

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Григорьевой Татьяны Алексеевны** «Оптимизация мембранотропных свойств ингибиторов белок-белкового взаимодействия MDM2-p53», представленную на соискание ученой степени *кандидата химических наук* по специальности *02.00.10 - биоорганическая химия*

Создание новых эффективных препаратов для химиотерапии раковых опухолей остается важнейшей задачей современной фармакологии. На ранних исторических этапах поиск противоопухолевых лекарств проводился прежде всего среди химических соединений, способных повреждать злокачественные клетки за счёт химических реакций с клеточными компонентами. В настоящее время, вследствие развития наших знаний и технических возможностей центральным направлением создания лекарств является поиск соединений, обладающих направленным действием на строго определенную биологическую молекулу (биомишень) и позволяющих за счёт этого блокировать заданные клеточные процессы. Несмотря на широкий список известных противоопухолевых соединений, остается насущная необходимость в появлении новых препаратов, селективно действующих на определённые виды опухолей и биомишени. Диссертация Григорьевой Т.А. выполнена в указанном направлении, и её целью явилось "создание мембранотропных реактиваторов белка p53 на основе исследования белок-белкового взаимодействия MDM2-p53". Фактически, работа направлена на создание высокоселективных препаратов, ингибирующих белок MDM2 и, одновременно, обладающих способностью преодолевать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Белок MDM2 является известной биомишенью благодаря его способности подавлять путём связывания активность белка p53. Последний является ключевой регуляторной молекулой клетки, обеспечивающей, в том числе, апоптоз раковых клеток. Второе рассматриваемое направление придания селективности – преодоление ГЭБ, необходимо для воздействия на метастазы в головном мозге, которые являются распространённым осложнением протекания рака. В целом, выбор темы диссертации представляется актуальным и обоснованным.

Диссертация Григорьевой Т.А. состоит из введения, главы с литературным обзором, двух глав с обсуждением результатов и экспериментальной частью, заключения и списка цитируемой литературы из 179 публикаций.

Литературный обзор состоит из 10 параграфов, в которых рассмотрены химиотерапия опухолей головного мозга, природа и свойства ГЭБ, способы доставки препаратов в головной мозг и оценка их эффективности, строение и свойства белка p53,

ингибиторы белка MDM2. Автор изложила историю и текущее состояние исследований по указанным темам, указала на существующие в них проблемы. В частности, четыре параграфа литературного обзора уделены вопросам, связанным с ГЭБ. Автор обсудила строение ГЭБ, механизмы преодоления ГЭБ за счёт диффузии, активного транспорта или модификации препаратов. Подробно представлены методы оценки способности молекул преодолевать ГЭБ. Далее, описана роль белка p53 в регуляции клетки, в том числе, за счёт взаимодействия с убиквитинлигазами, к числу которых принадлежит белок MDM2. Описаны известные классы низкомолекулярных ингибиторов MDM2, структурные аспекты взаимодействий лигандов с центром связывания белка, пути их поиска и разработки. Представленный анализ литературы хорошо описывает область исследований диссертации.

Обсуждение результатов в главе 2 автор начинает с изложения предложенной схемы создания мембранотропных реактиваторов белка p53. Используемые подходы включают компьютерные расчёты, химический синтез, экспериментальные проверки активности на опухолевых клетках *in vitro*. Были синтезированы и изучены оптимизированные производные изоиндолинона, известные как ингибиторы MDM2, и производные 3-иминоиндолинона, разработанные в лаборатории молекулярной фармакологии СПбГТИ(ТУ). На первом этапе (раздел 2.2) методами компьютерного моделирования проведено моделирование представительного ряда ингибиторов из 45 соединений. Для оценки ADME свойств ($\log P$, $\log S$, проникновение через ГЭБ, связывание с транспортным белком гликопротеином-P) использовали несколько интернет сервисов. При этом, как отметила автор, не все из них дали хорошие результаты. Связывание молекул с активным центром MDM2 изучено с помощью пакета программ молекулярного докинга GOLD, широко используемого в прикладных расчётах. Для докинга использованы три разные экспериментальные структуры, что позволило в определённой мере учесть подвижность фрагментов белка. Проведённые расчёты дали основание отсеять часть изученных структур по критериям растворимости и способности связываться с гликопротеином-P. Результаты докинга показали, что производные исходного изоиндолинона образуют более прочные комплексы, в том числе за счёт дополнительных взаимодействий в центре связывания.

Далее, в разделе 2.3 описан синтез сложных эфиров 2,3-замещённых 3-гидроксиизоиндолин-1-онов. Изложены схемы и этапы синтеза, идентификация полученных веществ. Всего в диссертации синтезировано около 50 соединений этой серии, подавляющее большинство которых не были известны ранее. Для веществ, включающих два оптических центра, проведено разделение диастереомеров методами

хроматографии и изучен состав продуктов методами ЯМР и квантовой химии (раздел 2.8).

В разделе 2.4 подробно описан разработанный в диссертации экспериментальный метод оценки способности веществ преодолевать мембраны эндотелиоцитов ГЭБ. В качестве его основы использован общий подход по параллельному испытанию проницаемости искусственных мембран (РАМРА) на много-луночных планшетах (состав – 96 лунок). Установка по измерению прохождения мембраны состояла из ячейки, разделённой на донорный и акцепторный отсеки с помощью имитирующей ГЭБ мембраны. На основе анализа литературных данных о липидном составе ГЭБ для измерений были выбраны три варианта липидных смесей, наносимых на синтетическую подложку мембраны. В частности, использовали фосфатидилхолин, фосфатидилэтоламин и фосфатидилсерин в различных пропорциях в додекане. Результаты измерений эффективной проницаемости P_e через 16 часов для 10 выбранных производных индолинона, фуросемида и кофеина (последние два вещества взяты для контроля) сопоставлены с данными расчётов $\log P$ и $\log S$. Липидные слои разного состава в основном дали достаточно близкие значения P_e , но в нескольких случаях прохождение соединения выражено зависело от состава мембраны. Измерения P_e в контроле хорошо коррелируют с низкой способностью фуросемида и высокой способностью кофеина проникать в центральную нервную систему. Выраженной корреляции между измеренными значениями проницаемости и расчётными показателями ADME не найдено. Обнаружено, что среди изученных 2,3-замещённых 3-гидроксиизоиндолинонов наилучшей способностью преодолевать мембраны обладают эфиры фенилглицина и валина.

Результаты изучения биологической активности синтезированных веществ представлены в разделах 2.6 – 2.10. Способность ингибиторов MDM2 вызывать p53-опосредованный апоптоз раковых клеток проверена на модели клеток U2OS остеосаркомы человека, генерирующих повышенный уровень зелёного флуоресцентного белка EGFP в ответ на увеличение активности p53 в клетке. Экспериментальная установка определяла общее количество клеток и процент флуоресцирующих клеток в планшете через 24 часа после обработки ингибиторами. В качестве соединения сравнения использовали известный ингибитор нутлин-3а. Общую токсичность соединений контролировали по количеству сохранившихся клеток U2OS с нокаутом p53. Введение ингибиторов приводило к снижению количества испытываемых клеток и увеличению свечения белка EGFP, в то же время количество клеток, не имеющих p53, практически не изменялось. Экспрессия белка p53 в изученных системах

подтверждена вестерн-блоттом. Полученные данные свидетельствуют о том, что изученные соединения действительно запускают p53-опосредованный механизм гибели клеток. Цитофлуорометрические тесты на апоптоз по связыванию аннексина V на клетках карциномы кишечника человека HCT-116 подтвердили значительное увеличение (>30%) доли апоптотических клеток после обработки сложными эфирами 2,3-замещённых 3-гидроксиизоиндолинонов и производными 3-иминоиндолинона.

Глава 3 диссертации содержит экспериментальную часть, включающую подробное описание использованных научных подходов и синтезированных веществ. Представлены этапы подготовки данных и проведения вычислительного докинга лигандов в активный центр белка MDM2 и расчётов характеристик ADME. Описаны технические условия проведения химического синтеза и схемы получения продуктов. Структуры продуктов подтверждали методами масс-спектрометрии и ЯМР ¹H (400МГц). Представлены химические формулы нескольких десятков полученных соединений, выходы продуктов, описания ЯМР и масс-спектров, методики хроматографического разделения диастереомеров. В разделе по методам изучения транспортных свойств приведён липидный состав искусственных мембран, использованных в методе ПАМРА, описана экспериментальная установка на основе 96-луночных планшетов и способы проведения измерений. В разделе по методам изучения биологической активности веществ подробно описаны использованные линии опухолевых клеток U2OS и HCT-116, условия их культивирования. Скрининг клеток по их количеству и уровню флуоресценции белка EGFP проводили на 96-луночных планшетах распознающей системы Operetta (компания Perkin Elmer). Также, описан метод проточной цитометрии, использованный в работе для регистрации влияния синтезированных веществ на апоптоз по связыванию флуоресцеин-конъюгированного аннексина V.

В конце работы представлены выводы, которые последовательно, обоснованно и достоверно отражают полученные результаты и содержание диссертации.

Диссертация хорошо оформлена, легко читается, включает достаточное количество иллюстраций, поясняющих методики работы, графиков и таблиц. В работе имеется незначительное количество опечаток.

Таким образом, основные результаты диссертационной работы Т.А. Григорьевой включают: 1) химический синтез представительного ряда новых соединений из двух классов ингибиторов белка MDM2, 2) изучение способности выбранных соединений связываться с биомишенью методом докинга, 3) экспериментальное и *in silico* изучение ADME свойств ингибиторов, включая транспортные свойства на моделях ГЭБ, 4)

тестирование *in vitro* активации белка p53 в раковых клетках при введении ингибиторов MDM2. Выраженным достоинством работы является нацеленность на применение и развитие методов широкомасштабного скрининга препаратов. Поставленные в работе сложные цели, на мой взгляд, достигнуты. Результаты определения биологической активности полученных веществ могут найти практическое применение при создании новых реактиваторов белка p53, развитая методика определения эффективной проницаемости через мембраны может быть использована при изучении транспорта через ГЭБ.

Прочтение диссертации и автореферата позволило сделать ряд замечаний:

1. Для белка-мишени диссертант использует название MDM2. Учитывая, что первая буква в сокращении названия соответствует слову *murine* – мышинный, и что в работе изучены белки человека, более точным было бы использовать сокращение hDM2 (от слова *human* – человеческий), как это принято в литературе.
2. На с.10 автореферата и с.52 диссертации, при описании результатов докинга замещённых 3-гидроксиизоиндолинонов автор пишет, что роль заместителей в новых соединениях состоит в формировании дополнительных взаимодействий с N-концевым доменом мишени. Однако, это, по-видимому, не единственный фактор, поскольку рис. 2 в автореферате показывает, что для сравниваемых соединений также меняется положение фармакофора изоиндолинона в активном центре.
3. Следует отметить не самую удачную форму записи формулы (1) на с.59. В этом представлении, логарифм проницаемости P_e равен логарифму некоего выражения. При этом, под знаком логарифма в правой части стоит размерная величина, что формально является ошибкой. Правильным было бы просто написать, что P_e равно использованному выражению. Также, в тексте диссертации отсутствует прямая ссылка на источник формулы (1).
4. Недостатком оформления автореферата является отсутствие описания некоторых использованных в тексте и таблицах величин (см., например, с.8-9).

Сделанные замечания касаются технической стороны и не затрагивают существа и выводов работы. В целом, диссертация Григорьевой Т.А. представляет собой завершённое исследование в важной и современной области науки, выполненное на высоком научно-методическом и инструментально-техническом уровне и обладающее высокой методической и практической значимостью. Результаты диссертации представлены на десяти конференциях различного уровня. Автореферат и печатные работы по теме исследования (8 статей в научных журналах, рекомендованных ВАК) в полной мере отражают содержание диссертации.

