

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Успенской Анастасии Алексеевны «Синтез и оптимизация структуры линкера лигандов простатического специфического мембранного антигена и получение конъюгатов на их основе», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 1.4.3 – «Органическая химия» и 1.4.9 – «Биоорганическая химия»

Актуальность работы.

Онкологические заболевания сегодня представляют собой значительную социальную проблему и, по данным ВОЗ, находятся на шестом месте среди причин смертности во всех возрастных категориях. В связи с этим создание новых противораковых препаратов не перестает быть актуальной задачей для всех смежных областей: медицины, биологии, химии. Одним из перспективных подходов к созданию противораковых препаратов нового поколения является создание систем адресной доставки лекарств или диагностических препаратов. Представленная работа посвящена созданию в качестве вектор-молекул низкомолекулярных лигандов на основе мочевины, избирательно связывающихся с простатическим специфическим мембранным антигеном. Такой постановкой задачи определяется безусловная актуальность данного исследования.

Общая структура работы. Диссертационная работа Успенской А. А. представлена на 207 страницах, машинописного текста и включает 58 рисунков, 25 схем, 7 таблиц. Состоит из шести разделов: введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка литературы, в котором приведено 180 наименований цитируемой литературы.

Обсуждению полученных в данном исследовании результатов предшествует литературный обзор, посвященный анализу структурных особенностей лигандов ПСМА. Особое внимание уделяется структурным особенностям линкеров, связывающих молекулу ингибитора с лекарством. Приведенные в литературном обзоре данные свидетельствуют о существенном влиянии структуры линкера на терапевтическую активность конъюгатов и позволяют сформулировать основные направления структурного дизайна при создании нового поколения препаратов на основе производных мочевины.

В результате проведенного исследования автором синтезирована серия лигандов ПСМА на основе мочевины DCL, содержащим дипептидные линкеры на основе фенилаланина и тирозина с разной комбинацией асимметрических центров, исследовано влияние конфигурации асимметрических центров и заместителей в пептидах на селективность и активность полученных диагностических и терапевтических конъюгатов. Решение этих задач потребовало от диссертанта разработки синтетических подходов к целевым молекулам и их предшественникам, оптимизации условий синтеза и выделения соответствующих дипептидов. Несмотря на первый взгляд тривиальные синтетические подходы к сборке пептидов, в каждом конкретном случае в зависимости от комбинации заместителей в пептидной последовательности автору приходилось оптимизировать условия синтеза и менять методологию. В результате варьирования условий синтеза, подбора защитных групп и активирующих агентов, условий снятия защитных групп были получены серии дипептидов на основе фенилаланина и тирозина и приведены доказательства сохранения конфигурации асимметрических центров в найденных условиях. Важным этапом работы явилось создание лигандов на основе полученных дипептидных комбинаций и DCL. На данном этапе работы также понадобился тщательный подбор условий синтеза, оптимизация условий постановки и снятия защитных групп, анализ возможных побочных процессов, что определяло выбор основной стратегии проведения синтеза. Так автором было установлено, что при использовании дипептидной последовательности с фенилаланином в качестве N-конца эффективным является жидкофазный синтез, в случае последовательности с тирозином в качестве N-конца наилучшие выходы дает синтез на твердой фазе. На данном этапе работы обоснование выбора условий процесса, также как и на предыдущем этапе, было регламентировано необходимостью сохранения конфигурации асимметрических центров. В каждом случае контролировались оптические углы вращения.

Строение всех полученных дипептидов, линкеров и лигандов на их основе доказано с помощью всех современных физико-химических методов: ЯМР спектроскопии, высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. Интерпретация спектральных данных проведена на должном уровне

и свидетельствует о высокой квалификации Успенской А.А. в области владения физико-химическими методами установления структуры органических соединений.

В рамках проведенного исследования для всех полученных лигандов ПСМА была исследована аффинность *in vitro* на клеточной линии LNCaP. Анализ полученных результатов показал, что оптимальной для первой аминокислоты в линкере является L-конфигурация и значительное влияние на аффинность оказывают заместители в ароматических фрагментах тирозина. В результате в качестве оптимального лиганда для создания терапевтического конъюгата была выбрана дипептидная последовательность L-Phe-L-Tyr(3-NO₂), а для конъюгирования с флуоресцентными метками L-Phe-L-Tyr(3-NO₂), L-Tyr-L-Tyr и L-Phe-L-Tyr. Справедливость данного выбора была подтверждена данными молекулярного моделирования.

Завершающим этапом данного исследования являлся синтез соответствующих диагностических и терапевтических конъюгатов. Эта проблема была успешно решена с помощью современного и эффективного метода клик-реакций (азид-алкиновое циклоприсоединение). В данном случае был проведен тщательный анализ возможных условий синтеза с целью обеспечения сохранения конфигурации асимметрических центров. В результате оптимизации условий реакции было установлено, что важным условием успешного проведения процесса является порядок смешения реагентов. В итоге были синтезированы серия из шести неописанных ранее диагностических конъюгатов с флуоресцентными метками Sulfo-Cy-5-алкин, Sulfo-Cy-7-алкин, FAM-5-алкин и терапевтический конъюгат с монометил ауристатином E-алкин. Данные конъюгаты были тщательно исследованы с точки зрения их физико-химических свойств, таких как растворимость, гидрофобность и оптические свойства. Проведение биологических испытаний на *in vitro* и *in vivo* моделях убедительно показало эффективность диагностических конъюгатов и высокую специфичность терапевтического конъюгата.

Экспериментальная часть представленной работы является очень объемной в силу описания синтеза как предшественников целевых соединений, так и более ста неописанных ранее. Все новые соединения описаны с помощью всех необходимых физико-химических методов, данные тщательно проанализированы и

доказательство структуры не вызывает сомнений. При выполнении эксперимента использованы все необходимые приемы анализа протекания процессов, выделения и очистки соединений, такие как методы хроматографии, включая хроматографию на обращенной фазе, высокоэффективной жидкостной хроматографии, ЯМР спектроскопии, хромато масс спектрометрии, масс-спектрометрии высокого разрешения.

Таким образом, подытоживая результаты объемного синтетического эксперимента и биологических испытаний, можно заключить, что выбранная стратегия создания новых конъюгатов оказалась верной и поставленная в работе задача успешно решена.

Научная новизна

Выявленные в данном исследовании закономерности, отражающие зависимость активности и физико-химических характеристик полученных лигандов от пространственной структуры и природы заместителей в линкерах, позволяют сформулировать основные направления структурного дизайна лигандов ПСМА на основе производных мочевины DCL. Развитие этого направления в создании новых диагностических и терапевтических препаратов представляется достаточно перспективным.

По диссертационной работе имеются следующие замечания:

В тексте представленной диссертации имеются опечатки и стилистические неточности, что скорее всего связано с большим объемом исследования. Помимо технических опечаток присутствуют ошибки в номенклатуре соединений. Так на странице 18 изображенный на схеме карбамат назван карбонатом, на стр. 27 аббревиатура ICG, обозначающая конкретный карбоцианин – индоцианиновый зеленый, применена к нескольким структурам с другими заместителями при кватернизированном атоме азота. Правильнее было бы обозначить их общим термином «гептаметиновые флуорофоры» или «гептаметиновые индоцианины». На страницах 80 и 84 использование формулировки «ароматическое кольцо при атоме лизина» никак не отражает о какой модификации структуры лизина идет речь. На странице 84 при обсуждении данных молекулярного докинга цифровые значения называются «показатели докинга», какие показатели имеются в виду не указывается.

Все перечисленные замечания носят формальный характер и никак не умаляют значимости данного исследования.

В целом диссертационная работа представляет собой многоплановое профессионально выполненное, завершённое исследование. Его основные результаты опубликованы в международных рецензируемых изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus) и рекомендованных диссертационным советом МГУ. Результаты работы прошли апробацию на научных международных и Всероссийских конференциях.

Диссертационная работа отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспортам специальностей 1.4.3 – «Органическая химия» и 1.4.9 – «Биоорганическая 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 приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель **Успенская Анастасия Алексеевна** заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 1.4.3 – «Органическая химия» и 1.4.9 – «Биоорганическая химия».

Официальный оппонент:
кандидат химических наук, доцент,
ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова»,
доцент кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза
химического факультета
Подругина Татьяна Александровна
«12» апреля 2022 г.

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 02.00.03 – «Органиче-
Адрес места работы:
119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские го-
Ломоносова, Химический факультет

Ларионова Н.



МГУ имени М.В.