

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета Карцовой Людмилы Алексеевны на диссертацию Шароновой Татьяны Валерьевны на тему «О перспективах использования ингибиторов карбоангидразы человека в противораковой терапии», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.16. Медицинская химия.

Целью диссертационной работы Шароновой Т.В. явилась оценка возможности применения ингибиторов карбоангидразы человека в противораковой терапии. Известно 15 изоформ карбоангидразы человека (КАЧ), схожих по строению активного сайта, но существенно различающихся по тканевому распределению, каталитической активности и субклеточной локализации. Для мембранных изоформ КАЧ IX и XII – валидных лекарственных мишеней в противораковой терапии – обнаружена повышенная экспрессия в опухолях с одним и тем же механизмом: смена метаболического пути на гликолитический. Запущенный каскад реакций приводит к изменению рН микроокружения, вызывая ацидоз и способствуя инвазии и миграции опухолевых клеток. Эти изоформы КАЧ и явились предметом пристального внимания диссертанта. В последнее время стали появляться сообщения, в которых ингибиторы КАЧ IX/XII используют в качестве адьювантных агентов в комбинации с известными таргетными препаратами для подавления роста культур раковых клеток. Перспективным направлением в противораковой терапии является и разработка мультитаргетных препаратов, направленных сразу же на нескольких мишеней, участвующих в онкогенезе, включая КАЧ IX/XII. Поэтому поиск новых комбинаций ингибиторов КАЧ IX/XII с другими цитостатическими агентами и изучение их противоракового потенциала являются **актуальными** задачами современной медицинской химии. Эти задачи ставятся и решаются в данной диссертационной работе.

Соответствие паспорту специальности

Диссертация соответствует паспорту специальности 1.4.16. Медицинская химия по ряду позиций: поиск, структурный дизайн и синтез соединений-лидеров – потенциальных физиологически активных (лекарственных) веществ, на основе знания структурных параметров биомишени или особенностей патогенеза; анализ и модификация структур известных активных соединений; синтез и биологическое тестирование широкого разнообразия химических соединений; рациональное создание физиологически активных соединений, действующих на две и более молекулярные мишени; биологическое и физиологическое (*in vitro* и *in vivo*) тестирование сконструированных и синтезированных соединений на предмет изучения особенностей их взаимодействия с молекулярными мишенями организма.

Структура диссертационной работы

Диссертационная работа Шароновой Татьяны Валерьевны содержит Введение, 3 главы (Обзор литературных данных, Обсуждение результатов, Экспериментальная часть) Выводы, Заключение, Список сокращений и условных обозначений, Список цитируемых публикаций (149 наименований).

Обзор литературных данных (*первая глава*) посвящен обсуждению особенностям строения IX и XII изоформ карбоангидразы человека и их связи с гипоксией и ацидозом. Акцентируется внимание на том, что ингибиторы КАЧ IX/XII способны лишь несколько снизить пролиферацию раковых клеток, но при этом могут рассматриваться в сочетании с агентами, влияющими на онкогенез, как потенциальные противораковые средства. Открытия в области адьювантной терапии при лечении рака показали, что ингибитор КАЧ IX/XII (SLC-0111) в комбинации с гемцитабином значительно потенцирует действие последнего, приводя лучшему результату, чем достигаемый при применении этих агентов по отдельности. Отмечено, что практически отсутствует информация о мультитаргетном подходе, предполагающем одновременное ингибирование КАЧ и других мишеней, участвующих в онкогенезе.

Тщательный анализ литературных данных позволил диссертанту выработать стратегию постановки собственных экспериментов при решении поставленных задач: получение бензолсульфонамид-содержащих соединений с разнообразной молекулярной периферией; изучение их ингибирующего действия в отношении различных изоформ КАЧ с использованием биологических тест-систем, определение их антипролиферативного действия с оценкой потенциала в противораковой терапии.

Вторая глава посвящена обсуждению полученных диссертантом результатов. Логика запланированного исследования включала поиск ингибиторов КАЧ для применения в противораковой терапии в качестве индивидуальных агентов; изучение ингибиторного профиля продуктов внедрения карбеноидов по *NH*-связи и перегруппировки Вольфа; выявление ингибиторной активности в отношении КАЧ IX и XII как критерий отбора соединений при разработке новых противораковых средств; двойное таргетирование, направленное на ингибирование IX и XII изоформ КАЧ, а также на другие мишени, связанные с онкогенезом; комбинирование фармакофорных фрагментов в составе молекулы одного ингибитора; выявление противораковых свойств ингибиторов КАЧ IX и XII в комбинации с противоопухолевым препаратом gefitinibом.

При планировании синтеза ингибиторов диссертант принял во внимание то обстоятельство, что сульфонамиды остаются основным каркасом в дизайне новых препаратов, поскольку известно, что ингибирующий эффект напрямую связан с сульфонамидной группой и потерей ингибирования при ее удалении. В работе осуществлен двустадийный синтез α -диазо- γ -лактамов, исходных α -диазомоно- и α -дiazодикарбонильных соединений с генерацией карбоксибензолсульфонилазида *in situ*, участвующего в реакции диазопереноса; проведена катализируемая солями Rh^{II} реакция *NH*-внедрения диазокарбонильных соединений в ароматические аминсульфонамиды.

В процессе синтеза ингибиторов КАЧ, диссертант сделал ряд принципиальных наблюдений. Установлено, что для менее реакционноспособных линейных диазокарбонильных соединений потребовались более жесткие условия проведения реакции. Обнаружено отрицательное влияние ароматических групп с сильными донорными заместителями (4-MeOC₆H₄ и 2-MeOC₆H₄) в составе диазокарбонильного производного на выход целевого продукта. Варьирование молекулярной периферии и скрининг полученных соединений в отношении различных изоформ КАЧ явился эффективной стратегией поиска высокоактивных ингибиторов противораковых

мишеней КАЧ. Следует отметить, что в разработке ингибиторов КАЧ потенциал диазохимии практически не был ранее применен, несмотря на очевидную перспективность.

Исследование ингибиторной активности синтезированных соединений, проведенное диссертантом, основывалось на сравнении с эталонным ингибитором КАЧ ацетазоламидом (AAZ) при помощи кинетического метода остановленной струи. Панель ферментов включала четыре физиологически значимые изоформы, цитозольные КАЧ I и II и трансмембранные КАЧ IX и XII, экспрессируемые в опухолях. Диссертантом установлено, что большинство протестированных соединений продемонстрировали низкую или умеренную активность по отношению к КАЧ I. Ингибиторные свойства полученных веществ в отношении КАЧ II оказались более выраженными. При этом некоторые из синтезированных соединений обладали более высокой ингибиторной активностью по отношению к КАЧ IX в сравнении с ацетазоламидом.

Одним из необходимых этапов доклинического изучения новых биологически активных молекул является выявление их безопасности. Полученные диссертантом соединения с сульфонамидной группой протестированы на предмет их способности подавлять пролиферацию раковых клеток в условиях гипоксии с помощью стандартизованного МТТ-теста. При этом многие из обнаруженных низконанолярных ингибиторов КАЧ IX/XII не проявили заметной антипролиферативной активности.

Диссертант обратил внимание на явное несоответствие между способностью некоторых высокоактивных ингибиторов КАЧ IX/XII блокировать каталитическую функцию фермента и их действием на раковые клетки. Принимая во внимание информацию о том, что ингибиторный профиль КАЧ IX/XII обладает несколько ограниченной предсказательной силой в отношении противораковой активности, диссертант предпринял попытку обобщить и систематизировать соединения, заметно подавляющие рост раковых клеток и при этом обладающие совершенно разными уровнями ингибиторной активности против КАЧ IX/XII.

Несомненно важной частью диссертационной работы является рассмотренная перспективность использования ингибиторов КАЧ IX/XII в качестве компонентов комбинированной терапии, т.е. либо наличие двух разных фармакофоров в одной молекуле ингибитора, либо сочетание ингибиторов КАЧ IX/XII с известными противоопухолевыми препаратами или цитостатическими агентами с иным механизмом действия.

Одной из перспективных стратегий создания новых лекарственных молекул является молекулярная гибридизация, основанная на объединении в структуре лекарственного агента двух или более фармакофорных субъединиц. Диссертантом синтезировано соединение, объединяющее в себе два ключевых фармакофорных фрагмента (сульфонамидная группа и фрагмент акцептора Михаэля) для выявления возможности одновременное ингибирования двух различных защитных механизмов: против гипоксии и окислительного стресса. Объединение фармакофоров ингибиторов КАЧ и тиоредоксинредуктазы (TrxR) в структуре одного агента привело к значительно выраженному эффекту против клеток протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, подтвердив потенциально более высокую эффективность комбинированного

подхода в разработке потенциальных противораковых агентов.

На основе имеющихся публикации и собственных результатов диссертант приходит к заключению, что ингибиторный профиль КАЧ IX/XII обладает несколько ограниченной предсказательной силой в отношении противораковой активности соединений. В связи с этим запланирован и реализован специальный блок экспериментов по изучению противораковых свойств ингибиторов КАЧ IX и XII в комбинации с противоопухолевым препаратом. В условиях гипоксии в качестве таргетного препарата был взят gefitinib, а в качестве адьювантных агентов – два ингибитора КАЧ IX/XII, значения K_i которых в отношении этих двух изоформ КАЧ различались примерно на порядок. Установлено, что комбинации ингибиторов КАЧ IX/XII (2.19 и 2.16г) с gefitinibом существенно потенцировало действие последнего и оказали большее влияние не только на выживаемость раковых клеток, но и на их подвижность, что является важным фактором метастазирования опухолей. Оценка клеточной миграции проводилась в режиме реального времени электроимпедансным методом.

Таким образом, убедительно показано, что поскольку адаптация раковых клеток к гипоксическим условиям способствует выбросу метастазов, а ингибиторы КАЧ IX/XII эффективно действуют на метастатический потенциал опухолевых клеток, использование ингибиторов КАЧ IX/XII в противораковой терапии как части комбинационной терапии имеет большие перспективы.

В третьей главе дается характеристика реагентам и методам исследования. В диссертационной работе использован весьма широкий арсенал физико-химических методов анализа: ЯМР-спектроскопия на ядрах ^1H и ^{13}C , методы масс-спектрометрии, обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ ВЭЖХ) и препаративная колоночная хроматография. Кинетику ингибирования рекомбинантных изоформ КАЧ измеряли методом остановленной струи.

Научная новизна работы

Синтезирован и охарактеризован ряд бензолсульфонамидов посредством нового синтетического подхода, основанного на использовании диазосоединений. Впервые получено соединение, содержащее в своей структуре фармакофорные элементы, ответственные за ингибирование карбоангидразы, а также фермента тиоредоксинредуктазы и изучено его противораковое действие. Установлено, что объединение фармакофоров ингибиторов КАЧ и тиоредоксинредуктазы (TrxR) в структуре одного агента привело к значительно выраженному эффекту против клеток протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, подтвердив потенциально более высокую эффективность комбинированного подхода в разработке потенциальных противораковых агентов. Показано, что комбинации ингибиторов КАЧ IX/XII с gefitinibом существенно потенцировало действие последнего и оказали большее влияние не только на выживаемость раковых клеток, но и на их подвижность, что является важным фактором метастазирования опухолей

Теоретическая и практическая значимость работы

Исследованы возможности применения ингибиторов КАЧ *in vitro* для подавления роста культуры раковых клеток – как таковых, а также в комбинации с другим

антипролиферативным агентом. Выявлены ингибиторы КАЧ, сами по себе обладающие антипролиферативным действием, а также ингибиторы, усиливающие действие противоракового агента с иным механизмом действия. Показана перспективность терапевтического использования ингибиторов КАЧ IX/XII в качестве компонентов комбинированной терапии: наличие двух разных фармакофоров в одной молекуле ингибитора либо комбинация ингибиторов КАЧ IX/XII с известными противоопухолевыми препаратами или цитостатическими агентами с иным механизмом действия. Установлено, что ингибиторы КАЧ могут являться эффективными адъювантами агентами для иных противораковых агентов в составе комбинированной терапии.

По тексту диссертационной работы имеется ряд вопросов.

- В литературе описана серия гибридных молекул на основе гефитиниба и других ингибиторов КАЧ IX/XII, обладающих благоприятным противораковым эффектом [ссылка 86]. Что можно сказать о сопоставлении этих данных с результатами, полученными в данной диссертационной работе?

- Отмечается, что в первой стадии активации γ -лактамов с этилоксалатом выходы образующихся соединений от умеренных до хороших. Где лежит соответствующая «граница»? Среди синтезированных малонатсодержащих продуктов выход 2-16л и 2-16з составляют всего лишь 12 и 19%. Чем это объяснить? Как очищались эти соединения? Не приводило ли наличие 1,4-диоксана в качестве растворителя к образованию побочных продуктов?

- В диссертации отмечается, что в гомологическом ряду соединений 2.16а-в ингибирующая активность против КАЧ I увеличивалась с ростом их липофильности с K_i 166,5 нМ, 134,9 нМ и 105,3 нМ соответственно. Однако в случае 2.16д ингибирующая активность против КАЧ I существенно выше. При этом нельзя утверждать, что липофильность этого соединения превосходит 2.16 б-г.

- При воспроизведении методики изучения цитотоксичности соединений (МТТ-тест) необходимо учитывать основные критические параметры: особенности культивирования используемой клеточной линии, время адаптации до внесения субстанций, время инкубации и др. В тексте диссертации подобная информация отсутствует.

- Чем объяснить, что для *n*-замещенных соединений характерны меньшие константы ингибирования в сравнении с *m*-замещенными аналогами?

- В Экспериментальной части крайне скудно представлены результаты хроматографического (ВЭЖХ и ТСХ) анализа синтезированных соединений.

- Встречаются не совсем удачные выражения, например, (стр. 40). *...Сульфаниламидные ингибиторы КАЧ IX и XII были объединены в одну молекулу с некоторыми классами противоопухолевых препаратов...; илиИспользование ингибиторов КАЧ IX/XII, ... состоит в их использовании...*

Возникшие вопросы не сказались на самом благоприятном впечатлении от этой работы и ее безусловно высокой оценке. Работа прошла широкую апробацию. По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 6 научных

статей в международных рецензируемых научных изданиях, индексируемых базами данных (Web of Science, Scopus) и 3 тезисов докладов на конференциях.

Диссертационная работа Шароновой Татьяны Валерьевны является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение важной медико-аналитической задачи, посвященной перспективам использования ингибиторов карбоангидразы человека в противораковой терапии.

Диссертация Шароновой Татьяны Валерьевны на тему: «О перспективах использования ингибиторов карбоангидразы человека в противораковой терапии» соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Шаронова Татьяна Валерьевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.16. Медицинская химия.

Нарушения пунктов 9 и 11 указанного Порядка в диссертации не обнаружены.

Член диссертационного совета

Доктор химических наук, профессор, профессор

Карцова Людмила Алексеевна

22.08.2022 г.

