

В диссертационный совет ПДС 0300.025  
при Федеральном государственном автономном  
образовательном учреждении высшего образования  
«Российский университет дружбы народов  
имени Патриса Лумумбы»  
117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

### **ОТЗЫВ**

официального оппонента, д.б.н., зав. лабораторией пептидной инженерии  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени  
В.Н. Ореховича»

Колесановой Екатерины Федоровны  
на диссертационную работу Або Кура Луая

«Механизм действия и противоопухолевая активность фармакологических  
пар *Clostridium novyi* C115H метионин–гамма-лиазы и сульфоксидов S-алкил-  
замещенного L-цистеина»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальностям 1.5.4. Биохимия, 3.1.6. Онкология, лучевая терапия

### **Актуальность темы исследования**

Диссертация Або Кура Луая посвящена актуальной тематике - разработке  
и исследованию новых противоопухолевых средств направленного действия.  
Высокая токсичность используемых противоопухолевых препаратов при  
системном введении вынуждает искать пути направленной их доставки в  
опухоль, а также использования низкотоксичных пролекарств,  
превращающихся в токсичные лекарственные соединения непосредственно в  
опухолевой ткани. В рассматриваемой работе предпринята успешная попытка  
создания формируемого *in situ* цитотоксического агента с помощью  
комбинации фермент-субстрат, где субстрат является нетоксичным  
«пролекарством», превращающимся под действием специфического фермента  
в активный препарат в непосредственной близости к клеткам опухоли.  
Ферментом в работе Або Кура Луая была выбрана мутантная форма метионин-  
γ-лиазы бактериального происхождения, с заменой цистеина-115 на остаток

гистидина, потерявшая способность к  $\gamma$ -элиминированию L-метионина (C115H МГЛ), а в качестве субстратов исследованы различные сульфоксиды S-алкил-замещенного L-цистеина – аллиин, метиин, этиин и пропиин, превращающиеся в условиях организма в соответствующие цитотоксические диалк(ен)илтиосульфиды.

Направленная доставка ферментной составляющей фармакологической пары к поверхности эстроген-зависимых опухолей была обеспечена конъюгацией фермента с фитоэстрогеном дайдзеином, который за счет связывания с особыми эстрогеновыми рецепторами, экспрессируемыми в повышенном количестве на поверхности опухолевых клеток, способствует локализации ферментативной реакции непосредственно на поверхности этих клеток. Продемонстрирована эффективность полученной композиции *ex vivo* и *in vivo* на ряде опухолевых клеток и ксенографтов опухолей.

Таким образом, диссертация Або Кура Луая выполнена в рамках нового и активно развивающегося в последние годы направления исследований в онкологии и биохимии, связанного с разработкой так называемой «ферментной пролекарственной терапии», состоящей из неактивного пролекарства и фермента, активирующего это пролекарство в организме пациента. Кроме того, в работе сделан упор на разработку актуальной в настоящее время направленной доставки терапевтического средства к опухолевой ткани путём использования лиганда, сверхэкспрессируемого на мембранах опухолевых клеток рецептора.

### **Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Автором впервые исследована потенциальная противоопухолевая терапевтическая комбинация мутантной метионин- $\gamma$ -лиазы (C115H и сульфоксидов алк(ен)ил-L-цистеина, составляемая *in situ* в опухолевой ткани, где сульфоксиды алк(ен)ил-L-цистеина являются пролекарствами, превращающимися в цитотоксичные тиосульфиды под действием метионин- $\gamma$ -лиазы. Направленная локализация превращения пролекарства в

цитотоксичное лекарство была обеспечена впервые выполненной конъюгацией указанного выше фермента с фитоэстрогеном дайдзеином, лигандом сверхэкспрессируемых на опухолевых клетках рецепторов эстрогена. Автором впервые был получен данный конъюгат мутантной метионин-γ-лиазы из *Clostridium novyi* (C115H МГЛ-Dz) и показано, что конъюгация не влияет на кинетические параметры реакции, катализируемой этим ферментом.

Впервые исследована противоопухолевая активность фармакологической пары [C115H МГЛ-Dz + сульфоксиды S-алк(-ен)ил-L-цистеина] *ex vivo* на 12 видах опухолевых клеточных линий и *in vivo* на 6 типах ксенографтов опухолей человека и показан достоверный противоопухолевый эффект данной лекарственной комбинации для ряда опухолей, экспрессирующих соответствующие рецепторы эстрогена. Показано, что соединение пропиин в комбинации с ферментом обладает максимальной цитотоксичностью в ряду исследованных гомологов. Впервые обнаружено, что механизм противоопухолевого действия дипропилтиосульфидов, образующихся из пропиина *in situ* под действием C115H МГЛ, связан с индукцией каспазо-зависимого апоптоза. Также показан запуск альтернативного пути апоптоза в опухолевых клетках (рак предстательной железы 22Rv1) и остановка клеточного цикла в фазе G<sub>2</sub>/M (рак предстательной железы 22Rv1 и рак молочной железы SKBR3), что служит дополнительным подтверждением эффективного противоопухолевого действия фармакологических пар [C115H МГЛ + пропиин]. Полученные результаты и сделанные на их основе выводы, заключения и рекомендации оригинальны и имеют все признаки научной новизны.

### **Значимость/ценность для науки и практики полученных результатов**

В диссертационной работе Або Кура Л. был предложен прототип экспериментального комбинированного терапевтического противоопухолевого препарата направленного действия, основанный на



локальном превращении пролекарства в лекарство в составе комбинации, формируемой непосредственно в ткани опухоли, показана его эффективность *ex vivo* и *in vivo* и исследован механизм действия на опухолевые клетки. Следует отметить выявленную хорошую переносимость лечения данной фармакологической парой животными с ксенографтами опухолей. Результаты диссертационной работы создают экспериментальную основу для развития направления исследований, связанного с изучением возможностей и перспектив использования фармакологических пар фермент – субстрат (пролекарство, превращаемое *in situ* в цитотоксичное соединение) в терапии онкологических заболеваний. Таким образом, можно резюмировать, что в диссертации Або Кура Луая представлен инновационный подход к комбинированной терапии злокачественных новообразований и подтверждена его успешность для ряда опухолей.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Диссертантом сформулированы 4 основополагающих положения, выносимые на защиту и соответствующие 4 выводам из результатов выполненного исследования. Выводы полностью следуют из результатов работы и свидетельствуют о выполнении поставленных в ней целей и задач. Достоверность полученных результатов и, соответственно, обоснованность научных положений, заключений и выводов не вызывает сомнений. Проведенное предварительное подтверждение сохранности каталитической активности фермента после конъюгации со специфичным лигандом не позволяет сомневаться в активности данного конъюгата в составе экспериментальной лекарственной композиции. Противоопухолевая активность изучаемой фармакологической пары была исследована на различных линиях опухолевых клеток (включая линии рака предстательной железы линий PC3, 22Rv1 и DU145, рака молочной железы линий MCF7, SKBR3 и T47D, рака поджелудочной железы линий MIA-PaCa2 и Panc1, и рака толстой кишки линий SW620, COLO 205, HT29 и HCT116) с разным

содержанием мембранных рецепторов эстрогена 1 и ксенографтах опухолей человека на иммунодефицитных мышах. Сопоставление данных, полученных на разных культурах клеток, постановка нескольких параллельных экспериментов (в том числе и при использовании животных), грамотный выбор контролей и соответствующая статистическая обработка подтверждают достоверность и надежность результатов работы. Обоснования экспериментальных подходов и обсуждение полученных результатов лишены спекулятивности, выполнены четко и по делу.

### **Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати**

По теме диссертации опубликовано 7 научных печатных работ, среди которых 5 статей в журналах, индексируемых наукометрическими базами данных Web of Science, Scopus (Q1/Q2), а также рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ. Все результаты, представленные в диссертации, отражены в опубликованных работах.

### **Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации**

Диссертационная работа Або Кура Л. изложена 118 листах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», 3 глав с описанием результатов исследований, главы «Обсуждение результатов», выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 188 источников. Диссертация иллюстрирована 13 рисунками, 4 схемами и 5 таблицами.

Содержание автореферата полностью соответствует содержанию и основным положениям диссертации.

### **Замечания по работе**

1. В работе не приведены структурные формулы конкретных соединений, использованных в качестве пролекарств.

2. Некоторые методики экспериментов представлены недостаточно подробно. Так, не указан способ трансформации клеток *E. coli* для продуцирования мутантной метионин- $\gamma$ -лиазы, не указан источник Endotoxin extractor, не указано происхождение сукцинимидного эфира дайдзеина (а если это соединение было синтезировано, то было бы неплохо привести его характеристики, подтверждающие соответствие структуры), не указано, какие конкретно питательные среды использовались для культивирования каждой из линий клеток.

3. Непонятно, зачем было проведено выравнивание аминокислотных последовательностей ряда метионин- $\gamma$ -лиаз и почему его результаты приведены в главе «Материалы и методы».

4. Не описано, как рассчитывали содержание холо-фермента метионин- $\gamma$ -лиазы; не указано, изменялось или нет его содержание после конъюгации с дайдзеином.

5. Не приведены сведения в таблице 5 об экспрессии рецепторов эстрогена в клетках линии Colo205, из числа использованных в данной работе.

6. Было бы желательно обсудить воздействие как на клетки в культуре, так и на ксенографты опухолей метионин- $\gamma$ -лиазы без пропиона и пропиона без метионин- $\gamma$ -лиазы, поскольку на рисунках заметна тенденция к увеличению гибели клеток в культуре и к уменьшению объема опухоли, при отсутствии статистической достоверности различий с контролем.

7. В главе «Обсуждение полученных результатов» частично повторяются рассуждения из Введения к диссертационной работе.

Высказанные замечания не затрагивают существа работы, не вызывают сомнения в достоверности и надежности полученных результатов, сделанных выводов и положений, выносимых на защиту.

## **Заключение**

Диссертационное исследование Або Кура Луая «Механизм действия и противоопухолевая активность фармакологических пар *Clostridium novyi* C115H метионин-гамма-лиазы и сульфоксидов S-алкил-замещенного L-



цистеина» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение научной задачи по доклиническому изучению противоопухолевой эффективности и механизма действия фармакологических пар, содержащих пролекарство и активирующий его фермент, имеющей важное значение для разработки научных и практических основ применения фармакологических пар в терапии онкологических заболеваний.

Работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, согласно п.2.2 раздела II Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы», утвержденного Ученым советом РУДН протокол № 12 от 23.09.2019 г., а её автор, Або Кура Луай, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.4. Биохимия», «3.1.6. Онкология, лучевая терапия».

Официальный оппонент:

д.б.н., зав. лабораторией пептидной инженерии  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии  
имени В.Н. Ореховича»

*Колесанова* Е.Ф. Колесанова

Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8

Телефон: +7 499 246-3375

E-mail: EKolesanova@yandex.ru

Подпись

*Колесанова Е.Ф.*

заверяю

Ученый секретарь ИБМХ к.х.н. Карпова Е.А.

