

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
**ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

Россия 142432 г. Черноголовка Московская обл. Северный проезд, д.1. ИФАВ РАН
Тел: (496) 524-95-08 • Факс: (496) 524-95-08

«Утверждаю»

ВРИО директора ИФАВ РАН

С.Г. Клочков

«18» ноября 2019 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологически активных веществ Российской академии наук на диссертационную работу **Щегравиной Екатерины Сергеевны** «Новые нерацемические гетероциклические аллоколхициноиды и наночастицы на их основе: дизайн, синтез, противоопухолевая активность», представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности: 02.00.03 – органическая химия.

Актуальность темы исследования.

Онкологические заболевания прочно удерживают второе место по причинам смертности людей во всем мире. В связи с широким распространением и агрессивным течением данного заболевания поиск новых противоопухолевых препаратов является актуальной задачей.

Одной из распространенных мишеней в химиотерапии рака является клеточный белок тубулин. Он участвует в процессах митоза, внутриклеточного транспорта и метастазирования опухолей. Антимитотические агенты представлены в клинической практике, в основном, *Vinca*-алкалоидами и таксанами. Они оказывают серьезные негативные эффекты, затрагивая работу многих систем органов. Также стоит упомянуть о высокой стоимости данных препаратов вследствие сильной ограниченности их природных источников и отсутствием промышленно релевантных синтетических методов их получения. Кроме того, использование данных препаратов становится неэффективным вследствие быстро развивающейся резистентности опухолей. Это явление характеризуется множеством механизмов возникновения и наблюдается при использовании паклитаксела и винкристина.

Природный алкалоид колхицин также способен взаимодействовать с тубулином и является антимитотическим агентом. Колхицин применяется в терапии средиземноморской лихорадки и острого подагрического артрита, однако применение колхицина в качестве агента химиотерапии онкозаболеваний ограничено вследствие высокой системной токсичности.

Токсическое действие колхицина основано на разрушении нормальной сети микротрубочек цитоскелета, что приводит к а) нарушению синтеза белка в аппарате Гольджи; б) утрате клетками своей формы; в) угнетению клеточной подвижности и внутриклеточного транспорта; г) остановке митоза и индукции апоптотических процессов; д) нарушению проводимости и сократимости кардиомиоцитов, что провоцирует заболевания сердечно-сосудистой системы.

Поскольку мишенью для колхицина является белок тубулин, который присутствует во всех клетках организма, то токсическое действие колхицина распространяется не только на опухолевые, но и на здоровые клетки различных тканей и органов. Продолжительное токсическое действие (острый период наблюдается около трех недель) объясняется характером связывания колхицина с тубулином – период полураспада комплекса белок-лиганд составляет около 35 часов. Изменение характера взаимодействия, а именно быстрое образование комплекса и его диссоциация, позволят снизить общую токсичность препарата и усилить его антивазкулярные свойства. Кроме того, одним из эффективных методов снижения токсичности является инкапсулирование активного препарата в наноразмерные системы доставки, высвобождающие лекарство под действием определенных факторов (температура, pH среды, облучение, ультразвук, действие ферментов).

Таким образом, диссертационная работа Щегравиной Е.С., направленная на разработку методов синтеза новых антимитотических агентов колхицинового ряда и создания пролекарственных форм и систем доставки данных активных соединений, является комплексным исследованием в рамках одной из актуальных областей современной органической и медицинской химии.

Научная новизна.

В ходе выполнения своего исследования Е.С. Щегравина получила следующие научные результаты:

1. Получены серии гетероциклических аллоколхициноидов, содержащий пиррольный и фурановый фрагмент в качестве цикла *D* колхицинового скелета. Выявлены наиболее важные элементы в структуре соединений, ответственные за проявление высокой цитотоксической активности соединений

2. Для всех целевых соединений проведены первичные биологические исследования их цитотоксической активности и влияния на клеточный цикл. Для наиболее перспективных соединений проведены тесты *in vivo*.
3. Для одного из соединений получен комплекс с тубулином, определены основные контакты с аминокислотным окружением лиганда.
4. Синтезированы фосфолипидные энзиматически-расщепляемые пролекарственные формы колхициноидов. Данные пролекарства обладают сниженной токсичностью по сравнению с интактными молекулами, стабильны в биологических средах и способны эффективно расщепляться ферментом фосфолипаза А2.

Общая структура и апробация работы.

Диссертационная работа Е.С. Щегравиной построена по классической схеме: состоит из введения, обзора актуальной литературы по теме исследования, представления полученных результатов и их обсуждения, описания экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 191 странице, включает 347 ссылок цитируемой литературы, 18 таблиц, 80 схем и 66 рисунков. Работа опубликована в 5 научных статьях и трех патентах РФ, доложена на 8 научных конференциях.

Глава I диссертации посвящена литературному обзору, в котором подробно описана роль тубулина в химиотерапии опухолей, приведены механизмы развития резистентности, биологические аспекты развития апоптоза под действием противоопухолевых соединений. Во второй части литературного обзора описаны основные классы антимитотических агентов, отмечены их достоинства и слабые стороны. Особый акцент сделан на производных колхицинового ряда. Автором собраны сведения о подавляющем большинстве производных колхицина с модифицированными циклами *A*, *B*, *C*, а также с модификациями боковых цепей, гибридных соединениях и пролекарственных формах, что всесторонне отражает мировой уровень исследований химии колхициноидов. Автором проводится анализ биологической активности тех или иных соединений в зависимости от их структуры.

Глава II посвящена представлению и обсуждению полученных диссертантом экспериментальных результатов. Проведен синтез нескольких типов гетероциклических аллоколхициноидов непосредственно из природного колхицина. В ходе работы были использованы такие химические трансформации как перегруппировка типа Фаворского, позволяющая сократить цикл *C* колхицинового скелета с семи- до шестичленного, синтез индолов по Фишеру, реакции C-C, C-N кросс-сочетания, применяемые для создания гетероциклических фрагментов, различные трансформации функциональных групп, перициклические реакции. Для создания липидных производных был использован метод

конъюгирования - реакция медь-катализируемого азид-алкин циклоприсоединения (клик-реакция). Подтверждено, что целевые соединения не подвергаются рацемизации даже при использовании агрессивных реагентов и высоких температур.

Для всех целевых соединений было проведено определение цитотоксической активности и влияния на клеточный цикл. Для наиболее активного колхициноида была определена полулетальная доза (LD_{50}) и получен комплекс с тубулином, определены аминокислотные остатки, участвующие во взаимодействии с лигандом.

Колхициноид, содержащий экзо-связь в дигидрофурановом цикле D, был использован для создания фосфолипидных пролекарственных форм, способных к энзиматическому расщеплению ферментом фосфолипазой A2, который является неотъемлемым маркером процессов воспаления и онкогенеза.

Глава III диссертации представляет собой описание экспериментальной части работы. Здесь приведена приборная база, использованная при выполнении работы, включая основные рабочие параметры. Подробно описаны методики синтеза полученных в ходе работы соединений, приведены все необходимые данные физико-химического анализа (описание ЯМР, ИК- и масс-спектров, результаты элементного анализа). Описаны методы проведения биологических и биофизических экспериментов с полученными соединениями, а также протоколы для работы с липосомальными формами колхициноидов.

Выводы в полной мере соответствуют проведённому исследованию и **адекватно описывают** полученные результаты.

Достоверность полученных результатов.

Состав и структура полученных в работе соединений полностью подтверждена с применением современных методов физико-химического исследования: ЯМР- и масс-спектропии, рентгеноструктурного анализа и элементного анализа, проведен анализ спектрально-люминесцентных свойств. Часть работы, посвященная изучению биологической активности новых соединений, также не вызывает вопросов и выполнена с применением современных биомедицинских методик (МТТ-тестирование, конфокальный анализ, проточная цитометрия и др.). Для установления распределения фосфолипидных производных колхициноидов в липидных пленках были использованы методы молекулярной динамики. Полученные результаты проанализированы с позиции новых данных современной химической литературы. Таким образом, приведённые в диссертации результаты и выводы полностью аргументированы **и не вызывают сомнений в их достоверности и доказанности.**

Практическая значимость.

Синтезированные в рамках диссертационного исследования подтвердили свою эффективность в рамках исследования *in vitro*. Автором был сделан переход к пролекарственным формам для дальнейших опытов *in vivo*, а также сделаны предложения по усовершенствованию липосомальных систем доставки, что, несомненно, приближает использование в практической деятельности результатов данного исследования. Таким образом практическая значимость выполненной работы в приложении к биомедицинскому применению **не вызывает сомнений**.

Замечания.

Работа Е.С. Щегравиной выполнена на высоком экспериментальном уровне, тщательно оформлена, изложена четко и аргументированно. Однако следует отметить некоторые недостатки.

1. Имеется несколько опечаток и пунктуационных ошибок в литературном обзоре на страницах 25, 30, 34, 39; в обсуждении результатов на страницах 109, 114, в экспериментальной части на страницах 126, 132, 137, 153, 156, 165.
2. В схемах и в основном тексте названия растворителей и реагентов указываются как на английском, так и на русском языке. Следует придерживаться единообразия в названиях.
3. В экспериментальной части отсутствует подробное описание процесса получения кристаллов комплекса тубулина с колхициноидом **203a**.

Апробация работы и публикации.

По теме диссертации опубликовано 5 статей (все включены в базы данных Web of Science или Scopus). Данные статьи опубликованы в высокорейтинговых журналах: *J. Med. Chem.* (ACS), *Eur. J. Org. Chem.* (Wiley), *Eur. J. Med. Chem.* (Elsevier), *Synthesis* (Thieme), *Bioconj. Chem.* (ACS). Материал опробирован также в виде 8 докладов на молодёжных, всероссийских и международных научных конференциях.

Возможность использования результатов.

Результаты, полученные в данном диссертационном исследовании, представляют научный интерес и могут быть рекомендованы для использования в работе ряда научных центров: Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, МИРЭА - Российского технологического университета (его подразделения Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова), Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ФГБУ Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена Минздрава России и

других ведущих научных коллективов, проводящих исследования в области химии природных соединений и их применения в медицинской практике.

Заключение.

Представленная диссертация полностью соответствует требованиям пп. 9-14 Постановления Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» (с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ от 01.10.2018 г. № 1168), предъявляемых к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата химических наук и отвечает паспорту специальности ВАК 02.00.03 - органическая химия по следующим пунктам: 1. «Выделение и очистка новых соединений», 3. «Развитие рациональных путей синтеза сложных молекул», 7. «Выявление закономерностей типа «структура – свойство», а ее автор, Щегривина Екатерина Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03 - органическая химия.

Отзыв подготовлен доктором химических наук, член-корреспондентом РАН, научным руководителем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологически активных веществ Российской академии наук Бачуриным Сергеем Олеговичем.

Отзыв обсуждён и утверждён на совместном заседании отделов фундаментальной органической химии и медицинской и биологической химии (протокол № 5 от 15 ноября 2019 года).

Научный руководитель

Федерального государственного

бюджетного учреждения науки

Института физиологически активных

веществ РАН, член-корр. РАН, д.х.н.

(03.01.04).

профессор

Бачурин Сергей Олегович

142432, Московская область, Ногинский район, г. Черноголовка, Северный проезд, 1, ИФАВ РАН; телефон: +7(496)524-9508; адрес электронной почты: bachurin@ipac.ac.ru

Подпись С.О. Бачурина заверяю
уг. секретарь ИФАВ РАН



/Т.Н. Великохатко/