

Отзыв
официального оппонента на диссертацию
Щегравиной Екатерины Сергеевны
на тему “ Новые нерацемические гетероциклические аллоколхициноиды и
наночастицы на их основе: дизайн, синтез, противоопухолевая активность”,
представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук
по специальности 02.00.03 – Органическая химия

Актуальность темы исследования

Широкая распространенность онкологических заболеваний и явно недостаточная эффективность противоопухолевой химиотерапии делают разработку новых противоопухолевых средств актуальной задачей современной органической и медицинской химии. Одним из традиционных подходов в поиске соединений-кандидатов для разработки новых препаратов с улучшенными химиотерапевтическими свойствами является химическая модификация природных противоопухолевых веществ. Зачастую небольшие изменения в их структуре (как например, в случае антрациклиновых антибиотиков или винка-алкалоидов) позволяют добиться существенного повышения эффективности, изменения спектра противоопухолевого действия, снижения токсичности или других побочных реакций. Поэтому, работа Щегравиной Е.С., посвящённая синтезу ранее неизвестных гетероциклических производных колхицина и созданию терапевтических наночастиц на их основе, выполнена в актуальной области органической и медицинской химии.

Одной из ключевых мишеней в противоопухолевой химиотерапии является белок цитоскелета тубулин, вовлеченный в процесс деления клеток (митоз), внутриклеточный транспорт и метастазирование опухолей. Соединения, действующие как антимитотические агенты, представлены в клинической практике, в основном, винка-алкалоидами и таксанами. Они имеют значительные побочные эффекты, оказывающие воздействие на многие системы органов (нейро- и кардиотоксичность, угнетение функций ЖКТ, полиорганная недостаточность). Кроме указанных недостатков, у противоопухолевых средств, существует еще одна нерешенная проблема – развитие множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) в опухолевых клетках. Это явление, являющееся одной из ключевых причин недостаточной эффективности химиотерапии, характеризуется множеством механизмов возникновения и проявляется при использовании большинства противоопухолевых препаратов, в том числе паклитаксела и винкристина.

Природный алкалоид колхицин также способен взаимодействовать с тубулином и относится к классу антимитотических препаратов. Колхицин применяется в терапии средиземноморской лихорадки и острого подагрического артрита, однако его использование для химиотерапии онкологических заболеваний ограничено высокой системной токсичностью и недостаточной противоопухолевой эффективностью. Ввиду широкой распространенности природных источников колхицина, относительной простоты его химической структуры и легкости химических модификаций, это соединение является перспективным скаффолдом для создания новых полусинтетических антимитотических агентов.

Общая структура и апробация работы

Диссертационная работа Щегравиной Е.С. изложена на 191 странице, содержит 18 таблиц, 66 рисунков, 80 схем. Список литературы включает 347 наименований. Результаты работы опубликованы в 5 экспериментальных статьях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus), включая 4 публикации в журналах Q1. Работа прошла успешную апробацию на российских и международных

конференциях и симпозиумах. Кроме того, на наиболее перспективные соединения-кандидаты получены 3 патента РФ, что подчеркивает практическую значимость работы и ее новизну.

Обзор литературы

Приведенный в работе Е.С. Щегравиной обзор литературы (61 страница, 292 источника литературы) освещает широкий спектр вопросов противоопухолевой терапии: от молекулярных основ механизмов действия противоопухолевых препаратов до детального рассмотрения природных и синтетических антимитотических агентов с акцентом на химию и биологические свойства соединений колхицинового ряда. Большое внимание уделено рассмотрению как методов модификации колхицина и его аналогов, так и описанию их антипролиферативных и противоопухолевых свойств, а также анализу корреляций «структура – активность».

Обзор содержит полную информацию о современном состоянии развития химии соединений колхицинового ряда, причем около 1/3 цитируемых работ не старше 10 лет. Анализ биологической части обзора литературы позволяет сформировать представления о наиболее распространенных проблемах при использовании химиотерапевтических препаратов, а данные во второй части обзора являются надежным фундаментом для выбранных автором наиболее перспективных и ранее практически не исследованных направлений развития химии антимитотических агентов колхицинового ряда.

Научная новизна

Целью диссертационной работы Щегравиной Е.С. поставлена разработка методологии синтеза нерацемических гетероциклических колхициноидов. Для достижения поставленной цели разработан ряд эффективных подходов для аннелирования гетероциклических ядер к колхициноидам и методов модификации полученных производных, которые позволили автору достичь намеченную цель работы. В ходе выполнения исследования были получены следующие основные научные результаты:

1. Разработаны и реализованы новые направления модификации колхицина, которые позволили синтезировать ряд нерацемических колхициноидов с гетероциклическим кольцом D и исследовать их некоторые химические свойства.

2. Получена серия ранее неизвестных полусинтетических производных колхицина и проведен скрининг их биологических свойств.

3. Анализ корреляции «структура – биологическая активность» выявил наиболее важные фармакофорные фрагменты, ответственные за связывание с белком тубулином, на основе чего были синтезированы соединения, обладающие высокой антипролиферативной активностью, способные в наномолярном и субнаномолярном диапазонах концентраций ингибировать рост опухолевых клеток.

4. Получено производное фураноаллоколхицина на порядок более активное *in vitro* по сравнению с природным колхицином, но при этом ~ в 6 раз менее токсичное ($LD_{50} = 30$ мг/кг). Для комплекса этого производного с тубулином проведено кристаллографическое исследование структуры, установлены аминокислотные остатки сайта связывания, важные для взаимодействия с колхициноидом.

5. Впервые синтезированы фосфолипидные колхициноид-содержащие пролекарства; получены их энзиматически-расщепляемые липосомальные формы. Полученные наночастицы устойчивы в биологических средах и обладают сниженной токсичностью по сравнению с интактными молекулами.

Библиотека новых гетероциклических аллоколхициноидов синтезирована с использованием широкого набора химических трансформаций. Перегруппировкой Фаворского проведено сокращение цикла C колхицинового скелета. Каталитические реакции кросс-сочетания (реакция Хека, Соногаширы, Бахвальда-Хартвига, пост-Ульмана) использованы для формирования гетероциклических фрагментов. Различные

модификации функциональных групп и перициклические реакции использованы для диверсификации полученных колхициноидов. Для создания пролекарственных форм использована реакция медь-катализируемого азид-алкин циклоприсоединения (клик-реакция). Показано, что целевые соединения не претерпевают рацемизации даже при использовании агрессивных реагентов и высоких температур.

Необходимо отметить, что для каждой серии колхициноидов были проведены первичные биологические тесты, включающие определение антипролиферативной активности и влияния на клеточный цикл. Для наиболее перспективного соединения-кандидата проведена оценка противоопухолевой эффективности на модели солидной опухоли, изучены токсикологические свойства, получен комплекс с тубулином и определены основные контакты комплексообразования.

Для одного из перспективных колхициноидов разработаны и получены липидные пролекарственные формы, содержащие остаток фосфатидилхолина - матриксного компонента биологических мембран. На основе синтезированных пролекарств получены фермент-чувствительные липосомы с достаточно высоким содержанием активного компонента (5 мол.%). Показано, что липосомальные формы устойчивы в биологических средах, способны к эффективному расщеплению таргетным ферментом фосфолипазой A2 и проявляют меньшую токсичность по сравнению с исходными молекулами.

Достоверность полученных результатов

Результаты рецензируемой работы и достоверность сформулированных заключений сомнений не вызывают, поскольку они получены на основе квалифицированного применения современных подходов органического синтеза и методов физико-химического исследования органических соединений: ЯМР- и масс-спектроскопии, ИК-спектроскопии, элементного анализа и поляриметрии. Биологические испытания проведены по известным протоколам с применением МТТ-теста и колхицина в качестве препарата сравнения, методами проточной цитометрии и конфокальной флуоресцентной микроскопии. Полученные результаты обсуждены с использованием новых данных современной химической литературы.

Практическая значимость

Практическая ценность полученных результатов определяется следующим:

- разработаны общие методы синтеза нерацемических пирроло-, фурано- и дигидрофураноаллоколхициноидов, позволяющие получать высокоактивные молекулы-лиганды колхицинового сайта тубулина, проявляющие сниженную токсичность по сравнению с колхицином;
- установлены важные для связывания с белком фармакофорные группы, что послужит ориентиром для синтеза новых антимиотических препаратов колхицинового ряда;
- созданы липидные пролекарства колхициноидов и терапевтические наночастицы на их основе, что позволит в дальнейшем разработать эффективную систему таргетной доставки колхициноидов к поврежденным тканям и в перспективе снизить токсичность препаратов, и внедрить соединения колхицинового ряда в клиническую практику.

Замечания

В целом, исследование выполнено на высоком научном уровне, а диссертация отличается связностью и логичностью изложения, что говорит об Авторе, как о сложившемся ученом и компетентном специалисте в области медицинской химии, владеющим широким кругом практических навыков и теоретических знаний. Однако по работе Е.С. Щегравиной следует сделать ряд замечаний.

1. Сформулированные в диссертации выводы скорее являются констатацией полученных результатов, нежели сформированным на их основании умозаключениями.
2. Хотя свойства полученных соединений детально исследованы широким набором спектральных методов, а их структура и индивидуальность подтверждена данными элементного анализа, в характеристике новых веществ имеется ряд недочетов. Прежде всего, отсутствует отнесение сигналов в спектрах ЯМР, а также не отмечены сигналы эквивалентных ядер для симметричных заместителей. Кроме того, в работе отсутствуют электронные спектры поглощения для новых соединений. ЭСП является важнейшей характеристикой органических веществ (особенно окрашенных), открывающей возможности для исследования их электронной структуры, сопряжения и взаимного влияния функциональных групп в хромофорных системах.
3. В работе имеется ряд ошибок в структурных формулах и названиях веществ. Так, пропущены гетероатомы в структуре конъюгата **166** (Схема 43), метаболитов **223** и **224** (экспериментальная часть) или метильная группа в структуре соединения **194 b** (Схема 60). Допущена ошибка в нумерации соединения **118e** (Таблица 4). В названиях соединений по IUPAC перечисление радикалов и заместителей следует давать в соответствии с алфавитным признаком с одинаковыми окончаниями (см. например, «2-иод**о**-3-амино-8-бром**о**», «2-иод**д**-3-трифторацетамидо-8-бром**м**», «3"-этил-2"-пропилиндол»).
4. В биологической части работы также имеется ряд недочетов. Так, в экспериментальной части отсутствует информация о методиках тестирования токсичности и противоопухолевой эффективности соединений, а также линии рака молочной железы, использованной для модели опухоли *in vivo*. Следует также отметить, что под противоопухолевой активностью обычно подразумевают торможение роста опухолей на моделях *in vivo*, поэтому фраза «Противоопухолевая активность ... исследована при ингибировании пролиферации опухолевых клеток» не совсем корректна. Допущены ошибки при описании использованных опухолевых линий («рак толстого кишечника», «штамм лейкемии», «рак груди», «карцинома легких», «клетки толстого кишечника») или биологических процессов («ингибирует активность тубулина», «скорость апоптоза»). Неясен смысл фразы и приведенные дозы: «инъекции препарата **197с** оказались более токсичны при внутрибрюшинном введении, чем при внутривенном (0.8 мг/кг и 2.0 мг/кг соответственно). LD50 составила 0.3 мг/кг (i.p.) и 0.8 мг/кг (i.v.)». В подписи к рисунку **48** дано описание для гистограмм В–D, однако представлены только три гистограммы А–С.
5. В экспериментальной части, при описании методик, масса и количество используемых реагентов приводится с разной точностью. Например, «к 4-хлорколхицину **170** (1 г)...Продукт получен с выходом 43% (431 мг).
Большинство сделанных замечаний касается оформления работы и не снижают научной значимости диссертационного исследования, общего высокого качества работы и не подвергают сомнению достоверность полученных результатов.

Заключение

В ходе выполнения диссертационной работы Щегравина Екатерина Сергеевна провела оригинальное научное исследование в области синтеза новых гетероциклических производных колхицина и их пролекарственных форм, которое позволило оценить потенциал их практического применения для разработки новых химиотерапевтических средств.

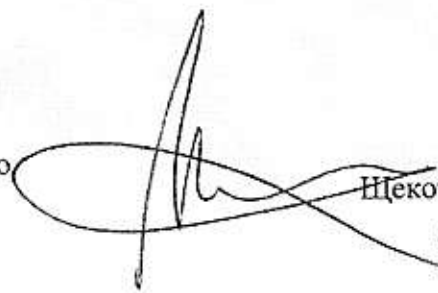
По теме диссертации опубликовано 5 статей в высокорейтинговых международных журналах, входящих в перечень ВАК и опубликованы тезисы 8 докладов на научных

конференциях. Печатные работы и автореферат в полной мере отражают содержание диссертации.

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационного исследования, могут быть рекомендованы для применения в научных организациях, работающих в области синтеза и исследования биологически активных веществ: Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, РОНЦ им. Н.Н. Блохина, Химический факультет ННГУ им. Н.И. Лобачевского, ИОХ им. Н.Д. Зелинского, ИМХ им. Г.А. Разуваева РАН, ИОХ им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, ИОрХ им. А.Е. Фаворского СО РАН, РУДН, РХТУ им. Д.И. Менделеева, и др.

Диссертационная работа Щегравиной Е.С. «Новые нерацемические гетероциклические аллоколхициноиды и наночастицы на их основе: дизайн, синтез, противоопухолевая активность» по поставленным задачам, уровню их решения, объему материала, актуальности, научной новизне и достоверности результатов, безусловно, соответствует всем требованиям п. 9 «Положении о порядке присуждения учёных степеней» (утвержденном Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.07.2013 в редакции Постановления Правительства РФ №335 21.04.2016), а ее автор – **Щегравина Екатерина Сергеевна** заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности **02.00.03 – Органическая химия**.

Директор,
Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Научно-
исследовательский институт по изысканию
новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»


Щекотихин А.Е.
Андрей
Егорович

Специальность, по которой официальным
оппонентом защищена диссертация:
02.00.03 – «органическая химия».

Контактные данные:
Тел.: 8 (499) 246-9980
E-mail: shchekotikhin@mail.ru

Адрес официального места работы:
119021, Москва, ул. Большая Пироговская,
дом 11, строение 1

Подпись Щекотихина А.Е. удостоверяю
К.х.н., ученый секретарь
Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Научно-
исследовательский институт по
изысканию новых антибиотиков имени
Г.Ф. Гаузе»



Кисиль О.В.

15.11.19