

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

**ИНСТИТУТ
ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ
И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ
МЕДИЦИНЫ**

**СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИХБФМ СО РАН)**

Просп. ак. Лаврентьева, 8, г. Новосибирск,

630090

тел. (383) 363-51-50

факс (383) 363-51-53

E-mail: niboch@niboch.nsc.ru

http://www.niboch.nsc.ru

«УТВЕРЖДАЮ»

И.о. директора Института
химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН (ИХБФМ СО РАН)
к.х.н., доцент **Коваль В.В.**



2023 года

27.11.2023 № 15245 -19-09/632

На № _____

Отзыв ведущей организации

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук на диссертационную работу **Елецкой Барбары Златковны**

«Биосинтез модифицированных нуклеозидов с нетипичными гетероциклическими основаниями», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия»

Актуальность работы

В медицинской практике широко используются аналоги пуриновых нуклеозидов, которые подобны природным нуклеозидам по способу транспортировки, накопления и встраивания в ДНК, а также по характеру метаболизма. Модифицированные нуклеозиды используются для лечения различных заболеваний, включая вирусные инфекции, опухолевые заболевания, ревматологические заболевания и инфекции, вызванные микроорганизмами. Однако их использование ограничено из-за системной токсичности и возможности развития устойчивости к ним, что снижает эффективность лечения.

Диссертационная работа Елецкой Б.З. связана с решением задачи в области биоорганической химии и биотехнологии по поиску новых аналогов пуриновых нуклеозидов для изучения биологической активности, а также разработка эффективных методов их синтеза. В результате проведенных исследований была создана библиотека новых модифицированных нуклеозидов, выявлены соединения с антипролиферативными, противовирусными и антимикробными свойствами. Полученные данные о модификациях, влияющих на биологическую активность или биодоступность аналогов нуклеозидов, позволили выявить взаимосвязь между структурой и активностью этих соединений, что является важным шагом при разработке лекарственных препаратов на основе модифицированных нуклеозидов.

Цель исследования заключается в создании трех групп модифицированных нуклеозидов с нетипичными гетероциклическими основаниями, такими как аналоги 2-аминопурина, арабинозиды 2-хлораденина с замещением в позиции С6 и флексимерные нуклеозиды. Основные задачи исследования: определение, какие модифицированные основания и/или рибозиды могут быть использованы как субстраты для пуриинуклеозидфосфорилазы *E. coli*; определение оптимальных условий реакции трансгликозилирования для получения наибольшего выхода модифицированного нуклеозида; синтез новых соединений; оценка устойчивости синтезированных нуклеозидов к воздействию аденозиндезаминазы (для соединений первой и второй групп); исследование первичных

характеристик биологической активности синтезированных нуклеозидов на различных биологических моделях.

Научная новизна результатов исследования

Научная новизна исследования заключается в синтезе трёх серий модифицированных нуклеозидов с нетипичными гетероциклическими основаниями, выявлении закономерности структура-активность. Показана устойчивость полученных соединений к действию аденозиндезаминазы.

Впервые продемонстрирована способность пурииннуклеозидфосфорилазы *E. coli* гликозилировать пуриновые основания с объемными бензоксазиновыми заместителями.

Автором диссертационной работы проведено доскональное изучение особенностей реакции трансгликозилирования флексимерных оснований: впервые были выявлены продукты двойного гликозилирования флексимерных оснований по N1 азоту аминопиридина и N1 азоту пиразола. Разработана компьютерная модель формирования бисгликозидов в активном центре фермента PNP. Экспериментально подтверждено, что после синтеза аминопиридиниевого нуклеозида происходит последующее гликозилирование флексимерного основания по пиразольному кольцу. Разъяснение механизма образования бисгликозидов вносит существенный вклад в понимание функционирования активного центра фермента, открывая перспективы для разработки новых молекул, включая как потенциальные субстраты, так и ингибиторы PNP.

Степень достоверности результатов проведённых исследований

Достоверность результатов проведенных исследований обеспечивается рядом факторов: структура всех синтезированных нуклеозидов подтверждена данными гетероядерной двумерной ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения. Важным аспектом является использование оптимизированных методов синтеза и выделения новых модифицированных нуклеозидов, что обеспечивает воспроизводимость и масштабируемость синтетических методов.

Полученные экспериментальные данные расширяют представления о возможностях ферментативного синтеза модифицированных нуклеозидов и взаимодействия активных центров фермента PNP с новыми гетероциклическими основаниями.

Важно отметить, что проведено компьютерное моделирование взаимодействий флексимерных оснований и нуклеозидов с активным центром фермента, что приближает нас к пониманию механизма образования побочных бисгликозидов.

Наличие данных первичного скрининга противовирусной и противоопухолевой активности соединений, проведенных в ведущих научных институтах Российской Федерации, также добавляет дополнительные аргументы в пользу значимости результатов исследования.

В целом, совокупность этих факторов укрепляет достоверность результатов исследования, делая его важным вкладом в область биоорганической химии и биотехнологии.

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.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость данной работы заключается в расширении наших знаний о возможностях ферментативного синтеза модифицированных нуклеозидов с нетипичными гетероциклическими основаниями. Способность пурииннуклеозидфосфорилазы *E. coli* гликозилировать пуриновые основания с объемными заместителями предоставляет новый взгляд на механизмы взаимодействия ферментов с подобными структурами, что может быть важно для понимания биохимических процессов в клетке.

Практическая значимость заключается в создании трех новых серий модифицированных нуклеозидов, которые могут иметь потенциальное применение в различных областях медицины. Эти соединения могут стать основой для разработки новых лекарственных препаратов с антивирусной и противоопухолевой активностью. Оптимизированные методы синтеза и выделения также упрощают процесс получения этих соединений, что может способствовать дальнейшему исследованию их биологической активности.

Таким образом, данная работа не только вносит вклад в фундаментальные научные знания, но и открывает новые перспективы для применения модифицированных нуклеозидов в медицине, что может иметь практическое значение для разработки инновационных лекарственных препаратов.

Общая характеристика работы

Диссертация изложена на 119 страницах и содержит следующие разделы: список сокращений, введение, обзор литературы, обсуждение результатов, экспериментальная часть, заключение по выполненной работе и список использованной литературы. Материал проиллюстрирован 60 рисунками и 13 таблицами. Библиографический указатель включает ссылки на 131 источник, относящихся к предметной области. Текст диссертации изложен литературным языком.

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, приводит сведения об апробации и публикациях по теме диссертации.

Обзор литературы в данной работе охватывает разнообразные аспекты модифицированных нуклеозидов, начиная с описания их функций в организме в разделе 1.1. Далее, в разделе 1.2, рассматриваются основные области применения нуклеозидных аналогов, такие как противовирусные препараты, цитотоксические препараты, антибактериальные и противогрибковые нуклеозидные антибиотики, а также модифицированные нуклеозиды в роли агонистов и антагонистов аденозиновых рецепторов.

Раздел 1.3 посвящен основным структурным и химическим модификациям нуклеотидных/нуклеозидных аналогов, предоставляя обзор разнообразных изменений, которые могут быть внесены в структуру этих соединений. В разделе 1.4 рассматриваются методы химического синтеза нуклеозидов, а в разделе 1.5 представлены новые перспективные химико-ферментативные методы получения модифицированных нуклеозидов.

Сравнение эффективности химического и химико-ферментативного синтезов на примере препарата неларабина представлено в разделе 1.6. В разделе 1.7 приведены известные в литературе примеры нарушения региоселективности ферментативного катализа, что является важным аспектом в изучении этих процессов.

Разделы 1.8 и 1.9 фокусируются на роли пуриннуклеозидфосфорилазы *E. coli* в реакции трансгликозилирования и ее субстратной специфичности, предоставляя важные данные о ключевом ферменте, участвующем в синтезе модифицированных нуклеозидов.

Таким образом, обзор литературы в диссертации охватывает широкий спектр аспектов, связанных с модифицированными нуклеозидами, начиная от их применения, химических модификаций структуры, до методов химического синтеза и ферментативного катализа.

Обсуждение результатов в разделе 2 начинается с рассмотрения применения биокаталитического способа синтеза серий новых модифицированных нуклеозидов с нетипичными гетероциклическими основаниями с использованием нуклеозидфосфорилаз *E. coli*. В подразделе 2.1.1 освещается синтез гетеродимерных нуклеозидов 2-аминопурина с 2,3-дигидро-7,8-дифтор-бензоксазиновыми заместителями (Серия I), далее в разделе 2.1.2 приводятся данные изучения их субстратной специфичности по отношению к аденозиндезаминазе ADA *E. coli* и ADA из кишечника теленка (ADA CI). В разделе 2.1.3, приведены данные исследования противовирусной активности бензоксазиновых нуклеозидов Серии I *in vitro*, что позволяет сделать выводы о их потенциальной эффективности.

В разделе 2.2 представлен синтез модифицированных по 6-му положению аналогов 2-хлорпурина (Серия II). В подразделе 2.2.2, рассматривается параллельный фосфоролитический процесс арсенализации в синтезе модифицированных пуриновых арабинонуклеозидов Серии II. С помощью такой модификации стандартного метода синтеза автору удалось упростить составы реакционных смесей, процесс выделения продуктов стал более технологичным. Результаты исследования субстратной специфичности аденозиндезаминазы ADA *E. coli* по отношению к соединениям Серии II представлены в подразделе 2.2.3, а цитотоксической активности – в подразделе 2.2.4.

В разделе 2.3 представлена информация по получению нуклеозидов флексимерных аналогов 8-аза-7-дезаа-аденозина (Серия III) с подробным рассмотрением оптимизации процесса синтеза, вплоть до обнаружения побочных продуктов реакции трансгликозилирования (подраздел 2.3.1), установления структуры всех продуктов, компьютерного моделирования процесса синтеза

бисгликозидов в активном центре фермента, приведен механизм, объясняющий этот процесс. Раздел завершается данными антивирусной (подраздел 2.3.6) и антибактериальной активности (подраздел 2.3.7).

Таким образом, обсуждение результатов включает в себя все аспекты проведенных исследований, предоставляя детальный обзор синтеза, характеристик и биологической активности модифицированных нуклеозидов в рамках каждой серии. Это обеспечивает понимание влияния различных структурных и химических модификаций на биологическую активность соединений.

Особенно хочется отметить впечатляющую работу Барбары Златковны, в контексте досконального изучения проводимых реакций. Обнаружение неспецифических реакций, последующее усовершенствование условий для синтеза "неправильных" нуклеозидов, умение выделить и установить структуру этих "неправильных" нуклеозидов, всё это демонстрирует стремление к полному пониманию молекулярных механизмов, лежащих в основе представленных исследований. Методы исследования, примененные автором в разделе «Моделирование взаимодействия флексимеров в активном сайте PNP *E. coli*», демонстрируют глубокое понимание механизмов реакций, происходящих в каталитическом центре, а использование квантово-химического анализа *ab initio* и сравнение ЯМР-спектров подчеркивают тщательный и многоплановый характер исследования.

Вопросы и замечания:

К сожалению, в работе есть технические погрешности, затрудняющие восприятие текста.

1. Со страницы 54 и далее обнаружено задвоение нумерации в верхнем и нижнем колонтитулах.
2. На странице 15 структурная формула Марибавира неправильно представлена как D-нуклеозид, вместо корректного L-нуклеозида.
3. Текст диссертации содержит некоторые стилистические ошибки, повторы выражений внутри одного предложения, избыточное использование сложных фразеологических конструкций.
4. В экспериментальной части на стр. 88 и 89 указано, что выходы для соединений серий 1,2 и 3 приведены в таблицах 8, 10 и 12, соответственно. Однако в этих таблицах приведены данные о конверсии соединений по данным ВЭЖХ. Выходы в (% и мг) приведены в таблицах 9,11,13.
5. В таблице 12, 1 столбец название столбца не соответствует содержанию (нет данных г/моль)
6. Встречаются некорректные выражения. Так, например, на стр. 50: «...неприродный углеводный остаток – арабинозу» Арабиноза – широко распространенный природный углевод.

Однако эти и ряд других неотмеченных замечаний носят технический характер и не умаляют общей высокой ценности исследования, не оказывают влияния на научную и практическую значимость полученных результатов диссертации и не меняют положительного впечатления от всей работы.

Апробация результатов работы

Материалы работы были представлены на 12 международных и российских конференциях. По материалам диссертации опубликованы 4 статьи в рецензируемых журналах и получен патент РФ.

Рекомендации по использованию результатов диссертации

Результаты работы могут быть использованы и развиты в исследованиях, посвящённых химическому и ферментативному синтезу модифицированных нуклеозидов, которые проводятся в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Институте биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН и Институте органического синтеза имени И.Я. Постовского УрО РАН, а также иных академических и отраслевых институтах.

Заключение

Таким образом, диссертация Елецкой Барбары Златковны является законченным научным трудом, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для развития биотехнологии модифицированных нуклеозидов. Проведённое исследование выделяется высоким уровнем профессионализма, глубиной исследования и системностью подхода.

Диссертационная работа представляет собой законченную научно-квалификационную работу и соответствует всем требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения 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), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – Биоорганическая химия.

Отзыв ведущей организации обсужден и утвержден на межлабораторном семинаре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук. Присутствовало на коллоквиуме 89 человек, результаты голосования: «за» – единогласно, протокол 272 от 22.11.2023

Председатель семинара
г.н.с., д.х.н.



Сильников Владимир Николаевич.

Ученый секретарь
Института химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН
(ИХБФМ СО РАН) с.н.с., к.б.н.

Логашенко Евгения Борисовна

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН). 630090, Россия, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, д. 8. Телефон: +7 (383) 363-51-50 E-mail: niboch@niboch.nsc.ru Сайт: <http://www.niboch.nsc.ru/>