исследования заключается в установлении корреляции между структурой рибонуклеозидов 2,6-дизамещенных аденозинов и их агонистической активностью по отношению к аденозиновым A₁ рецепторам. Выдвинутая гипотеза формирования внутримолекулярной водородной связи N⁶CH...N7 расширяет представления об образовании заторможенных конформаций производных аденозина.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики состоит в подтверждении высокой эффективности и специфичности реакции трансгликозилирования для получения серий нуклеозидов с различными углеводными остатками. Среди полученных рибонуклеозидов обнаружены новые активные агонисты аденозиновых A₁ рецепторов, что открывает перспективы для проведения дальнейших медико-биологических тестирований.

Достоверность результатов исследования обеспечивается использованием в исследовании комплекса современных научных методов. Подтверждение структуры синтезированных соединений осуществлялось с помощью современных физико-химических методов исследования (одно- и двумерная спектроскопия ЯМР, масс-спектрометрия высокого разрешения), экспериментальная часть включает подробное описание всех использованных методик, в приложениях приведены спектры ЯМР всех новых соединений. Обоснованность выводов исследования базируется на анализе, систематизации и обобщении полученных экспериментальных результатов и данных литературных источников по исследуемой тематике, выводы работы соответствуют поставленной цели и задачам.

Личный вклад соискателя заключался в выборе направления научной работы, разработке цели и задач исследования по теме диссертации. Автор разрабатывал методы синтеза новых аналогов аденозина и методы внесения модификаций, проводил химический и ферментативный синтез, получал вещества в количествах, необходимых для изучения их физико-химических характеристик и биологических исследований, анализировал полученные данные: интерпретировал данные масс-спектров и одномерных и двумерных спектров ЯМР. Также автор участвовал в написании и подготовке к публикации статей и тезисов докладов на научных конференциях по результатам исследования. Данные экспериментов были получены лично автором или при его непосредственном участии, кроме регистрации спектров ЯМР (Парамонов А.С., Дубинный М.А., лаборатория биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН) и масс-спектров (Антонов К.В., лаборатория биосинтеза низкомолекулярных физиологически активных соединений ИБХ РАН). Исследования биологической активности аналогов аденозина проводились в Национальном медицинском исследовательском центре

онкологии им. Н.Н. Блохина и на кафедре фармакологии и биоинформатики Волгоградского государственного медицинского университета.

В ходе защиты диссертации были заданы следующие уточняющие вопросы:

1. Какова цель присоединения полярного остатка к модифицированным пуринам. Препарат предполагается для внутривенного введения?
2. Изменилась ли противотуберкулезная активность соединений после введения остатка рибозы?
3. Чем обусловлены низкие выходы некоторых соединений?
4. Исследовали ли вы возможность введения фтора вместо хлора?
5. Пробовали ли вы изменить условия, в которых проводится реакция [3+2] диполярного циклоприсоединения, чтобы не происходило побочной реакции восстановления азида?
6. Проверялась ли стабильность триазолил-замещенных пуриновых нуклеозидов в реакциях нуклеофильного замещения?

Соискатель Берзина М.Я. ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию:

1. Исследования противотуберкулезной активности соединений находятся на стадии клеточных исследований, поэтому про форму введения лекарственного средства пока судить рано.
2. Противотуберкулезная активность рибозилированных соединений планируется к изучению.
3. Причиной низких выходов некоторых соединений являются либо наличие побочных продуктов реакции в реакционной смеси, либо близкая хроматографическая подвижность побочных и целевых продуктов реакции, затрудняющая выделение.
4. При введении атома фтора нуклеофильное замещение проходит по двум положениям пуринового цикла, что затрудняет получение фторзамещенных соединений.
5. Соискатель принял замечание о возможности изменения условий реакции.
6. Полученные триазолил-замещенные пурины оказались устойчивы в реакции нуклеофильного замещения.

Исходя из вышеизложенного, диссертационный совет заключает, что диссертация Берзиной М.Я. является законченной научно-квалификационной работой, результаты которой имеют важное значение для развития биоорганической химии. Работа написана автором самостоятельно и содержит новые и актуальные научные результаты. Таким образом, диссертационная работа Берзиной Марии Яновны «Новые аналоги аденозина: химико-ферментативный подход к получению», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – Биоорганическая химия, соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. № 1539; 26.09.2022 г. №1690; 26.01.2023 г. №101).

На заседании 20 декабря 2023 года диссертационный совет принял решение за разработку химико-ферментативного подхода к синтезу новых аналогов замещенного аденозина присудить Берзиной Марии Яновне ученую степень кандидата химических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 22 человек, из них 5 докторов наук (по научной специальности рассматриваемой диссертации 1.4.9 – Биоорганическая химия), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 22, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель
диссертационного совета

академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь
Диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

20 декабря 2023 г.

