



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2

Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32

www.fbras.ru, info@fbras.ru

15 апреля 2024 г. № 85-01-19/266
На № - 36 - от 22.01.24

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФИЦ Биотехнологии РАН,
доктор биологических наук

/А.Н. Федоров/

2024 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Латышевой Александры Степановны «ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ОКСАЗОЛИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АНДРОСТ-16-ЕНА И 21-НОРПРЕГН-17(20)-ЕНА», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – биохимия

Актуальность темы исследования

Рак предстательной железы (РПЖ) – наиболее часто диагностируемое и второе по распространенности онкологическое заболевание мужчин. Простатэктомия, радиотерапия и медикаментозное снижение уровня андрогенов часто приводит к выздоровлению, однако у 60% пациентов наблюдаются рецидивы заболевания. Эта стадия заболевания определяется как CRPC (castration resistant prostate cancer). CRPC характеризуется высоким уровнем биосинтеза андрогенов, повышенной активностью андрогенового рецептора, мутациями в генах андрогенового рецептора и соответствующих белков-корегуляторов, а также множеством андроген-независимых изменений: нарушениями в основных сигнальных путях клетки, мутациями в генах белков-супрессоров опухолей, изменениями в экспрессии ростовых факторов, цитокинов, шаперонов. Поиск новых соединений, способных снижать уровень андрогенов, подавлять активность андрогенового рецептора, андроген-зависимых сигнальных путей и препятствовать развитию опухоли, является важнейшим этапом создания новых препаратов для лечения поздних стадий РПЖ.

Результаты многочисленных экспериментальных и клинических исследований показали, что некоторые производные стероидов, модифицированные введением азотсодержащих гетероциклов, эффективно ингибируют активность ключевого фермента биосинтеза андрогенов

17 α -гидроксилазы-17/20-лиазы (CYP17A1) и андрогенового рецептора, а также стимулируют его протеосомальную деградацию и подавляют развитие опухоли. Очевидно, что поиск, дизайн и синтез новых соединений в ряду азотсодержащих стероидных производных, исследование молекулярных механизмов их взаимодействия с основными биомишениями и оценка их фармакологического потенциала является важной научной проблемой, имеющей и фундаментальное и прикладное значение. В связи с этим тема диссертационной работы А.С. Латышевой, безусловно, является актуальной.

Научная новизна исследования и полученных результатов

В диссертационной работе А.С. Латышевой получены следующие новые результаты:

Исследована антипролиферативная активность большой серии новых азотсодержащих производных прогнана и андростана в клетках карциномы простаты LNCaP и PC-3, установлена корреляция структура - антипролиферативная активность. На основе полученных данных были выбраны два соединения-кандидата с высоким фармакологическим потенциалом – производные андрост-16-ена и 21-норпрегн-17(20)-ена, содержащие оксазолиновый фрагмент (**190** и **217**).

Установлено, соединения-кандидаты – оксазолины **190** и **217** – эффективно ингибируют активность фермента CYP17A1; анализ молекулярных моделей фермент-ингибиторных комплексов CYP17A1-**190** и CYP17A1-**217** показал существование значительных различий в структуре этих комплексов.

Кроме того, были определены и другие пути воздействия на опухолевую клетку, выбранных соединений **190** и **217**, а именно: индукция апоптоза и индукция деградации ДНК в клетках карциномы простаты PC-3 и DU-145, причем антипролиферативная и проапоптотическая активность оксазолинов **190** и **217** значительно превосходит таковую для абираптерона (известного препарата для лечения РПЖ).

Показано, что оксазолин **190**, обладающий высокой биодоступностью и приемлемыми фармакокинетическими характеристиками, снижает уровень тестостерона и подавляет рост ксенографтов при пероральном введении мышам.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов.

Научные положения и выводы диссертационной работы А.С. Латышевой являются полностью обоснованными, а полученные результаты не вызывают сомнения. В работе использован широкий круг современных биохимических, синтетических, аналитических и инструментальных методов исследования стероидов; методик проведения экспериментов в культуре клеток и опытов с использованием лабораторных животных; компьютерных методов

молекулярного моделирования; методов статистической обработки полученных результатов. Эксперименты проведены на высоком методическом уровне, а полученные результаты достоверны. Все результаты диссертационной работы А.С. Латышевой опубликованы в 14 научных статьях (10 в журналах, индексируемых международными базами данных Web of Science, Scopus и РИНЦ, и рекомендованными ВАК), и доложены на 10 международных и российских научных конференциях.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные в диссертационной работе А.С. Латышевой результаты свидетельствуют, что новые стероидные оксазолины **190** и **217** проявляют значительную противоопухолевую активность, вследствие чего могут рассматриваться в качестве перспективных кандидатов для разработки новых противораковых препаратов. Основные результаты работы могут найти применение и дальнейшее развитие в научных учреждениях специализирующихся в областях биохимии, онкологии, медицинской и биомедицинской химии: ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Минздрава России, ФГАОУ ВО "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Минздрава России, ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России, ФГБУН Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук, ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук; ФГБОУ ВО "Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева", а также в профильных центрах специализирующихся на разработке новых противораковых препаратов.

Структура и содержание работы

Диссертация А.С. Латышевой написана по традиционному плану и включает разделы: "Введение", "Обзор литературы", "Материалы и методы", "Результаты и их обсуждение", "Заключение", "Выводы", а также списки использованных сокращений и цитированной литературы (157 источников). Работа изложена на 119 страницах, иллюстрирована 53 рисунками и содержит 3 таблицы.

В разделе "Введение" обсуждается актуальность темы диссертационного исследования, формулируются цель и задачи работы, оцениваются научная новизна и практическая значимость полученных результатов, приводятся данные о положениях, выносимых на защиту, о личном вкладе автора и публикациях по теме диссертации.

Раздел "Обзор литературы" посвящен современному состоянию исследований азотсодержащих стероидных производных – потенциальных препаратов для лечения РПЖ, среди которых наиболее изученными являются абиаратерон и галетерон. В обзоре цитируются работы, в которых изучались эффекты абиаратерона, галетерона, их метаболитов, производных и

структурных аналогов на стероидогенез, функционирование андрогенового рецептора, андроген-зависимые и андроген-независимые сигнальные пути раковой клетки, а также приводятся структуры новых азотсодержащих стероидных производных, обладающих способностью эффективно подавлять пролиферацию клеток карциномы простаты. Обзор свидетельствует о хорошем знании автором научной литературы по изучаемой проблеме; об интересе автора к поиску новых биомишеней, с которыми способны взаимодействовать абиаратерон, галетерон и их аналоги, а также к изучению соответствующих молекулярных механизмов. Обзор производит впечатление оригинального научного сообщения, которое вводит читателя в круг проблем, которым посвящена основная часть диссертации.

В разделе “Материалы и методы” охарактеризованы использованные реагенты и материалы; описан синтез соединений **190**, **217**, **223 – 227**; перечислены примененные в работе инструментальные, расчетные и аналитические методы; приведены характеристики использованных клеточных культур и лабораторных животных; описаны условия проведения экспериментов на клетках и *in vivo*; приведены методы статистической обработки полученных данных. Использованные методические подходы адекватны поставленным в работе задачам.

Раздел “Результаты и обсуждение” состоит из четырех глав, каждая из которых представляет собой решение одной из поставленных в работе задач.

Первая глава посвящена первичному скринингу антитромиферативной активности новых азотсодержащих производных андростана и pregnана (различающихся структурой стероидного фрагмента и азотсодержащего гетероцикла) в клетках карциномы простаты LNCaP и PC-3; нахождению корреляции структура-антитромиферативная активность; выбору наиболее перспективных кандидатов для проведения дальнейших исследований. В результате были получены значения IC₅₀ для 38 новых соединений (а также для соединений сравнения – абиаратерона и галетерона); установлена корреляция структура - антитромиферативная активность; выбраны наиболее перспективные кандидаты – производные 21-норпрегн-17(20)-ена и андрост-16-ена, содержащие 2'-оксазолиновый фрагмент (**190** и **217**).

Вторая глава посвящена исследованию взаимодействия оксазолинов **190** и **217** с основной потенциальной биомишенью – CYP17A1. Установлено, что оксазолины **190** и **217** ингибируют активность CYP17A1 не менее эффективно, чем абиаратерон **1**, а 4'-метил- и 4'-фенил- замещенные аналоги оксазолина **217** (соединения **223 – 227**) являются слабыми ингибиторами CYP17A1 или неактивными соединениями. Модели фермент-ингибиторных комплексов для соединений **217**, **223 – 227** (построенные методом молекулярного докинга) хорошо согласуются с полученными экспериментальными данными. Для фермент-ингибиторного комплекса CYP17A1-**190** предложены две альтернативные модели. Первая модель (построенная методом молекулярного докинга) предусматривает изомеризацию

17(20)*E*-изомера **190** в гипотетический 17(20)*Z*-изомер **190a**, происходящую при связывании **190** в активном центре фермента; вторая модель (построенная методом равновесной молекулярной динамики) предусматривает образование фермент-ингибиторного комплекса CYP17A1-**190**, в стабилизации которого участвует молекула воды.

Третья глава посвящена сравнению эффектов оксазолинов **190**, **217** и абиатерона **1** на жизнеспособность и апоптоз гормон-независимых клеток карциномы простаты PC-3 и DU-145 в различных условиях. В условиях 72-х ч инкубации оксазолины **190** и **217** подавляли пролиферацию и стимулировали апоптоз в клетках PC-3 сильнее чем абиатерон **1**. В клетках DU-145 в условиях 24-х ч инкубации оксазолин **190** активировал каспазы 3/7 и сигнальные пути MAPK и PI3K/Akt, а также снижал концентрацию Bcl-2(+)-клеток и повышал концентрацию Bcl-2-p(+)-клеток. Результаты указывают, что основной причиной цитотоксичности оксазолинов **190** и **217** является их проапоптотический эффект.

Четвертая глава посвящена сравнению эффектов оксазолина **190** и абиатерона **1** в экспериментах *in vivo*. При пероральном введении мышам C57BL/6 биодоступность оксазолина **190** превышала биодоступность абиатерона более чем в 20 раз; при пероральном введении мышам C57BL/6 оксазолин **190** снижал уровень тестостерона не менее эффективно, чем абиатерон **1**; при пероральном введении оксазолин **1** (в концентрации 300 мг/кг) подавлял рост ксеногraftов (полученных подкожным введением мышам Balb/c nude клеток карциномы простаты человека DU-145 и 22Rv1), а абиатерон **1** оказался неэффективным.

В разделе “Заключение” обобщены и оценены результаты проведенного исследования; “Выводы” работы полностью обоснованы.

Замечания и вопросы по диссертационной работе:

1. В работе было получено два соединения: **190** и **217**, обладающих желаемой активностью. При этом, часть экспериментов, как например, исследования *in vivo* были проведены только на соединении **190**. Необходимо объяснить, с чем именно это связано.
2. Работа содержит некоторое количество опечаток и технических ошибок, которые, впрочем, не оказывают значительного влияния на качество представленного материала.
3. Формат изложения материала в таблицах и рисунках хорошо было бы немного изменить – например в таблице 1 следовало бы повторить названия столбцов на других страницах. Рисунки 42 и 43, 45 – увеличить изображения и сделать подписи на русском языке.

Следует отметить, что вышеуказанные незначительные недостатки не снижают моей высокой оценки работы А.С. Латышевой. Высказанные замечания носят

рекомендательный характер. Работа выполнена на высоком методическом уровне, содержит новые интересные научные данные и написана хорошим научным языком. Полученные автором новые результаты могут быть полезны при дальнейшей разработке новых противоопухолевых препаратов и внедрении их в клиническую практику.

Заключение. Диссертационная работа А.С. Латышевой на тему «Исследование противоопухолевой активности оксазолиновых производных андрост-16-ена и 21-норпрегн-17(20)-ена» полностью соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 (в редакции постановлений Правительства РФ с последующими изменениями), и представляет собой завершенную научно-квалификационную работу. Выносимые на защиту результаты опубликованы в виде четырнадцати статей в реферируемых международных журналах, индексируемых в библиографической базе данных Web of Science, докладывались на российских и международных научных конференциях. Автореферат соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту. Диссертационная работа Латышевой А.С. была рассмотрена на межлабораторном семинаре в ФИЦ Биотехнологии РАН, в котором принимали участие сотрудники лаборатории структурной биохимии белка, лаборатории молекулярной инженерии, лаборатории молекулярного имиджинга, лаборатории физической биохимии, лаборатории биотехнологии ферментов (Протокол № 1 от 10.04.2024 г.). Содержание диссертации полностью соответствует паспорту специальности 1.5.4. – «Биохимия» (по биологическим наукам), а ее автор Латышева Александра Степановна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – «Биохимия».

Заведующая лаборатории Молекулярной инженерии

Института биохимии им. А.Н. Баха

ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы

биотехнологии» РАН

доктор химических наук

Пометун Анастасия Александровна

15.04.2024

/Пометун А.А/

Почтовый адрес: Ленинский пр-т., 33 стр.2, Москва, 119071

E-mail: aapometun@gmail.com, тел.: +7(985) 815-39-56

Подпись Пометун А.А заверена

Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН

к.б.н., Орловский А.Ф.

