

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО  
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
им. Н.Д. ЗЕЛИНСКОГО  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
(ИОХ РАН)

Ленинский пр., д.47, Москва, 119991

Тел. (499) 137-29-44

Телефакс (499) 135-53-28

E-mail: SECRETARY@ioc.ac.ru

<http://zioc.ru>

ОКПО 02699435, ОГРН 1027700304323,

ИНН/КПП 7736029435/773601001

*22.08.2019г.* № 12104 *246/9344-31*

На № \_\_\_\_\_

Г

Г

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального  
государственного бюджетного  
учреждения науки Института  
органической химии им.  
Н.Д. Зелинского Российской  
академии наук  
академик М.П. Егоров



ОТЗЫВ

ведущей организации – Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, на  
диссертационную работу **Балеевой Надежды Сергеевны** "Синтез и свойства  
флуоресцентных красителей на основе аналогов хромофора GFP", представленную на  
соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 –

Биоорганическая химия

Актуальность разработки и создания новых флуоресцентных меток для различных биологических объектов не вызывает сомнений, несмотря на обширные накопленные мировым научным сообществом данные. Работа Балеевой Н.С. посвящена синтезу и изучению оптических свойств аналогов хромофоров флуоресцентных белков и их функционализированных производных. Важность разработки и исследования методов дериватизации флуоресцентных красителей сложно переоценить: маркирование соединений клетки и исследование клеточных процессов методом флуоресцентной микроскопии широко распространено в исследовательских лабораториях. Диссертационная работа направлена на создание флуоресцентных производных хромофоров флуоресцентных белков и установление взаимосвязи «структура-свойство».

Стоит отметить разносторонность проведенного исследования, что характеризует

Балееву Н.С. как многогранного специалиста с широким кругозором. В диссертации успешно сочетаются внушительный объем экспериментальной синтетической работы как по синтезу прямых и отдаленных аналогов хромофоров флуоресцентных белков (разделы 2.1 и 2.2), так и по их функционализации (раздел 2.3), а также обширное изучение оптических свойств полученных соединений.

Диссертационная работа достаточна по объему, изложена на 156 страницах, содержит 24 рисунка, 111 схем, 6 таблиц и состоит из введения, трех глав (обзор литературы, обсуждение результатов, экспериментальная часть) и выводов. Список цитируемой литературы обширен и включает 224 наименования, в том числе и работы научного руководителя диссертанта.

Диссертация начинается с введения, где сформулированы актуальность исследования, его цель, научная новизна и практическая значимость работы, что логично раскрывает основной замысел диссертационного исследования.

Глава 1 (Обзор литературы) состоит из двух разделов, первый из которых посвящен описанию современных методов создания 4-метилен-1H-имидазол-5(4H)-онов – общего структурного ядра хромофоров флуоресцентных белков. Второй раздел посвящен описанию строения и свойств арилметеновых флуоресцентных красителей – структурных аналогов хромофоров флуоресцентных белков. Обзор достаточно подробен и хорошо структурирован, что облегчает чтение и оценку основной главы диссертации, помогает понять логику формулирования цели исследований автора, степень новизны предлагаемых практических решений. Примечательно, что обзор содержит преимущественно работы последнего десятилетия, что наглядно демонстрирует актуальность выбранного автором направления исследования и интерес мирового научного сообщества к данной теме. Однако автором выбран нетривиальный способ упоминания затекстовых ссылок: они приведены в тексте в квадратных скобках с указанием первого автора и года публикации. Это несколько осложняет навигацию по литературным источникам, хотя и соответствует требованиям ГОСТ.

В главе 2 обсуждаются результаты, полученные автором. Первый раздел данной главы (2.1) посвящен синтезу прямых аналогов хромофоров флуоресцентных белков GFP: цианового флуоресцентного белка (CFP) и белка Sirius, а также белка Kaede - путем введения дифторборильной группы для фиксации конформации. Автором установлено, что полученные красители обладают высокими показателями квантового выхода флуоресценции, что делает их перспективными в качестве флуоресцентных красителей. В результате отдельного исследования зависимости оптических свойств синтезированных соединений от

pH среды было показано, что все pH-зависимые процессы лежат за пределами физиологической области и не препятствуют их применению в живых системах.

Раздел 2.2 посвящен синтезу отдаленных аналогов хромофора GFP. В данном разделе автор подробно освещает синтез, оптические и кислотно-основные свойства производных хромофора GFP, в которых гидроксильная группа ароматического кольца заменена на дизамещенную аминогруппу. Другой подход к структурной модификации модельного соединения, предложенный Балеевой Н.С., основан на увеличении цепи сопряжения за счет развития системы двойных связей заменой бензольного кольца на нафталиновое, либо за счет введения дополнительных ароматических заместителей посредством ацетиленового π-спейсера. Предложенные методы позволили достичь стабилизации квантового выхода, а также батохромного смещения максимумов спектров поглощения и испускания.

В заключительном разделе второй главы Балеева Н.С. сосредоточила свое внимание на введении в молекулы флуоресцентных красителей каких-либо функциональных (линкерных) групп, которые в перспективе должны будут обеспечивать специфическое взаимодействие красителя с целевым биологическим объектом. На примере двух функционализированных аналогов аминопроизводных борированного хромофора GFP автором были получены функционализированные соединения, содержащие карбоксильную группу в качестве якоря. При этом было показано, что использование алифатического линкера в сочетании с триазольным кольцом несущественно влияет на оптические свойства конечных красителей. Преимуществом предлагаемого автором подхода является то, что, в отличие от литературных методик, в которых подобные линкерные группы вводятся на ранних этапах синтеза и накладывают определенные ограничения на все последующие процессы, необходимую функционализацию можно использовать на последних синтетических стадиях.

При изучении возможности введения сенсорных групп автором было продемонстрировано создание необратимых и pH-зависимых сенсоров на основе синтезированных аминопроизводных борированного хромофора GFP. Обнаруженные автором зависимости спектров абсорбции от наличия карбаматной группы на аминном фрагменте красителя позволяют следить за присутствием той или иной формы с помощью различных возбуждающих лазеров и в разных каналах и открывают широкие перспективы для дальнейшего исследования. Получение N-гидроксилированного аналога привело к ценному с практической точки зрения результату: целевые дигидроксипроизводные имеют ярко выраженную pH-зависимость и резко изменяют флуоресцентные свойства при

физиологическом диапазоне рН 4-6.

Экспериментальная часть изложена достаточно подробно, что позволяет при необходимости воспроизвести результаты автора. Полученные продукты охарактеризованы необходимым набором физико-химических методов анализа: ЯМР на ядрах  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и масс-спектрометрией высокого разрешения. Высокое качество полученных спектров ЯМР обуславливается их регистрацией на приборах с рабочей частотой 700 и 800 МГц, один из которых снабжен криодатчиком.

Таким образом, автором успешно решены поставленные в диссертационной работе задачи. Синтезированы ближайшие и отдаленные структурные флуоресцентные аналоги хромофоров белков Sirius, GFP и Kaede, подробно изучены их оптические свойства и их зависимость от кислотности среды. Разработаны удобные способы модификации ряда полученных соединений, позволяющие вводить якорные или сенсорные группы на последних этапах синтеза целевых соединений. Результаты, представленные в работе Балеевой Н.С., могут быть полезны как химикам-органикам широкого профиля из различных академических исследовательских организаций, так и биохимикам, работающим в фармацевтических компаниях. Мультидисциплинарность диссертационной работы делает ее интересной как для специалистов в области органического синтеза, так и для исследователей, развивающих биохимические направления.

Автореферат диссертации в достаточной степени отражает содержание работы.

Высокий уровень работы диссертанта подтверждается списком публикаций по теме работы: основные результаты изложены в 8 статьях в рецензируемых российских и зарубежных журналах и представлены на трех российских конференциях.

Тем не менее, по работе имеется ряд замечаний и вопросов.

- При конденсации имидазолонна **2.1.4** с ароматическими хлорангидридами и альдегидами (схемы 4 и 5 автореферата или схемы 2.1.6 и 2.1.8 диссертации) был использован основной катализ. Однако выше в тексте диссертации и автореферата было замечено, что для подобных соединений ранее использовался катализ кислотами Льюиса. Чем обусловлен переход к органическим основаниям в качестве катализаторов и как осуществлялся выбор конкретного основания для отдельных субстратов?

- При описании функционализации борированных аналогов хромофора белка Kaede было выдвинуто предположение о том, что введение электронодонорных групп в бензилиденовую

часть молекулы приводит к длинноволновому сдвигу (схема 7 автореферата или схема 2.1.11 диссертации). Будет ли еще более выраженным батохромный сдвиг спектральных максимумов поглощения при введении электроноакцепторных заместителей в бензольное кольцо, конденсированное с имидазолоном, или при конденсации имидазолона с электронодефицитным гетероциклом?

- При создании нафталинсодержащих аналогов борированного хромофора GFP автором были использованы только электронодонорные заместители в нафтолиновом кольце. При этом был сделан вывод о зависимости оптических свойств от расположения и природы заместителей. Можно ли предсказать, каким образом повлияет введение электроноакцепторных групп в нафталиновое кольцо на оптические свойства данных красителей?

- В выводах 1 и 2 следовало бы подчеркнуть, какое именно влияние оказывает подвижность заместителей на флуоресцентные свойства хромофоров, чтобы показать преимущество разрабатываемых автором подходов.

- Почему при снятии защитной дифенилтретбутилсилильной группы плавиковой кислотой в случае соединения **2.3.13b** происходит селективное расщепление связи O-Si при атоме азота, а фенольная связь O-Si сохраняется (схема 18 автореферата или схема 2.3.8 диссертации)?

- Чем обусловлено возникновение второго максимума на спектре эмиссии соединения **2.3.10c** в фосфатном буфере при средних значениях pH (рисунок 8 автореферата или рисунок 2.3.7 диссертации)?

- Для соединений **2.1.9** в тексте диссертации упоминается легкая изомеризация по двойной связи во втором положении имидазолонового цикла, особенно в растворах в полярных растворителях. Однако в экспериментальной части для большинства производных приведены спектральные характеристики для E-изомера. Каким образом устанавливалась конфигурация этой двойной связи и почему в спектрах ЯМР наблюдается лишь один изомер, несмотря на облегченную изомеризацию?

- Почему некоторые соединения ионизируются через отщепление фтора, и в масс-спектре высокого разрешения наблюдается молекулярный ион  $[M-F]^+$ , в то время как большинство соединений ионизируется через классический путь присоединения протона?

- В тексте диссертации не упоминается, как было получено соединение **2.3.11**, однако его

синтез не представляется очевидным. Было ли оно получено автором самостоятельно?

- Большинство соединений, содержащих этиленовый мостик в положении 2 имидазолонового цикла, изображены в E-конфигурации. Устанавливали ли каким-либо образом этот факт?

- На всех схемах в автореферате и диссертации отсутствуют выходы получаемых соединений. Их следовало бы привести, чтобы легко понимать, какие реакции проводились диссертантом, а какие являются литературными и приведены для наглядности.

- В экспериментальной части приведены не только впервые полученные, но и описанные в литературе соединения, однако отсутствуют ссылки на первоначальные источники.

- В схемах некорректно употреблять сокращение "Ph", когда речь идет о дизамещенном бензольном кольце. Для подобных случаев правильнее было бы указывать "C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>".

- В схемах не совсем правомерно употреблять обозначение "NR<sub>2</sub>", когда речь идет, в том числе, об гетероалициклических фрагментах, конденсированных с бензольным кольцом (схема 8 автореферата), или когда имеются ввиду циклические аминные заместители (схема 10 автореферата).

- Во многих схемах использовано не совсем корректное обозначение заместителей с помощью волнистой черты от структуры заместителя. Обычно такое обозначение используют при неопределенности конфигурации, а в данном случае было бы правильнее использовать укороченную связь, заканчивающуюся перпендикулярной волнистой чертой.

Также ряд опечаток и неточностей присутствует в экспериментальной части:

- В масс-спектрах высокого разрешения для ряда соединений приведена неверная брутто-формула (например, **2.2.4b**, **2.2.6a**, **2.2.7d** и некоторые другие).

- Для соединения **2.1.5a** не совпадают найденное и вычисленное значения масс при описании масс-спектра высокого разрешения.

- В спектрах ЯМР <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C некоторых соединений отсутствуют необходимые сигналы (например, для соединений **2.1.9f,c** не хватает двух, а для соединения **2.1.9e** – пяти сигналов углерода в спектрах ЯМР <sup>13</sup>C; для соединения **2.1.5b** не хватает сигнала метильной группы, а для соединения **2.2.11a** – двух протонов в ароматической области в спектрах ЯМР <sup>1</sup>H и т.п.).

- В описании спектра ЯМР <sup>1</sup>H соединения **2.2.3e** допущена опечатка: должно быть указано CH<sub>2</sub> вместо CH<sub>3</sub>. Шифр этого соединения также приведен с ошибкой.

- В описании спектра ЯМР  $^1\text{H}$  соединения **2.2.9a** допущена опечатка: должно быть указано СНО вместо ОН.

Высказанные вопросы и замечания не влияют на общее положительное впечатление от диссертационной работы. Она полностью отвечает самым высоким предъявляемым стандартам, выполнена на отличном теоретическом и экспериментальном уровне. Таким образом, диссертационная работа "Синтез и свойства флуоресцентных красителей на основе аналогов хромофора GFP" представляет собой завершённую научно-квалификационную работу и соответствует требованиям "Положения о присуждении учёных степеней", утверждённого 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), предъявляемым к диссертационным работам на соискание учёной степени кандидата наук. Автор работы, Балева Надежда Сергеевна, несомненно, заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - Биоорганическая химия.

Отзыв заслушан, обсуждён и одобрен на коллоквиуме лаборатории полисеразотистых гетероциклов № 31 Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (протокол №9 от 6 августа 2019 года).

Старший научный сотрудник  
лаборатории №31 ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН,  
кандидат химических наук

Е.А. Князева

Ленинский пр., д. 47, Москва, 119991  
(499)137-13-79; e-mail: sci-secr@ioc.ac.ru  
Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт органической  
химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук  
(ИОХ РАН)

Подпись Е.А. Князевой заверяю:  
Ученый секретарь ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН  
кандидат химических наук



И.К. Коршевец