

ОТЗЫВ

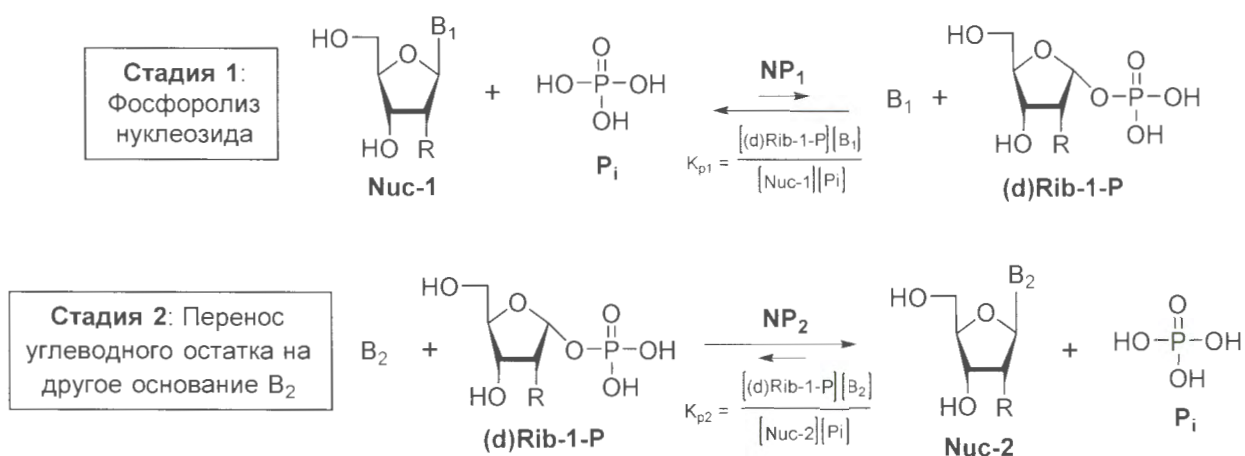
официального оппонента о диссертационной работе **Харитоновой Марии Игоревны** «Нуклеозиды бензимидазола: синтез и изучение свойств», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

К настоящему времени на основе нуклеозидов создано около ста лекарственных препаратов, половина противовирусных и четверть противоопухолевых лекарств являются производными нуклеозидов. Для их получения используется многостадийный химический синтез, во многих случаях ключевой стадией является образование N-гликозидной связи. Химические способы образования этой связи хорошо разработаны и дают удовлетворительные результаты в случае получения рибонуклеозидов. Однако в ряде случаев образуются смеси стерео- и региоизомеров и выделение целевых продуктов связано с их трудоемким разделением. Анализ литературных данных позволяет заключить, что ферментативные методы создания гликозидной связи могут конкурировать с химическими при получении 2'-дезоксинуклеозидов и β -D-арабинофуранозилнуклеозидов.

В последние годы для получения нуклеозидов часто используют нуклеозидфосфорилазы (НФ). К нуклеозидфосфорилазам относятся тимидинфосфорилаза (ТФ) (КФ 2.4.2.4), уридинфосфорилаза (УФ) (КФ 2.4.2.3) и пури́ннуклеозидфосфорилаза (ПНФ) (КФ 2.4.2.1). По данным Google Scholar опубликовано около 3500 статей, в названии которых содержится нуклеозидфосфорилаз (условия поиска в названии: thymidine phosphorylase или uridine phosphorylase или purine nucleoside phosphorylase).

Эти ферменты обнаружены почти у всех организмов, при этом отличия их первичной структуры сравнительно невелики. НФ участвуют в дополнительном пути биосинтеза нуклеозидов и катализируют обратимую реакцию расщепления рибонуклеозидов и 2'-деоксирибонуклеозидов с образованием гетероциклического основания и (2-деокси)рибозо-1-фосфата. Равновесие реакций фосфоролиза сдвинуто в сторону образования нуклеозидов, причем в случае пуриновых более значительно. На этом и основана ферментативная реакция трансгликозилирования, в ходе которой происходит перенос углеводного остатка от одного нуклеозида (Nuc-1) на гетероциклическое основание (B_2) с образованием нового нуклеозида (Nuc-2). Анализ реакции трансгликозилирования показывает, что выходы искомых нуклеозидов зависят от соотношения констант равновесия реакций фосфоролиза нуклеозидов (K_{p1}/K_{p2}). Максимального выхода можно достичь, если равновесие стадии 1 сильно сдвинуто в

сторону образования α -D-рибофуранозо-1-фосфата или α -D-(2-дезокс)рибофуранозо-1-фосфата, а равновесие стадии 2 сдвинуто в сторону целевого нуклеозида (Nuc-2). Поэтому определение констант равновесия и каталитических параметров реакции фосфорилиза и образования нуклеозидов является важным этапом в практическом использовании этих ферментативных превращений. Субстратами для бактериальных ПНФ являются производные пурина, бензимидазола, имидазола, триазола, но и пиримидиновые гетероциклы, что и определяет широкое использование этих ферментов для получения модифицированных нуклеозидов. Из всего сказанного следует актуальность и важность той задачи, которая была поставлена и успешно решена диссертантом.



Реакции ферментативного фосфорилиза нуклеозидов и трансгликозилирования

NP₁, NP₂ – нуклеозидфосфорилазы, B₁ и B₂ – гетероциклические основания, R – H или OH.

Целью исследования Харитоновой Марии Игоревны являлся синтез новых нуклеозидов бензимидазола с помощью НФ и оптимизация параметров синтеза модифицированных нуклеозидов для создания большой библиотеки соединений с различными модификациями в гетероциклическом основании и углеводном остатке. Второй важной задачей исследования являлось определение субстратной специфичности ПНФ *E. coli* по отношению к 4,5,6- и 2,5,6-замещенным бензимидазолам, а также к гетероциклическим основаниям, содержащим атом азота и атом серы или кислорода; синтез модифицированных нуклеозидов бензимидазола как с остатками рибозы и 2-дезоксирибозы, так и нуклеозидов бензимидазола с неприродным углеводными остатками (арабиноза, 2-дезоксидефторарабиноза); изучение антивирусной активности синтезированных нуклеозидов и их цитотоксичности.

Диссертационная работа Харитоновой М.И. изложена на 144 стр. и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения собственных результатов и описания экспериментов, проведенных автором. Диссертационная работа завершается заключением и списком литературы. В приложении приведены экспериментальные ЯМР спектры соединений 8-19, 16-19, 26-31, 43-46, 52, 53 71 и 72.

Литературный обзор диссертации посвящен нуклеозидам бензимидазола, обзор написан очень тщательно и хорошо структурирован. В нем подробно описаны химические методы синтеза этих соединений и их противовирусная и противоопухолевая активность. Отдельная глава посвящена ферментативным способам получения нуклеозидов бензимидазола. Обзор занимает 41 стр. и включает около 143 ссылки. После незначительного редактирования обзор мог бы быть опубликован.

Научная новизна и практическая значимость диссертационной работы Харитоновой М.И. заключаются в следующем:

1. Показано, что 4,6-дизамещенные и 4,5,6-тризамещенные бензимидазолы являются субстратами ПНФ в реакциях рибозилирования и 2-дезоксирибозилирования и осуществлен их синтез с хорошими выходами.
2. Проведена оптимизация ферментативного синтеза 2'-дезоксидефторарабинозидов бензимидазолов, что позволило синтезировать модифицированные нуклеозиды с хорошими выходами.
3. Показано, что C2-амино-5,6-дизамещенные бензимидазолы являются субстратами ПНФ.
4. В результате ферментативной реакции синтеза нуклеозидов бензимидазола образуется смесь N1-N3 региоизомеров. В случае морфолин- и пиррол- содержащих оснований реакция протекает региоспецифично с образованием всего лишь 1-3 % N3-изомера.
5. • ПНФ *E. coli* способна осуществлять реакции гликозилирования по 2-амино-группе бензоксазола, причем в результате реакции сначала синтезируется β -D-фуранозид, который затем изомеризуется в β -D-пиранозид 2-аминобензоксазола.
6. В ходе работы синтезировано 22 новых соединений, структура которых убедительно доказана с помощью УФ-, масс- и ЯМР (^1H , ^{13}C и ^{15}N) спектров, включая $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ и $[^1\text{H}, ^{13}\text{C}]$ 2D: COSY, HSQC, HMBC и NOE спектры.
7. Изучена противовирусная активность всех синтезированных нуклеозидов на моделях вируса простого герпеса 1-го типа (HSV-1, эталонный штамм L2) и вируса клещевого энцефалита (штамм Абсеттаров). Показано, что рибозид 2-амино-5,6-дифторбензимидазола в нецитотоксичных концентрациях проявляет выраженный селективный противовирусный эффект в отношении HSV-1, в том числе в отношении штаммов с лекарственной резистентностью.

В своей диссертационной работе Харитонova М.И. продемонстрировала хорошее владение современными методами биоорганической химии и физико-химического анализа. В работе широко используются ферментативные методы создания гликозидной связи. Разработанные препаративные методы синтеза нуклеозидов на основе

бензимидазолов и обнаружение в ряду этих соединений нового ингибитора вируса простого герпеса является важным вкладом в медицинскую химию нуклеозидов. Экспериментальная часть работы выполнена на современном методическом уровне, достоверность и воспроизводимость полученных результатов не вызывают сомнений. Выводы, сформулированные в диссертационной работе, логически следуют из этапов проделанной экспериментальной работы и вполне обоснованы.

К замечаниям, не влияющим на общую положительную оценку представленной работы, можно отнести следующее:

1. В работе хотелось бы видеть определение констант равновесия и кинетических параметров реакции фосфоролиза и образования нуклеозидов. В литературном обзоре отмечается, что бензимидазол обладает высокой акцепторной способностью. Было показано, что β -D-рибозид бензимидазола является плохим субстратом для фосфоролиза, осуществляемого ПНФ *E. coli*. Возможно, что в случае бензимидазола равновесие реакции фосфоролиза еще сильнее (полностью?) сдвинуто в сторону нуклеозида по сравнению с пуриновыми нуклеозидами.
2. На многочисленных рисунках приведены зависимости конверсии основания в соответствующий нуклеозид и во многих случаях реакция еще не закончилась.
3. В работе исследовались субстратные свойства производных бензимидазола 59, 61 и 63. Неясно, какие нуклеозиды могли бы образоваться в этих случаях?

Сделанные диссертантом выводы и заключения соответствуют полученным в диссертации экспериментальным данным. В целом работа Харитоновой М.И. представляет собой актуальное исследование. По результатам работы опубликовано 4 статьи, три из которых опубликовано в журналах с высоким импакт-фактором *Chemistry A European Journal*, *Synthesis* (2 статьи) и *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Автореферат и опубликованные работы достаточно полно отражают основное содержание диссертации. Работа докладывалась на нескольких конференциях.

Следует отметить общий высокий уровень диссертационной работы Харитоновой М.И. и хорошее представление полученных результатов в диссертации и автореферате. Представленная работа отличается четкостью постановки задачи и оптимальными методами ее решения.

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).

Официальный оппонент

Заведующий лабораторией дизайна и синтеза

биологически активных соединений ИМБ РАН

доктор химических наук, профессор

Михайлов Сергей Николаевич



3 октября 2017 года

Адрес: Ул. Вавилова, д.32, Москва, 119991, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта (ИМБ РАН)

Тел.: (499)135-9733

E-mail: smikh@eimb.ru

Подпись д.х.н., проф. Михайлова С.Н. заверяю

Ученый секретарь ИМБ РАН

к.в.н. Бочаров А.А.

ФИО

МП

