

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01

на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 25 октября 2017 г. № 21

О присуждении **Харитоновой Марии Игоревне**, гражданке РФ, ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация "Нуклеозиды бензимидазола: синтез и изучение свойств" по специальности 03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) принята к защите 28.06.2017 (протокол № 17) диссертационным советом Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, (117997, Российская Федерация, Москва, ул. Миклухо-Маклая, дом 16/10), действующим на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г.

Соискатель Харитонova Мария Игоревна, 1989 года рождения, в 2011 году окончила Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, в 2014 году окончила аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. В настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории биотехнологии ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Диссертация выполнена в ФГБУН Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук в лаборатории биотехнологии. Научный руководитель - доктор химических наук, академик РАН **Мирошников Анатолий Иванович**, руководитель лаборатории биотехнологии ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

1. **Михайлов Сергей Николаевич** - доктор химических наук, заведующий лабораторией дизайна и синтеза биологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» Российской академии наук.

2. **Чудинов Михаил Васильевич** - кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии и промышленной фармации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский технологический университет».

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» в своем положительном заключении, подписанном профессором кафедры биотехнологии, д.х.н., доцентом Красноштановой Аллой Альбертовной и заведующим кафедрой биотехнологии, д.т.н., профессором Панфиловым Виктором Ивановичем и утвержденном и.о. ректора, д.х.н. Мажугой Александром Георгиевичем, указала, что диссертационная работа Харитоновой Марии Игоревны соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Соискатель имеет 4 научных статьи по теме диссертации общим объемом 4.7 печ. л., опубликованных в зарубежных научных журналах и входящих в базы Web of Science и Scopus, в которые автор внес основной либо существенный вклад:

1. Fateev I.V., **Kharitonova M.I.**, Antonov K.V., Konstantinova I.D., Stepanenko V.N., Esipov R.S., Seela F., Temburnikar K.W., Seley-Radtke K.L., Stepchenko V.A., Sokolov Y.A., Miroshnikov A.I., Mikhailopulo I.A. Recognition of Artificial Nucleobases by E. coli Purine Nucleoside Phosphorylase vs its Ser90Ala Mutant in the Synthesis of Base Modified Nucleosides. // Chem. Eur. J. 2015. V. 21. P. 13401-13419.
2. **Kharitonova M.I.**, Fateev I.V., Kayushin A.L., Konstantinova I.D., Kotovskaya S.K., Andronova V.L., Galegov G.A., Charushin V.N., Miroshnikov A.I. Chemoenzymatic Synthesis and Antiherpes Activity of 5-Substituted 4,6-Difluorobenzimidazoles Ribo- and 2'-Deoxyribonucleosides. // Synthesis 2016. V. 48 (03). P. 394-406.
3. **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. P. 1043-1052.
4. **Kharitonova M.I.**, Denisova A.O., Andronova V.L., Kayushin A.L., Konstantinova I.D., Kotovskaya S.K., Galegov G.A., Charushin V.N., Miroshnikov A.I. New modified 2-aminobenzimidazole nucleosides: Synthesis and evaluation of their activity against herpes simplex virus type 1. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2017. V. 27 (11). P. 2484-2487.

В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем работах.

На диссертацию поступили отзывы:

1. Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный, содержит два замечания по структуре диссертации, а также следующие замечания: - о приведение в конце каждого подраздела главы «Обсуждение результатов» библиографических данных работ, в которых опубликованы изложенные в подразделе результаты исследований; - о неточностях при оформлении некоторых рисунков (в частности, рис. 11,12, 33 и др. на оси ординат указано значение в 105 %); - на стр. 69 автор отмечает: « β -D-арабинозиды бензимидазола, образующиеся в активном центре фермента, являются его ингибиторами». Не ясно, каким образом, за счет каких реакций происходит образование данных соединений в активном центре; - отсутствие выводов по таблицам (например, 4; 13) с физико-химическими свойствами синтезированных нуклеозидов; - в разделе «Литературный обзор» дано подробное описание свойств, активности и структуры известных нуклеозидов бензимидазола, позволяющее сделать выводы о текущем состоянии исследований и проблемах в данной области. Однако материал представлен, как перечисление фактов, что существенно затрудняет восприятие.

2. Отзыв официального оппонента д.х.н. Михайлова С.Н. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: - в работе хотелось бы видеть определение констант равновесия и кинетических параметров реакции фосфоролиза и образования нуклеозидов. Возможно, что в случае бензимидазола равновесие реакции фосфоролиза еще сильнее сдвинуто в сторону нуклеозида по сравнению с пуриновыми нуклеозидами; - на рисунках приведены зависимости конверсии основания в соответствующий нуклеозид и во многих случаях реакция еще не закончилась; - неясно, зачем в работе исследовались субстратные свойства производных бензимидазола 59, 61 и 63.

3. Отзыв официального оппонента к.х.н. Чудинова М.В. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: - замечания по оформлению диссертации и автореферата: в тексте присутствуют опечатки, а также есть неудачные выражения (например, «вирусная клетка»); - зачем нужно было проверять субстратную специфичность фермента по отношению к соединениям 59, 61 и 63; - предложенный механизм гликозилирования 2-амино-1,3-бензоксазола (рис.45) является довольно спорным. Образовавшийся нуклеозид (69,70) не может изомеризоваться в пиранозную форму (71,72) без разрыва гликозидной связи. Скорее следовало бы предположить первоначальное образование фуранозиды по положению N1 с 2-имино-1,3-бензоксазолином, а затем - внутримолекулярное трансгликозилирование с изомеризацией в пиранозную форму. Впрочем, доказательство любого из механизмов потребовало бы серьезных дополнительных исследований, лежащих за рамками данной диссертации.

На автореферат поступили отзывы:

1. Краснова Виктора Павловича, д.х.н., профессора, зав. лабораторией асимметрического синтеза Института органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения РАН, г. Екатеринбург. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: - в автореферате отсутствуют таблицы, посвященные активности нуклеозидов бензимидазола в отношении ацикловир- и фоскарнет-резистентных штаммов вируса простого герпеса, а также активность полученных нуклеозидов в отношении вируса клещевого энцефалита; - диссертанту не удалось провести реакцию трансгликозилирования с использованием незамещенных бензоксазола, бензотиазола и бензотиадиазола. Это представляется очевидным, структуры соединений 59, 61, 63 содержат третичный атом азота, который не может участвовать в образовании полуаминалей вследствие локализации связи $C=N$ и отсутствия таутомерных переходов.

2. Поплавского Вячеслава Сергеевича, к.х.н., советника по науке генерального директора ПАО Фармсинтез, Ленинградская обл. Отзыв положительный, содержит следующие замечания по сути работы: - автору, к сожалению, не удалось преодолеть один из основных недостатков трансгликозилирования - необходимость осуществления процесса в разбавленных растворах, что в определенной степени, ограничивает практическую применимость результатов диссертационной работы; - автор допускает неточности в использовании номенклатуры IUPAC (радикалы должны называться морфолин-4-ил и пирролидин-1-ил, а соединение - 2,3,5-трис(О-метоксиметил)арабинофуранозилхлорид).

3. Галегова Георгия Артемьевича, профессора, д.б.н., руководителя лаб. химиотерапии вирусных инфекций подразделения Института вирусологии им. Д.И. Ивановского. Отзыв положительный, замечаний нет.

4. Есипова Дмитрия Станиславовича, к.х.н., доцента кафедры биоорганической химии биологического факультета ФГОУ ВО "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова", г. Москва. Отзыв положительный, содержит замечание о возможности масштабирования и внедрения методики синтеза нуклеозидов как в лабораторной практике для получения небольших партий модифицированных нуклеозидов, так и на опытно-промышленных предприятиях биотехнологического профиля.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их достижениями в научных областях, имеющих непосредственное отношение к теме диссертации, в частности, в получении модифицированных нуклеозидов, изучении субстратной специфичности ферментов нуклеинового обмена, кинетических параметров

ферментативных реакций, что подтверждается наличием у них большого перечня публикаций в рейтинговых зарубежных и российских журналах по данным темам. Высокая квалификация оппонентов и представителей ведущей организации позволяет объективно оценить экспериментальные достижения соискателя, научное и практическое значение диссертационной работы.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований разработан универсальный подход к синтезу модифицированных нуклеозидов бензимидазола, получены новые соединения и проведено тестирование их противовирусной и противоопухолевой активности. Получены новые данные о функционировании активного центра фермента пуриннуклеозидфосфорилазы.

Предложены новые подходы к синтезу нуклеозидов бензимидазола, определены границы применимости реакции ферментативного трансгликозилирования в синтезе нуклеозидов бензимидазола.

Доказана перспективность использования биокаталитического подхода, заменяющего реакцию химического гликозилирования и позволяющего в водных растворах без введения сложных защитных групп и использования сложных технологий выделения продуктов из реакционных смесей получать природные бета-*D*-изомеры модифицированных нуклеозидов. Ферментативный подход, введенный соискателем в синтез нуклеозидов бензимидазола, имеет важное практическое значение для синтеза новых нуклеозидов.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что оно расширяет представление о функционировании ферментов нуклеозидфосфорилаз. Впервые изучены неспецифические реакции в синтезе модифицированных нуклеозидов, предложен возможный механизм их протекания.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что с использованием ферментативного подхода к синтезу модифицированных нуклеозидов бензимидазола соискателем получено 22 новых соединения, пять из которых обладают достоверной противовирусной активностью в отношении вируса простого герпеса 1 типа, в том числе и на штаммах вируса, резистентных к препаратам первого и второго ряда: ацикловиру, цидофовиру и фоскарнету. На способ получения наиболее активного соединения (2-амино-5,6-дифтор-1-(β-*D*-рибофуранозил)бензимидазол), подана заявка на патент РФ, получено положительное решение. 2-Амино-5,6-дифтор-1-(β-*D*-рибофуранозил)бензимидазол после дополнительных испытаний может быть перспективен для терапии заболеваний,

