

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу ЗАХАРЯНЦ Арпеник Акоповны "Доклиническая оценка биотрансформации новых антигипоксических соединений в системе *in vitro* с имитацией микроциркуляции», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Один из современных трендов в разработке лекарственных средств состоит в дизайне химических молекул, способных запускать или блокировать генетические программы отклика на различные стрессы. Наибольший фундаментальный и практический интерес вызывают несколько таких программ, а именно анти-оксидантная, регулируемая транскрипционным фактором Nrf2, и антигипоксическая, регулируемая транскрипционным фактором HIF (hypoxia inducible factor) и запускающая экспрессию более ста генов, повышающих жизнеспособность клетки в условиях гипоксии. Само название HIF говорит о способе его регуляции – активации под действием гипоксии. За открытие этого фактора в 1994 году и последующую расшифровку механизма его регуляции двое американских ученых – профессора Г. Семенца и У.Каэлин младший (Гарвардский университет)– и британский ученый – профессор П.Ратклифф (Оксфорд) – 13 сентября 2016 года были удостоены премии Ласкера по медицине. Ключевым ферментом, обеспечивающим регуляцию стабильности HIF является HIF пролилгидроксилаза – она гидроксилирует остаток пролина 564 в альфа-субъединице данного транскрипционного фактора и тем самым обеспечивает распознавание убиквитинлиазой, которое приводит к протеасомной деградации. Ингибирование этого фермента под действием низкомолекулярных ингибиторов позволяет стабилизировать транскрипционный фактор и запустить программу выживания. Интерес к разработке ингибиторов огромен, поскольку они позволят лечить ишемические болезни, анемию, и также, по-видимому, хронические нейродегенеративные заболевания. Практически все ведущие фармацевтические компании разработали свои ингибиторы этого фермента, и в настоящее время два препарата заканчивают клинические испытания в США для лечения анемии. В таких конкурентных условиях разработка отечественных ингибиторов, на самой ранней стадии их идентификации, должна проводиться в соответствии с самыми современными стандартами характеристики потенциальных фармакофоров. Во-первых, это валидация биологической активности препаратов по отношению к желаемой мишени,

и во-вторых, подтверждение отсутствия их токсичности в широком диапазоне концентраций, используемых для достижения биологического эффекта.

В лаборатории диссертанта методом скрининга на клеточных репортерных линиях были идентифицированы новые активаторы HIF, предположительно работающие по механизму ингибирования фермента HIF пролилгидроксилазы, однако на самом ферменте эффект ингибирования изучен не был. Поэтому на первом этапе в задачу диссертанта входила проверка ингибирующего эффекта найденных соединений непосредственно на препарате очищенного фермента, а также предварительная характеристика их токсичности и путей биотрансформации. В литературе изоформу 2 HIF пролилгидроксилазы человека получают в растворимой форме в *E.coli* и с помощью бакуловируса, при этом каталитическая активность препаратов в последнем случае намного превосходит растворимую форму фермента, экспрессируемую в клетках *E.coli*. Диссертант провел клонирование всех трех изоформ фермента в *E.coli* и продемонстрировал высокий уровень экспрессии в случае изоформ 2 и 3. В обоих случаях подавляющее количество фермента синтезировалось в неактивной форме в виде телец включения, что часто бывает с рекомбинантными эукариотическими белками.

Проблема выделения белка, сохраняющего свойства нативного, из телец включения, особенно в случае наличия у белка ферментативной активности - является весьма сложной задачей и не имеет однозначного решения: для каждого белка условия растворения и рефолдинга приходится разрабатывать "персонально". С другой стороны, если такие условия отработаны, то нахождение белка в тельцах включения имеет существенное преимущество в плане выделения продукта: белок в тельцах изначально "очищен" от преобладающего количества растворимых белков, поэтому его окончательная очистка, как правило, состоит не более чем из 1-2 стадий и оказывается весьма эффективной.

Значительная часть работы А.А. Захарянц посвящена поиску оптимальных условий рефолдинга. С этой целью автор разработала новую непрерывную методику измерения побочной ферментативной активности HIF пролилгидроксилазы по окислению ферроцианида в присутствии HIF пептида. Простая методика регистрации активности позволила впервые провести реактивацию данного исключительно нестабильного фермента из телец включения. Автор исследовала влияние множества различных параметров и двух методов разрушения биомассы на выход реактивации и чистоту фермента. Интересным фактом явилось различие величин удельной активности ферментов, полученных из растворимой фракции и методом реактивации из телец

включения, а именно, в последнем случае удельная активность была в 4,6 раза выше и находилась на уровне активности рекомбинантного фермента, получаемого в системе бакуловируса.

Обеспечив таким образом доступность фермента, автор продемонстрировала ингибирование активности фермента в физиологической реакции гидроксирования NIF пептида в присутствии второго субстрата – альфа-кетоглутарата, - под действием соединений, отобранных при клеточном скрининге как активаторов NIF. Таким образом, в данной части работы автор провела валидацию мишени для новых NIF активаторов и доказала ингибиторный характер их влияния на активность очищенной NIF пролилгидроксилазы.

В следующей части работы автор провела исследование токсичности и путей биотрансформации новых ингибиторов фермента в биочипе на основе сфероидов «гепатоцитов» НераRG, разработанном ООО НТЦ Биоклиникум. Для этой цели была проведена большая предварительная работа по созданию, оптимизации и валидации панели субстрат-ингибитор четырех наиболее важных изоформ цитохрома P450 (CYP). На основе детального анализа литературных данных по специфичности субстратов и константам ингибирования данных четырех изоформ CYP приведены хорошо аргументированные основания для выбора конкретных субстратов и ингибиторов для отобранных CYP, проведена большая работа по оптимизации хромато-масс-спектроскопической детекции субстратов и их метаболитов, которая позволила определять все интересующие соединения в смеси. Это довольно кропотливая часть работы хорошо представлена в диссертации, и, безусловно, демонстрирует, сколько сил и времени диссертанта было вложено в проведение этой части работы. Вместе с тем, масс-спектры субстратов и метаболитов при разных энергиях ионизации в принципе повторяют информацию, суммированную в таблицах по оптимизации детекции, и могли бы быть поданы в качестве приложения к диссертации, поскольку их обсуждение минимально и занимает всего полстраницы текста.

Разработанная панель субстрат-ингибитор была успешно опробована и показала соответствие литературным данным. Для валидации панели были использованы два хорошо охарактеризованных лекарственных препарата – варфарин и дазатиниб, – которые также показали соответствие литературным данным по участию отдельных изоформ цитохрома P450 в их трансформации. В заключительной части работы, диссертант собственно провела изучение токсичности и предварительную характеристику путей биотрансформации двух ингибиторов NIF пролилгидроксилазы человека, относящихся к 8-

гидроксихинолинам с разветвленным замещением в положении 7. Для изучения токсичности был выбран диапазон концентраций до 200 мкМ, который на два порядка превосходит диапазон биологически активных концентраций по результатам клеточного скрининга. Оба исследуемых ингибитора практически не являются токсичными в данном диапазоне, и, следовательно, заслуживают дальнейшей разработки для использования в доклинических испытаниях на животных. Изучение путей их биотрансформации принесло сюрприз – а именно, под действием данных соединений наблюдалась активация изоформы CYP2B6, которая метаболизирует данные соединения наряду с CYP3A4. Эффект активации требует отдельного рассмотрения и может являться предметом следующей диссертационной работы, тем не менее, было бы неплохо предложить свои версии механизма активации (индукции?) цитохрома CYP2B6.

Таким образом, в настоящей диссертационной работе впервые получена изоформа 2 NIF пролилгидроксилазы человека методом реактивации из телец включения *E.coli*, и с ее помощью доказан механизм действия двух исследуемых активаторов NIF – это прямые ингибиторы фермента. На основании использования самого современного подхода для оценки токсичности и путей биотрансформации – в биочипе на основе сфероидов «гепатоцитов» НераRG – проведена оценка токсичности и участия изоформ цитохрома P450 в биотрансформации указанных соединений. Автором было показано, что идентифицированные активаторы NIF заслуживают дальнейшей разработки в качестве лекарственных препаратов.

К содержанию работы практически нет претензий - все эксперименты (еще раз хочется отметить очень большой объем) выполнены корректно, результаты и выводы не вызывают сомнений. Однако к оформлению работы есть вопросы – имеется достаточное количество опечаток (на стр. 25 на 10-й строке снизу имеется опечатка «достигчь» и на последней строке - вместо «первичных гепатоцитах» нужно «...гепатоцитов»; на стр 25, 26, 30 идет отсылка к Таблице 2, которая на самом деле Таблица 2.2.1 (на стр 29); на стр.47 на 10-й строке снизу опечатка «нейтрализули» вместо «нейтрализовали», на последней строке - «соответствуюло» вместо «соответствовало»; на стр. 53 нигде не дана расшифровка сокращения МТТ (11-я строка сверху); на стр. 59 на 4-й строке снизу – опечатка «в литературы» вместо «в литературе»), включая оглавление, и часть иллюстративного материала (масс-спектры субстратов и метаболитов) могла бы быть вынесена в приложение. К техническому замечанию следует также отнести тот факт, что во введениях в автореферате и в диссертации приводятся разные цифры, характеризующие сроки и затраты на разработку нового лекарственного препарата – в

автореферате «10 лет исследований и сотни миллионов долларов США», в диссертации – «12-15 лет и миллиард долларов США».

Отмеченные погрешности не изменяют общего прекрасного впечатления от рассматриваемой работы, указанные недостатки носят не принципиальный характер, и диссертация Захарянц А.А., безусловно, заслуживает высокой оценки.

Содержание диссертационной работы в полной мере соответствует специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии). Содержание автореферата соответствует основным идеям и выводам диссертационной работы, полно и адекватно отражает результаты выполненного исследования.

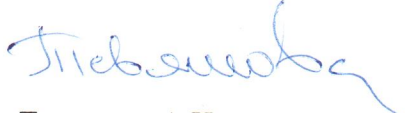
Литературный обзор хорошо написан, содержит много интересной информации, соответствует тематике диссертации, выполненной на стыке различных направлений биотехнологии. По результатам работы опубликовано 3 статьи в журналах из Перечня ведущих научных изданий ВАК РФ, и представлено 4 доклада на конференциях, которые соответствуют содержанию диссертации.

Захарянц А.А. выполнена научно-квалификационная работа, в которой содержится решение задач, имеющей существенное значение для развития биотехнологий: проведена доклиническая оценка биотрансформации новых антигипоксических соединений в системе *in vitro* с имитацией микроциркуляции.

Подводя итоги, следует заключить, что выводы работы соответствуют результатам, автореферат и публикации отражают основное содержание диссертации. Диссертационная работа ЗАХАРЯНЦ Арпеник Акоповны "Доклиническая оценка биотрансформации новых антигипоксических соединений в системе *in vitro* с имитацией микроциркуляции» является оригинальным исследованием высокого теоретического и практического уровня и по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности темы, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости полностью соответствует требованиям п.9-14 "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г. (в редакции Постановления Правительства РФ от 30.07.2014 г №723), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, а ее автор, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Ведущий научный сотрудник
лаборатории химической трансформации антибиотиков,
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по

изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф Гаузе”
доктор химических наук


Тевяшова А.Н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
“Научно-исследовательский институт по
изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф Гаузе”,
119021, Москва, ул. Большая Пироговская, д. 11, стр. 1
Тел.: +7 (499) 246-06-36;
Адрес электронной почты chulis@mail.ru

Подпись в.н.с., д.х.н. Тевяшовой А.Н. заверяю

23 ноября 2016 г.

и.о. ученого секретаря ФГБНУ “НИИНА”

к.х.н.



 Кисиль О.В.