

ОТЗЫВ

официального оппонента Щекотихина Андрея Егоровича
на диссертационную работу Петрова Ростислава Александровича
«Дизайн и синтез конъюгатов лигандов асиалогликопротеинового рецептора с
противоопухолевыми препаратами для направленной доставки в клетки печени»
по специальности 02.00.03 – Органическая химия

Актуальность темы работы. Недостаточная эффективность химиотерапии онкологических заболеваний делает актуальной тематикой поиск новых лекарственных средств. Особой задачей является устранение побочных эффектов современных противоопухолевых агентов. Развиваемая в представленной работе стратегия направленного транспорта лекарственных средств в опухоли - быстро развивающаяся область научных изысканий, в рамках которой ежегодно публикуются сотни работ. Стоит отметить, что особенно перспективен синтез ковалентных конъюгатов низкомолекулярных лекарственных средств. Однако, поиск синтетических подходов к конъюгатам лекарственных препаратов всегда представляет собой сложную и нетривиальную задачу. На основании этого считаю, что настоящая работа актуальна, перспективна и востребована в области органической и медицинской химии

Общая структура работы. Работа представлена в виде шести разделов: введение, обзор литературы на тему «Средства адресной доставки лекарственных препаратов в клетки печени», обсуждение результатов, экспериментальная часть, выводы и список цитируемой литературы. Диссертация изложена на 120 страницах машинописного текста и включает 51 рисунок, 7 таблиц и список цитируемой литературы из 123 наименований.

В **обзоре литературы** освещаются современные способы создания систем направленного транспорта терапевтических агентов с низкой молекулярной массой, преимущества и недостатки этих систем по сравнению с другими средствами адресной доставки. Присутствует глава, посвященная мишени адресной доставки в гепатоциты – асиалогликопротеинового рецептору, где подробно разбираются его строение и структуры его лигандов. Упоминаются и уже существующие примеры низкомолекулярных систем адресной доставки. Каждый раздел заканчивается кратким обобщением, упрощающим понимание изложенного.

Новизна проведенных исследований и полученных результатов состоит в том, что автору удалось провести дизайн и синтез новых высокоаффинных триантенарных лигандов асиалогликопротеинового рецептора на основе производных N-ацетилгалактозамина, исследовать связывание лигандов с рецептором методом поверхностного плазмонного резонанса, разработать низкомолекулярные средства адресной доставки в рамках стратегии «лекарственный препарат как точка ветвления лигандов ASGP-R» и исследовать цитотоксичность и внутриклеточное накопление полученных новых низкомолекулярных систем направленного транспорта, определить величины IC₅₀ и показать внутриклеточное распределение ряда конъюгатов.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов, рекомендаций и заключений. Работа прошла хорошую апробацию на российских и международных конференциях и симпозиумах и, в целом, выполнена на современном научном уровне. Для идентификации новых соединений автор успешно применил комплекс физико-химических методов анализа: ¹H, ¹³C ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии MALDI-TOF и высокого разрешения. Наиболее важные результаты исследований опубликованы в рецензируемых российских и зарубежных журналах, индексируемых в базе данных Web of Science, Scopus и РИНЦ и рекомендованных диссертационным советом МГУ. Таким образом, уровень и достоверность полученных результатов не вызывают сомнений.

Значимость результатов, полученных в работе, для науки и практики. Безусловно, исследование, выполненное автором, имеет важное научное и практическое значение, поскольку в ходе работы был проведен дизайн и сложный многостадийный синтез новых триантенарных лигандов ASGP-R на основе производных N-ацетилгалактозамина. Методом ППР показано, что полученные лиганды обладают высоким сродством к рецептору, на основании чего была сформулирована и реализована стратегия «лекарственный препарат как точка ветвления лигандов ASGP-R». Для некоторых синтезированных в рамках этой концепции лигандов было изучено внутриклеточное распределение и проведен скрининг антипролиферативных свойств.

Публикации по теме работы. Основное содержание диссертационного исследования отражено в 13 работах, в том числе в 3 статьях, опубликованных в журналах, индексируемых в базе данных Web of Science, Scopus и РИНЦ и рекомендованных

диссертационным советом МГУ, и в 10 тезисах докладов на российских и международных научных конференциях.

Таким образом, на основании анализа текста работы и публикаций автора можно заявить, что **цель** работы, сформулированная во введении, автором **достигнута**, а сопутствующие ей **задачи выполнены**. Представленные в работе **научные положения, выводы и рекомендации** являются обоснованными. Автореферат и публикации **полностью отражают** содержание диссертационной работы.

Замечания. Работа выполнена на высоком экспериментальном и теоретическом уровне, однако на некоторые критические замечания следует обратить внимание:

1. Прежде всего, конъюгирование с лигандами ASGP рецептора проведено без учета механизма действия терапевтических агентов и данных о связи-структура активность. Так, хорошо известно, что аминогруппа в гликозидной части антрациклинов играет важную роль в связывании с ДНК и противоопухолевой активности этих антибиотиков. Кроме того, хорошо известно, что амидная группа даже в N-трифторацетамидном производном доксорубина (препарат AD-41) не расщепляется в клетках, и поэтому N-ацильные производные антрациклинов слабо влияют на опухолевый рост *in vitro*. Таким образом, вполне предсказуемо, что конъюгаты доксорубина с ASGP-лигандами с амидными спейсерами будут слабо связываться с ДНК и плохо действовать на опухолевые клетки, что и было подтверждено данными флуоресцентной микроскопии и тестированием антипролиферативной активности.
2. Вывод о том, что «Протекание гидролиза по группе C31(O) согласуется с большей кислотностью соответствующей карбоксильной группы (для RC31OОН pKa1=2.89, для RC27OОН pKa2=4.41 [101]) (соединение **38**, стр. 63)» не согласуется с общепринятыми константами кислотности глутаминовой кислоты (pKa=2.16 (α -карбоксильная группа) и 4.15 (ω -карбоксильная группа)).
3. В описании спектров ЯМР полученных соединений имеется ряд недочетов. Прежде всего, при обсуждении ^1H ЯМР-спектров автор часто использует несколько устаревшую аббревиатуру «ПМР», а также термин более присущий ИК-спектроскопии «характеристичные пики». В спектрах ^{13}C ЯМР указана частота 400 МГц, которая не соответствует заявленному ЯМР спектрометру («Bruker Avance»). Спектры ^{13}C ЯМР для соединений **12**, **33** не соответствуют приписываемым структурам. В ^{13}C ЯМР спектре соединения **14** отсутствуют значения химических сдвигов для ряда атомов углерода: 111.4-131.5 (-CH= (15-20)).

4. В работе отсутствуют важные физико-химические константы для полученных веществ, такие как $t_{пл.}$, $[\alpha]_D$, ИК, УФ-спектры, данные о хроматографической подвижности продуктов, сведения о чистоте продуктов и их гомогенности.
5. Допущен ряд ошибок в структурных формулах (метотрексат (стр. 7); доксорубицин (стр. 7,8, 15); цистеин бисакриламид (стр. 16); дитиобис(сульфосукцинимидил пропионата) (стр. 16); камптотецин (рис. 14, стр.17), а также в названиях соединений (производные карбоксималонового эфира (стр.12); 3-[бис(диметиламино)метил]-3Н-бензотриазол-1-оксид (НВТУ, стр.56); трибутил; бутоксисарбонил; бутилоксокарбонил).
6. В некоторых случаях автор использует не совсем корректные или неуместные термины. Так, для оценки аффинности лигандов к рецептору автор некорректно использует: IC_{50} (стр. 22); «константы диссоциации моносахаридов (стр. 42)». В Таблице 3, и на рис. 21, таб. 4 и др. приведены константы ингибирования лигандов (K_i), однако не указана о каком ингибировании идет речь (конкурирование с асиалоорозомукоидом). Исследованные биологические свойства полученных веществ автор называет «цитотоксичность», а для их оценки использует количественный параметр « CC_{50} ». Однако МТТ или МТС-тесты, прежде всего, используют для исследования влияния веществ на пролиферацию опухолевых клеток (в сравнении с контролем). Поэтому более уместно говорить об оценке антипролиферативной активности, с использованием величины « IC_{50} ». Методом флуоресцентной микроскопии автор оценивает «внутриклеточное накопление» доксорубицина и его конъюгатов, однако более корректно эту часть работы следует назвать «исследованием внутриклеточной локализации соединений».
7. В работе отсутствует список сокращений, что затрудняет воспроизведение ряда схем и методик (TMSOTF, EDC, EDCI, AcCN). В экспериментальной части не приведены названия ряда продуктов (соединение (12), соединение (13), синтез триацилированного гекс-5-иновой кислотой рибавирина и т.д.), а также отсутствует нумерация соединений в обзоре литературы и синтетических схем, что затрудняет восприятие материала. Так на стр. 52 в описании реакции указано, что «Сопряженное присоединение нуклеофильного агента в β -положение енона», однако не ясно о каком еноне идет речь, поскольку на схеме отсутствуют еноны.
8. Масса реагентов в методиках указывается с разной точностью (например, 1 г и 0.0205 г). Использование «мг» и «ммоль» позволяют избежать использования громоздких цифр (0.0534 г, 0.0000271 моль). Кроме того, удивляет, что для жидких веществ в методиках приведен вес реагентов, причем определенный с очень

высокой точностью (1.15 мг (1.1 экв.) NEt_3 ; 2.11 мг (1.1 экв.) EDC и т.д.). Как автору удалось взвешивать с такой точностью и вносить в реакцию эти количества реагентов, особенно в случае нестабильных жидких веществ, таких как EDC?

9. Список цитируемой литературы выполнен с нарушением требований к оформлению библиографических описаний в соответствии с ГОСТ 7.1-2003. В работе используется два десятичных разделителя - запятые и точки.
10. Небрежное оформление, ряд опечаток, неудачных фраз и терминов, а также жаргонных выражений, несколько снижают общее хорошее впечатление о диссертационной работе («гидразонная связь» (стр. 8); «гидрозид» (стр. 13); «мостиковый кеталь» (стр. 35, 36), «Данный белок» (глутатион, стр.15); «карбонильной группы (стр. 53)» «осуществили постановку защитной Cbz-группы» «аккуратно прикапывали» «линкер для связывания препарата с лекарственным агентом»; «Соединения (24) синтезировали при помощи метода карбодиимидного синтеза»; «биологические тесты на цитотоксичность»; «Снимки, сделанные при помощи микроскопа, доксорубицина»; « CD_3Cl »; «10 Таблеток продажного препарата рибавирина с содержанием исходного вещества 0.2 г, с примесями вспомогательных веществ»; «натриевую соль в растворе воды»; «пермешивали»; «в системе с градиентом концентраций системе с градиентом концентраций»; «реакционная смесь растворили»; «растворитель удалили под пониженным давлением»; «муравьиная кислота удалили».

Тем не менее, отмеченные замечания не снижают научной значимости исследования и не влияют на достоверность, а также основные выводы, сделанные в работе.

Заключение по диссертационной работе. Резюмируя вышесказанное, можно утверждать, что Петровым Р. А. выполнено оригинальное научное исследование в области разработки средств адресной доставки лекарственных препаратов. По актуальности поставленных задач, научной новизне, достоверности, теоретической и практической значимости результатов, степени обоснованности выводов, объему выполненных исследований диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 02.00.03 - «органическая химия» (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно положениям №5,6 Положения о

диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Петров Ростислав Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03 - «органическая химия»

Официальный оппонент:

Директор ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»
профессор РАН, доктор химических наук



Щекотихин Андрей Егорович

Контактные данные:

Тел.: 

E-mail: 

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация
02.00.03 - «органическая химия»

Адрес официального места работы:

119021, Москва, ул. Большая Пироговская, дом 11, строение 1

Подпись Щекотихина А.Е. удост
Ученый Секретарь ФГБНУ «НИИ
новых антибиотиков имени Г.Ф.



Кисиль Ольга Валерьевна