

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Вахрушева Александра Викторовича «Синтез производных RGD-пептида и их конъюгатов – потенциальных средств диагностики и терапии опухолей», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3. Органическая химия

Диссертационная работа Вахрушева Александра Викторовича посвящена разработке методов синтеза производных RGD-пептида и их конъюгатов с флуоресцентными красителями, карборанами или МНЧ для лечения и диагностики опухолей. Несмотря на то, что в литературе представлены разнообразные подходы к синтезу производных RGD-пептида и их конъюгатов, как потенциальных средств терапии и диагностики онкозаболеваний, в настоящее время имеются серьезные проблемы использования подобных соединений на практике, связанные с их химической нестабильностью или нестабильностью в биологических средах, ограниченной водорастворимостью, несовместимостью с исследуемыми химическими или биологическими системами. Поэтому получение новых производных RGD-пептида и разработка эффективных методов их конъюгации с функциональными молекулами или магнитными наночастицами (МНЧ) является **актуальной задачей**.

Цель и задачи диссертационной работы. Целью диссертационной работы Вахрушева А.В. являлась разработка методов синтеза производных RGD-пептида и их конъюгатов с флуоресцентными красителями, карборанами или МНЧ для создания потенциальных средств диагностики и терапии опухолей. Исходя из поставленной цели автором сформулированы следующие задачи: разработка методов синтеза избирательно защищенных производных пептидов RGD-семейства; разработка методов синтеза конъюгатов RGD-пептида с флуоресцентными красителями и карборанами; разработка подходов к синтезу наноматериалов на основе МНЧ, в том числе модифицированных RGD-пептидом, а также иммобилизация на МНЧ противоопухолевого препарата доксорубицина; изучение противоопухолевой активности полученных соединений и материалов.

Научная новизна работы заключается в том, что автором разработан подход к синтезу новых избирательно защищенных производных трипептида RGD и тетрапептидов GRGD и KRGD, в том числе, содержащих в качестве линкера фрагмент глутаровой кислоты или PEG; синтезированы новые конъюгаты RGD-пептида с флуоресцентными красителями и карборанами; разработаны методы синтеза МНЧ на основе Fe_3O_4 ; оптимизированы методики нанесения покрытия на основе диоксида кремния на МНЧ и разработаны подходы к иммобилизации доксорубицина на полученные МНЧ; оценена цитотоксичность

синтезированных материалов на культурах нормальных и опухолевых клеток; проведена оценка эффективности синтезированных материалов на основе МНЧ в качестве платформы доставки доксорубина на модели комбинированной терапии с магнитной гипертермией в опытах *in vivo*; продемонстрирована специфичность связывания МНЧ, содержащих RGD-пептид с клетками опухолевой линии MDA-MB231_27 с повышенной экспрессией интегрина $\alpha_v\beta_3$.

Теоретическая и практическая значимость работы состоит в том, что автором предложен оригинальный метод синтеза избирательно защищенных производных RGD-пептида, в которых гуанидиновая группа аргинина и β -карбоксовая группа аспарагина, участвующие в связывании и с молекулярными мишенями, защищены, а свободная α -аминогруппа аргинина, глицина и лизина или ϵ -аминогруппа лизина используется для связывания с функциональными молекулами или МНЧ, причем после синтеза конъюгатов защитные группы могут быть удалены методами пептидной химии; разработан метод нанесения на МНЧ покрытия на основе SiO_2 , в том числе с использованием PMDA и алкоксисиланов, изучены процессы сорбции доксорубина на МНЧ с SiO_2 -оболочкой и особенности его десорбции; для материалов на основе МНЧ Fe_3O_4 с PEG-покрытием и загруженных доксорубином продемонстрированы терапевтический эффект, возможность торможения процессов метастазирования и повышение выживаемости животных; разработаны методы синтеза новых конъюгатов с RGD-пептидом и новых наноматериалов, представляющих интерес в качестве потенциальных средств терапии и диагностики опухолей.

Структура и объем работы. Диссертационная работа Вахрушева А.В. построена классически и включает введение, литературный обзор, посвященный методам синтеза RGD-пептидов и их конденсации с функциональными соединениями или наночастицами (глава 1), обсуждение результатов собственных исследований автора (глава 2), экспериментальную часть (глава 3), заключение, список сокращений и список литературы, включающий 234 наименования. Диссертация изложена на 141 странице печатного текста, содержит 33 схемы, 49 рисунков и 13 таблиц.

Во введении автор обосновывает актуальность, степень разработанности темы исследования, цель и задачи работы, приводит данные о научной новизне, теоретической и практической значимости, а также о методологии и методах исследования и положениях, выносимых на защиту.

Литературный обзор (глава 1) включает в себя рассмотрение известных подходов к синтезу производных RGD-пептидов и их конъюгатов с флуоресцентными метками, соединениями бора и наночастицами.

Обсуждение результатов (глава 2) содержит пять разделов, в которых представлены собственные исследования автора. В разделе 2.1 обсуждается синтез линкерсодержащих производных RGD-пептида. Целевые избирательно защищенные три- и тетрапептиды со свободной аминогруппой, способной к конденсации с карбоксильными группами другой молекулы, а также новые производные, содержащие глутаровую кислоту в качестве линкера, были получены с использованием классической методологии пептидного синтеза с C-конца исходя из алкиловых эфиров аспарагина. Защитные группы боковых цепей аминокислот могут быть удалены на последней стадии, что позволяет проводить региоселективную конъюгацию этих пептидов с другими функциональными молекулами или наноматериалами без потери специфичности их связывания с опухолевыми клетками.

В разделе 2.2 этой части работы описывается синтез производных RGD-пептида, содержащих флуоресцентные красители, молекулы которых содержат свободные карбоксильные или активирующие группы. Следует отметить, что полученные соединения растворимы в воде и обладают флуоресцентными свойствами, сходными со свойствами исходных красителей, что позволяет рассматривать их как потенциальные агенты для мечения опухолевых клеток.

В разделе 2.3 обсуждаются подходы к синтезу производных RGD-пептида, содержащих карбораны. Автором предложен метод синтеза новых производных RGD- и KRGD-пептидов с одним и двумя ядрами *клозо*-карборана. Деборированием *клозо*-карборанового фрагмента в одном из этих производных под действием CsF синтезирован гидрофильный KRGD-тетрапептид, содержащий два ядра *нидо*-карборана в лизиновом фрагменте, представляющий интерес для бор-нейтронозахватной терапии опухолей.

Раздел 2.4 диссертации посвящен получению материалов на основе МНЧ, в том числе модифицированных RGD-пептидом. С целью конъюгации производного RGD-пептида с МНЧ, содержащими на поверхности фрагменты 3-аминопропилсилана (APS), сначала методом осаждения из раствора солей Fe^{2+} и Fe^{3+} были синтезированы наночастицы Fe_3O_4 , поверхность которых далее была химически модифицирована 3-аминопропилтриметилсиланом (APTMS) для ковалентного связывания МНЧ с RGD-пептидом. Полученные таким образом МНЧ конденсировали с защищенным GRGD-тетрапептидом через линкер в виде глутаровой кислоты, а затем удаляли Pdf-защиту гуанидиновой группы.

С целью нанесения SiO₂/APS-покрытия как нестабилизированные, так и стабилизированные фосфонометилиминодиуксусной кислотой (PMIDA) МНЧ обрабатывались сначала тетраметоксисиланом, взятым в 1.5, 3.0 или 5.0-кратном мольном избытке, а затем АРТМС. Было установлено, что использование PMIDA для стабилизации исходных наночастиц позволяет получать более устойчивые коллоидные растворы модифицированных наночастиц, а стабилизированные PMIDA модифицированные МНЧ обладают лучшими гидродинамическими характеристиками.

С целью нанесения SiO₂/PEG-покрытия МНЧ 75 с SiO₂/APS-покрытием, имеющие на поверхности свободные аминогруппы, модифицировали молекулами PEG, имеющими активированную карбоксильную группу, или сначала конденсировали [(3-триэтоксисилил)пропил]янтарный ангидрид с PEG, содержащим первичную аминогруппу, а полученный продукт без выделения использовали в реакции силанизации с МНЧ 69 с SiO₂ покрытием.

Для оценки возможности использования МНЧ с SiO₂, SiO₂/APS- и SiO₂/PEG-покрытием в качестве платформы для иммобилизации биологически активных молекул была изучена сорбция доксорубина на таких МНЧ. На основе МНЧ с SiO₂/PEG-покрытием осуществлены синтезы наноконъюгатов, содержащих фрагменты RGD-пептида и флуоресцентного красителя.

В разделе 2.5 представлены результаты исследования биологической активности синтезированных материалов.

Экспериментальная часть работы (глава 3) содержит сведения об оборудовании, использованном для установления/подтверждения заявленных структур новых соединений, а также подробные методики синтеза целевых продуктов.

В **Заключении** сформулированы основные результаты работы и перспективы дальнейшей разработки темы исследования.

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Синтезированные соединения охарактеризованы с применением современных методов физико-химического анализа: ¹H, ¹³C и ¹¹B ЯМР спектроскопия, масс-спектрометрия высокого разрешения, ВЭЖХ, ИК-спектроскопия, УФ-спектрофотометрия, флуориметрия, поляриметрия, элементный анализ, рентгено-флуоресцентный анализ, метод динамического и электрофоретического рассеяния света, просвечивающая электронная микроскопия, сканирующая электронная микроскопия, вибрационная магнитометрия, рН-метрия. Биологическое тестирование проведено по стандартным методикам.

Работа грамотно написана и аккуратно оформлена. Автореферат диссертации полностью отражает ее содержание.

По диссертационной работе имеются следующие замечания:

1. На стр. 8 в предложении «Впервые RGD-пептид был упомянут в 1984 [3], а первый обзор... в 1996 [4]» дважды пропущено слово «году».
2. На стр. 12 автор ошибочно называет флуореновые красители «флуоренильными».
3. В таблице 1.1 на стр. 20, 21 используются термины как на русском, так и на английском языке.
4. На стр. 37 используется неверная формулировка «удаление метиловых эфиров Asp» для снятия защиты с карбоксильных групп.
5. На стр. 48 в предложении «В результате продемонстрирована десорбция Dox с синтезированных материалов (рисунок 2.12б), которая протонированием», вероятно, пропущен глагол «обусловлена».
6. На стр. 49 предложение «Оценена возможность PEG-модификации SiO₂-покрытия, содержащее...» не согласовано.

Отмеченные замечания не носят принципиального характера и не влияют на основные теоретические и практические результаты диссертации.

В процессе прочтения работы к диссертанту возникли следующие вопросы:

1. Весьма вероятно, что побочные 2,5-дикетопиперазины **9–11** имеют лактим-лактамную таутомерию. Изучался ли их таутомерный состав?
2. В полученных диссертантом соединениях присутствует множество хиральных центров. Как подтверждался стереоизомерный состав синтезированных продуктов?
3. Чем обусловлен выбор фторида цезия в качестве реагента деборирования производного RGD-пептида **61**?
4. В своей работе диссертант использует активированные исходные соединения или конденсирующие агенты для образования амидной связи, однако для конденсации производных аминокарборана **45–48** с пептидами **20–22** использован метод смешанных ангидридов. С чем связан такой выбор?
5. При химической модификации МНЧ Fe₃O₄ APTMS для ковалентного связывания с RGD-пептидом на стр. 37 и 40 диссертации автором постулируется образование двух ковалентных связей O–Si и связей Si–O–Si в результате взаимодействия двух гидроксильных групп МНЧ с двумя молекулами APTMS, в то время как на стр. 49 для подобной МНЧ приводится структура с тремя ковалентными связями O–Si, образующихся в результате взаимодействия трех гидроксильных групп МНЧ с одной молекулой APTMS. Насколько оправдано использование разных структурных формул для одной и той же МНЧ?
6. Чем обусловлен выбор массовых соотношений TMSO:МНЧ (**64, 68**) = 1:1.5, 1:3, 1:5 и функционализованного PEG (**93**):МНЧ (**75**) = 1:2, 1:10 и 1:50 при получении наноконъюгатов **64–79** и **94a–в**?

По теме диссертации опубликовано 10 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых международными базами данных WoS и Scopus, и 12 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

Согласно паспорту специальности 1.4.3. Органическая химия диссертация соответствует пунктам:

1. Выделение и очистка новых соединений.
3. Развитие рациональных путей синтеза сложных молекул.
7. Выявление закономерностей типа "структура-свойство".
9. Поиск новых молекулярных систем с высокоспецифическими взаимодействиями между молекулами.

В целом, диссертационная работа Вахрушева Александра Викторовича «Синтез производных RGD-пептида и их конъюгатов – потенциальных средств диагностики и терапии опухолей» по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности, научной новизне и практической значимости полностью соответствует п. 9 Положения о присуждении ученых степеней в УрФУ и содержит решение актуальной научной задачи – разработки методов синтеза новых потенциальных средств терапии и диагностики онкологических заболеваний, а ее автор, Вахрушев Александр Викторович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3. Органическая химия.

Официальный оппонент:

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник
отдела химического материаловедения

Научно-исследовательского института физики и прикладной математики

Института естественных наук и математики

ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет

имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

e-mail: korotaev.vladislav@urfu.ru

Тел. 8 (343) 389-95-97

620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19

Подпись Коротаева В.Ю. заверяю,

ученый секретарь УрФУ


 Коротаев Владислав Юрьевич

«22» января 2025 г.


 Морозова В. А.