

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

**Актуальность темы исследования**, представленного в диссертации, не вызывает сомнений. Поиск новых лекарственных препаратов для борьбы с вирусными инфекциями и онкологическими заболеваниями ведётся во всём мире. Проблемы, связанные с резистентностью инфекций и низкой специфичностью фармакологических агентов могут решаться различными способами, но основной из них - изучение новых типов потенциально активных веществ и модификация уже существующих. Аналоги природных нуклеозидов - группа соединений, к которой относится значительное количество уже применяемых лекарственных препаратов. Разработка методов получения этих соединений и изучение их свойств - важная задача современной медицинской химии и биотехнологии. Это определяет высокую актуальность работы Харитоновой М.И., посвященной синтезу и исследованию нуклеозидов бензимидазола - аналогов природных пуриновых нуклеозидов с неприродным гетероциклическим основанием. Заявленной целью работы стал синтез новых нуклеозидов бензимидазола с помощью ферментов нуклеозидфосфорилаз для создания библиотеки соединений с различными модификациями в гетероциклическом основании и углеводном остатке. Модификации в разных частях молекулы должны выявить соотношение структура-активность для дальнейшего дизайна возможного противовирусного препарата.

Поставленная цель была достигнута сочетанием методов классического химического синтеза, химико-ферментативных реакций и современных аналитических методов.



**Научная новизна** исследования определяется рядом достигнутых результатов и также очевидна. Автором изучена субстратная специфичность пуриннуклеозидфосфорилазы *E.coli* по отношению к нетипичным для данного фермента субстратам и на базе полученных данных разработан универсальный метод синтеза нуклеозидов замещённых бензимидазолов ферментативным трансгликозилированием, определены границы применимости этого метода. Впервые синтезированы и охарактеризованы 20 новых нуклеозидных аналогов, изучены их противовирусные и цитотоксические свойства. Одно из полученных соединений (2-амино-5,6-дифтор-1-(β-D-рибофуранозил)бензимидазол) оказалось кандидатом на доклинические исследования в качестве препарата для лечения герпетических инфекций в случаях неэффективности ацикловира. Все эти результаты впервые опубликованы автором и подтверждают **теоретическую и практическую значимость** работы. Разработанная методика синтеза модифицированных нуклеозидов может быть внедрена как в лабораторной практике, так и на опытно-промышленных предприятиях биотехнологического профиля для синтеза противовирусных и противоопухолевых препаратов.

Диссертационная работа Харитоновой М.И. изложена на 161 странице текста, содержит 45 рисунков, 28 таблиц и 32 приложения. Структура работы - традиционная, включает введение, 3 главы, заключение, список сокращений и список литературы, который состоит из 185 ссылок.

Во **Введении** приведено обоснование актуальности и научной новизны исследования, ясно сформулированы цели и задачи работы, положения, выносимые на защиту. Также дан общий план экспериментальных работ, включённых в диссертацию.

Первая глава - **Литературный обзор** - состоит из нескольких подразделов, описывающих противовирусную и противоопухолевую активность модифицированных нуклеозидов бензимидазола, возможный механизм их действия и способы их получения, включая химический и



ферментативный синтез. Литературный обзор охватывает более 140 источников, главным образом зарубежных, за период времени с конца 60-х годов 20 века по настоящее время. Обзор можно без преувеличения считать репрезентативным.

**Результаты и обсуждение** (2 глава диссертации) - содержит подробное описание выполненных автором экспериментальных работ по ферментативному синтезу и химической модификации различных типов нуклеозидных аналогов - производных бензимидазола, а также сделанные на основании полученных результатов выводы относительно субстратной специфичности использованных ферментов. Выводы эти носят фундаментальный характер, расширяя существующие представления об активном центре фермента и происходящих в нём реакциях. Также в этой главе описаны результаты исследования противовирусных и цитотоксических свойств синтезированных соединений, позволяющие делать предположения относительно параметров соотношения структура-активность для соединений исследуемого ряда.

Весьма примечательным является раздел 2.1.2 (**Синтез серии 2'-дезоксид-2'-фторарабинозидов 5,6-, 4,6- и 4,5,6-замещенных бензимидазолов**). Столкнувшись с неспособностью нуклеозидфосфорилазы катализировать синтез арабинозидов бензимидазола, автор предположил возможность ингибирования фермента соответствующим продуктом реакции. Проверка этого предположения потребовала разработки химического синтеза модельного соединения, которая и была успешно осуществлена автором, а предположение стало доказанным фактом. Такая последовательность и глубина подхода, в целом характерные для работы, являются её несомненными достоинствами.

Все вновь полученные соединения подробно охарактеризованы, а их структура доказана современными физико-химическими методами, такими как масс-спектрометрия высокого разрешения и двумерная спектроскопия ЯМР. Это также демонстрирует высокий уровень работы и научную



квалификацию автора, **достоверность** и **целостность** материала диссертации.

Раздел **Материалы и методы** содержит исчерпывающую информацию, необходимую для воспроизведения экспериментальных методов, разработанных автором.

Характеризуя диссертацию в целом, можно сделать вывод о том, что Харитонов М.И. выполнила значительное по объёму и результативности исследование в актуальной области биотехнологии. Диссертант демонстрирует отличное владение экспериментальными методами и подходами, умение работать с информацией, планировать эксперимент и делать выводы на основе полученных результатов. Научные положения, вынесенные на защиту, хорошо обоснованы и базируются на достаточном объёме экспериментальных данных. Выводы корректно сформулированы и обоснованы.

Вместе с тем, есть ряд замечаний, не снижающих общую положительную оценку работы.

1. Замечания по оформлению диссертации и автореферата. В тексте присутствует довольно много опечаток, есть ошибки в нумерации соединений (например, в Таблице 1, стр.24 - соединение **4a** указано неверно, на самом деле **1a**), не совсем корректные подписи к рисункам (например, **Рисунок 21 – ЯМР спектр Ara<sup>fur</sup>-BI (26)**, на самом деле на рисунке представлена структура соединения с частично указанными спектральными данными). Есть неудачные выражения (например, в автореферате, стр.3 «Благодаря уникальному механизму действия на мишени, присутствующие только в вирусной клетке,» - понятно, что имел в виду автор, но выражение «вирусная клетка», как минимум, некорректно). Таких примеров немало, и хотелось бы пожелать автору внимательнее относиться к оформлению своих будущих работ.

2. Соединения **59**, **61** и **63** по своей химической структуре не могут быть субстратами нуклеозидфосфорилаз в реакции трансгликозилирования, так



как не могут образовывать гликозидную связь. Непонятно, зачем нужно было проверять субстратную специфичность фермента по отношению к ним?

3. 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 фуранозида по положению N1 с 2-имино-1,3-бензоксазолином - таутомерной формой гетероциклического основания, а затем - внутримолекулярное трансгликозилирование с изомеризацией в пиранозную форму. Впрочем, доказательство любого из механизмов потребовало бы серьёзных дополнительных исследований, лежащих за рамками данной диссертации. Тем не менее, заявленный вывод о необходимости наличия 2-го атома азота в гетероциклическом основании как обязательном условии субстратной специфичности фермента, кажется несколько преждевременным.

Указанные замечания не снижают общей ценности работы. Материалы диссертации апробированы на 8 международных и всероссийских конференциях, опубликованы в 4 статьях в высокорейтинговых международных журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus. Диссертация соответствует специальности 03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

На основании вышеизложенного считаю, что диссертация Харитоновой Марии Игоревны «Нуклеозиды бензимидазола: синтез и изучение свойств» по актуальности, научной новизне, объёму, теоретической и практической значимости полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении учёных 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), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной



степени кандидата наук, а её автор - Харитоновна Мария Игоревна, несомненно, достойна присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент:

кандидат химических наук,  
доцент кафедры биотехнологии и промышленной фармации  
Федерального государственного  
бюджетного образовательного учреждения  
высшего образования  
«Московский технологический университет»

  
Чудинов Михаил Васильевич

Контактная информация:

Адрес: 119571, Москва, Проспект Вернадского, д. 86

Телефон: +7 (495) 246-05-55 доб.896

E-mail: chudinov@mirea.ru

Подпись к.х.н., доц. Чудинова М.В. заверяю

Учёный секретарь

Московского технологического университета



Милованова Н.И.

26.09.2017