

Заключение Диссертационного совета 24.1.037.01,

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

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 22 декабря 2021 г. № 15

О присуждении **Белозеровой Ольге Александровне**, гражданке РФ, ученой степени
кандидата химических наук.

Диссертация "**Синтез и биологическая активность природного лигнана севанола и его аналогов**" по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия принята к защите 20.10.2021 г. (протокол заседания № 11) Диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) (ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997, Приказы Минобрнауки России №75/нк от 15.02.2013 г. и № 561 от 03.06.2021 г.)

Соискатель **Белозерова Ольга Александровна**, 8 мая 1989 года рождения. В 2011 году соискатель окончила Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, в настоящее время работает младшим научным сотрудником в лаборатории биоинформационных методов комбинаторной химии и биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Диссертация выполнена в лаборатории химии метаболических путей отдела биомолекулярной химии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель – кандидат химических наук Кублицкий Вадим Сергеевич, старший научный сотрудник лаборатории химии метаболических путей отдела биомолекулярной химии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Кузнецов Николай Юрьевич, доктор химических наук, старший научный сотрудник лаборатории стереохимии металлоорганических соединений ФГБУН Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук;

Вацадзе Сергей Зурабович, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией супрамолекулярной химии (№2), ФГБУН Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук

дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России» (Сеченовский Университет) в своем **положительном** отзыве, подписанном заместителем директора Института трансляционной медицины и биотехнологии, кандидатом химических наук Труханом Владимиром Михайловичем, и утвержденном проректором по научно-исследовательской работе ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), кандидатом медицинских наук, доцентом, Бунтару Денисом Викторовичем, указала, что диссертационная работа Белозеровой О.А. представляет собой завершённую научно-квалификационную работу и соответствует всем требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного 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; от 20.03.2021 г. № 426, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук, а автор работы Белозерова Ольга Александровна заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – Биоорганическая химия.

Соискатель имеет 7 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 4 работы, из них 3 статьи общим объемом 3.5 печ.л. опубликованы в рецензируемых научных изданиях из списка, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций, и 1 патент. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме диссертации, в которые Белозерова О.А. внесла основной или существенный вклад:

1. Осмаков Д.И., Кошелев С.Г., **Белозерова О.А.**, Кублицкий В.С., Андреев Я.А., Гришин Е.В., Козлов С.А. Биологическая активность севанола и его аналогов // Биоорганическая химия. 2015, Т. 41 № 5. С. 606-611.

2. **Belozerova O.**, Deigin V., Dubinnyi M., Khrushchev A., Kublitski V. The total synthesis of sevanol, a novel lignan isolated from thyme plant (*Thymus armeniacus*) // Tetrahedron. 2018, Т. 74 № 13, С. 1449-1453.

3. **Belozerova O.A.**, Osmakov D.I., Vladimirov A., Koshelev S.G., Chugunov A.O., Andreev Y.A., Palikov V.A., Palikova Y.A., Shaykhutdinova E.R., Gvozd A.N., Dyachenko I.A., Efremov R.G., Kublitski V.S., Kozlov S.A. Sevanol and Its Analogues: Chemical Synthesis, Biological Effects and Molecular Docking // Pharmaceuticals. 2020, Т. 13. № 8. С. 1-21.

4. Кублицкий В.С., **Белозерова О.А.**, Дейгин В.И., Дьяченко И.А., Козлов С.А. Патент на изобретение Способ получения лигнана, обладающего анальгетическим действием, №2019102555/04(004552)

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. **Отзыв официального оппонента д.х.н. Кузнецова Николая Юрьевича.** Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1) В диссертации не приведено значение диастереоселективности реакции алкилирования *трет*-бутилбромацетатом в ходе оптимизации и разработки синтеза три-*трет*-бутилизоцитрата **3** и, соответственно, не рассматривается стереохимическая модель процесса; 2) Не указано соотношение диастереомеров на стадии окислительной димеризации при синтезе аналога севанола **s590**; 3) Что могло помешать реакции успешного десилилирования эфира **16a** TBAF при проведении ее в среде безводного THF?; 4) Каков возможный(е) механизм(ы) реакции FeCl₃-катализируемой реакции димеризации изоцитрата кофейной кислоты **4**? Это гомогенная или гетерогенная реакция?; 5) Насколько является трудоемким выделение севанола из природного возобновляемого сырья по сравнению с разработанным химическим синтезом?; 6) Являются ли ASIC-каналы единственной мишенью севанола и родственных соединений в организме, проводилась ли оценка цитотоксичности севанола? 7) Из результатов докинга севанола в центральном вестибюле канала ASIC1a показано, что изоцитратные фрагменты образуют две водородные связи с остатками Arg369. Как согласуются данные с уменьшением активности аналога севанола **s590**, построенного из остатков яблочной кислоты, имеющей две карбоксильные группы? Проводился ли докинг с производным **s590**?; 8) В разделе анальгетическая активность севанола с одной стороны указывается, что терапевтическое действие севанола *per os* статистически значимо, начиная с 0.1 мг/кг (уксусная кислота), тогда как из графика можно сделать вывод, что дозировка 0.01 мг/кг также значима; 9) В изображении соединений **15b**, **15d**, **16b** вместо аллильных групп нарисованы винильные, соответственно в названиях тоже винильные заместители в экспериментальной части диссертации; 10) В названии **s788** пропущены значения абсолютных конфигураций хиральных центров; 11) В методике синтеза эпифиловой кислоты, по-видимому, пропущена вода, требуемая для гидролиза; 12) Также обнаружены опечатки и неудачные выражение в тексте диссертационной работы.

2. **Отзыв официального оппонента д.х.н. Вацадзе Сергея Зурабовича.** Отзыв положительный, содержит следующие замечания и вопросы:

1) Цель работы: оппоненту непонятно, что такое “структурно-функциональное изучение” – это исследование в области связи “структура-активность”?; 2) обзор литературы: затрудняет понимание материала отсутствие на схемах нумерации продуктов и их выходов (буквенные обозначения появляются только на Схеме 15); 3) обсуждение результатов: “пиридин является менее основным, чем триэтиламин ввиду делокализации электронной пары на азоте” – не очень понятна мысль автора; 4) обсуждение результатов: Схема 36 (то же относится к Схеме 42) – чем можно объяснить полученную стереохимию продукта **s706**: конкретно интересуется причина стереоселективности обеих стадий образования связей С-С – окислительной димеризации и циклизации; 5) обсуждение результатов, стр. 81 и Схема 39 – автор пишет, что природный лигнан представляет собой трикарбоновую кислоту, но изображена гексакарбоновая кислота; 5) экспериментальная часть – ни для одного из промежуточных хиральных соединений не приводятся данные об

оптической чистоте; 6) редакторские: положения, выносимые на защиту – “дигидронафтален”; Схема 1 – это Рисунок; Схема 4 - “ОНЗС”; на Схемах 8 и 9 дигидропроизводные нафталина изображены в виде полноценного нафталина; Схема 12 – пропущены в центральной структуре ОН и ОМе группы; Схема 20 – в тексте говорится об «аза-перегруппировке Кляйзена», однако, не изображено ни одного соединения с атомом азота; автору стоит проверить изображение стереохимии остатка изолимонной кислоты (Схема 29 диссертации; Схема 1 автореферата); «дихлорметилин»; «Fe(асас)»; стр. 134 – «трифликовая кислота»: должно быть «трифторметансульфоновая кислота»; ссылка 29 – не указан год издания; 7) комментарий к Введению: ингибирование фермента циклооксигеназы действием НПВС угнетает не только синтез простагландинов, но и других важных метаболитов каскада арахидоновой кислоты – тромбоксанов, лейкотриенов и ряда других; рецензенту также интересно было бы узнать, насколько богат севанолом чабрец, который можно найти в средней полосе России.

3. **Отзыв ведущей организации.** Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1) В главе 2, посвященной литературному обзору, а именно в разделе 2.6, на мой взгляд, слишком много уделено внимание описанию структуры протон-чувствительного ионного канала и его функционированию; 2) В тексте работы встречаются опечатки в названиях и номенклатуре изучаемых соединений, которые не влияют на понимание описания процесса синтеза и скорее связаны с невнимательностью автора при создании текста диссертационной работы; 3) Недостаточно подробно описан подбор защитных групп для метода синтеза ключевого интермедиата три-*трет*-бутилового эфира изолимонной кислоты. Пробовал ли автор введение других защитных групп и к каким результатом это приводило? Или же изначально выбранный *трет*-бутиловые группы в качестве защит не предусматривали альтернативного варианта? 4) В разделе 3.2 на схеме 39 отражены структуры, которые были исследованы в диссертационной работе. Однако там оказывается структура **s358**, описание как синтеза, так и биологических свойств которой в самой работе не приведено. Что это за структура, являлась ли она также неким неисследованным продуктом реакции димеризации ключевого мономера три-трет-бутилового изоцитрата кофейной кислоты? Проявляла ли она ингибирующую способность? 5) В разделе 3.2.3, посвященному синтезу производных и аналогов севанола **s414** и **ЕА** на схеме 43 не обозначена стереохимия получаемых соединений. Однако в автореферате данная ошибка уже исправлена, поэтому данный недочет является невнимательностью автора при формировании схемы в диссертационной работе; 6) В целом, цифровые обозначения изучаемых аналогов путают читателя и не позволяют с первого взгляда понять, о какой структуре в данный момент идет речь; 7) В разделе 3.3.3, посвященному описанию анальгетического эффекта севанола в тестах *in vivo*, не хватает сравнения проявляемой обезболивающей активности с уже существующими на фармацевтическом рынке обезболивающими препаратами. Есть ли данные и проводились

ли исследования, указывающие на то, является ли севанол лучше или на таком же уровне по сравнению с аналогичными препаратами?

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в области органического синтеза и медицинской химии, которые подтверждены сериями их публикаций в ведущих научных российских и международных журналах. В ведущей организации Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России» (Сеченовский Университет) ведутся работы в области разработки и исследования, в том числе проведения доклинических и клинических испытаний, новых лекарственных препаратов с заданными активными свойствами. Официальный оппонент Кузнецов Николай Юрьевич является высококлассным специалистом в области органической и металлоорганической химии, а также обладает большим опытом в синтезе гетероциклических соединений и изучении стереохимических моделей реакционных процессов. Официальный оппонент Вацадзе Сергей Зурабович является высококлассным специалистом в областях органической и металлоорганической химии, создании средств биовизуализации и фотофизических материалов на их основе, а также медицинской химии. Высокая квалификация официальных оппонентов и представителей ведущей организации позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований впервые разработан метод полного синтеза природного лигнана севанола, который в дальнейшем был оптимизирован для получения необходимого количества изучаемого соединения с целью проведения биологических тестов *in vivo*, *in vitro*, а также доклинических испытаний севанола как лекарственного средства. Также методом полного синтеза подтверждена структура природного лигнана севанола – ингибитора протон-чувствительных ионных каналов (ASIC1a и ASIC3). Разработан метод получения ключевого интермедиата - три-*трет*-бутилового эфира изолимонной кислоты с использованием галоген-уксусного производного, а также методы синтеза ряда аналогов севанола для характеристики их взаимодействия с ASIC-каналами. Проведено исследование влияния функциональных групп и стереоизомерии севанола и его аналогов на эффективность ингибирования ASIC-токов в электрофизиологических исследованиях. Проведено исследование анальгетического эффекта севанола, синтезированного по оптимизированному методу синтеза, при различных способах дистрибуции в тестах *in vivo*.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что в ходе исследования была изучена ингибирующая способность синтезированных соединений и изучен вклад функциональных групп, а также конфигурации стереоцентра ядра севанола в проявляемую биологическую активность, что расширяет представления о связи между

структурой дигидронафталинового лигнана и его активностью. Полученные данные можно использовать для дизайна возможного лекарственного препарата на основе лигнана севанол, обладающего более высокими противовоспалительными и обезболивающими свойствами. Кроме того, на основании проведенного молекулярного докинга севанола на модели крысиного ASIC1a-канала была вдвинута гипотеза о предположительном сайте связывания севанола в изучаемой структуре рецептора.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики заключается в том, что результаты тщательного изучения корреляции между строением молекулы севанола и проявляемыми ингибирующими свойствами по отношению к ASICs-каналам, а также проведенные исследования анальгетической активности севанола продемонстрировали его перспективность в качестве лекарственного препарата. Проведенные исследования были использованы в доклинических испытаниях препарата на основе природного лигнана севанола в рамках Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу»)

Достоверность результатов исследования подтверждается тем, что для экспериментальных работ использовалось сертифицированное оборудование и материалы, показана воспроизводимость результатов в различных условиях. Идентичность синтезированной структуры природного лигнана севанола была полностью подтверждена физико-химическими методами, а именно методами жидкостной хромато-масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии и измерением оптического угла вращения. Идеи и концепции, изложенные в диссертации, базируются на современных представлениях химической и биологической науки, не противоречат мировым литературным данным.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в процессе всех выполненных исследований, разработке и выборе экспериментальных подходов, а также анализе результатов экспериментов. Основные экспериментальные данные получены лично автором, за исключением регистрации ЯМР-спектроскопии (получены в лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН), проведении электрофизиологических тестов и исследования анальгетической активности *in vivo* (выполнены в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН), а также за исключением проведения молекулярного докинга (выполнено в лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН). Белозерова О.А. принимала непосредственное участие в написании и подготовке научных статей по теме диссертации, а также лично представляла результаты работы на конференциях.

В ходе защиты диссертации существенных критических замечаний высказано не было. Были заданы следующие уточняющие вопросы:

- 1) Рассматривалась ли такая схема синтеза, когда изначально планировалась стадия окислительной димеризации, а затем присоединение фрагментов изолимонной кислоты?
- 2) Наличие шести карбоксильных групп в структуре севанола, фактически

сформированных в кластер, предполагает возможность взаимодействия с катионами металлов. Насколько проработана эта часть свойств севанола и изучали ли вы связывание ионов двух-трех валентных металлов и возможный механизм действия? 3) Был проведен докинг *in silico* севанола с ASIC-каналом. Есть ли возможность экспериментально посмотреть взаимодействие мишени с севанолом? Встречаются ли в литературе подобные данные? 4) В своем докладе вы сравнивали эффективность севанола с диклофенаком и упирали на возможное отсутствие значимых побочных эффектов. Какие вы видите перспективы по доклиническим и клиническим испытаниям севанола как лекарственного препарата в сравнении с другими обезболивающими средствами? 5) Испытывали ли вы биологические свойства рацематной смеси севанола? Возможно ли создание препарата на основе диастереомерной смеси в виду ее более простого метода получения?

Соискатель Белозерова О.А. ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию:

1) Да, рассматривалась такая схема синтеза, однако более подробно такую стратегию не исследовали и не проводили оптимизацию. Таким образом, на данный момент сложно сказать, будет ли такая стратегия синтеза севанола успешнее описанной в диссертационной работе. 2) Нет, не пробовали и не изучали. 3) Да, было бы более правильно провести этот анализ с использованием методов РСА или электронной микроскопии. В этом случае можно было бы более достоверно уточнить взаимодействие севанола с ASIC-каналом. В литературе подобных данных не встречали. 4) В рамках исследования действительно сравнивали только с диклофенаком. Однако из литературных данных известно, что ингибирующая способность ибупрофена и аспирина значительно меньше по сравнению с ингибирующей способностью севанола. Таким образом, можно сделать предположение, что севанол проявляет более активные обезболивающие свойства. Что касается вопроса по побочным эффектам, то тщательно их не исследовали. Однако при проведении доклинических испытаний было выявлено, что севанол относится к 4 классу токсичности. Из этого можно сделать предположение, что возможно на клинических испытаниях он не будет проявлять значимых побочных эффектов. Клинические испытания выявят побочные эффекты более подробно. 5) Для доклинических испытаний действительно использовали рацематную смесь в соотношении 1:3. Предыдущие биологические тесты показали, что значимого отличия проявляемой ингибирующей способности оптически чистого севанола и диастереомерной смеси не наблюдалось. Таким образом, возможно использование диастереомерной смеси для разработки лекарственного препарата на основе севанола.

Исходя из вышеизложенного, диссертационный совет заключает, что диссертация Белозеровой О.А. является законченной научно-квалификационной работой, результаты которой вносят существенный вклад в развитие исследований в области органического синтеза, биоорганической химии, а также имеют важное значение для медицины и фармакологии. Работа написана автором самостоятельно и содержит новые и актуальные

научные результаты. Таким образом, диссертационная работа Белозеровой Ольги Александровны "Синтез и биологическая активность природного лигнана севанола и его аналогов", представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия, соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено положением 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, 20.03.2021 г. № 426).

На заседании 22 декабря 2021 года диссертационный совет постановил за решение научной задачи по разработке метода полного синтеза природного лигнана севанола и его аналогов, за исследование структурно-функциональной взаимосвязи между природой изучаемого лигнана и проявляемой им ингибирующей способности по отношению к ASICs-каналам, за изучение проявляемых анальгетических и противовоспалительных эффектов севанола присудить Белозеровой Ольге Александровне ученую степень кандидата химических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 23 человек, из них 7 докторов наук (по специальности рассматриваемой диссертации 1.4.9. Биоорганическая химия), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 23, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель
диссертационного совета
академик РАН, д.х.н.




Иванов Вадим Тихонович

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.ф.-м.н.


Олейников Владимир Александрович

23 декабря 2021 г.