

«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, доктор биологических наук
Мартыненко В.Б.

«04»

2023 г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**Федерального государственного бюджетного научного учреждения
Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук**

Диссертация «Разработка новых противоопухолевых агентов «митоканов» на основе конъюгатов тритерпеновых кислот с митохондриотропным соединением F16» выполнена в Институте нефтехимии и катализа – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, в лаборатории органического синтеза.

В период подготовки диссертации с 01.10.2019 по 29.09.2023 соискатель Давлетшин Эльдар Валерьевич обучался в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (УФИЦ РАН). С апреля 2022 г. по настоящее время Эльдар Валерьевич работает в должности младшего научного сотрудника лаборатории молекулярного дизайна и биологического скрининга веществ-кандидатов для

фарминдустрии Института нефтехимии и катализа – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (ИНК УФИЦ РАН).

В 2019 году Давлетшин Эльдар Валерьевич окончил химический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный университет» с присвоением квалификации «Химик. Преподаватель химии» (освоил программу специалитета по специальности 04.05.01 Фундаментальная и прикладная химия), после чего поступил в аспирантуру УФИЦ РАН по направлению подготовки 04.06.01 Химические науки, направленность (профиль) образовательной программы: Органическая химия, которую окончил в 2023 году с присвоением квалификации «Исследователь. Преподаватель-исследователь».

Справка № 73–23 о сдаче кандидатских экзаменов по дисциплинам: история и философия науки (химические науки), иностранный язык (английский язык) выдана 04 декабря 2023 года Федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы».

Справка № 134/654.2 о сдаче кандидатского экзамена по специальности 1.4.3. Органическая химия выдана 07 декабря 2023 года Федеральным государственным бюджетным научным учреждением Уфимским федеральным исследовательским центром Российской академии наук.

Научный руководитель – Спивак Анна Юльевна, кандидат химических наук (02.00.03 – Органическая химия), старший научный сотрудник лаборатории органического синтеза Института нефтехимии и катализа – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского

федерального исследовательского центра Российской академии наук. Тема диссертации утверждена Ученым советом ИНК УФИЦ РАН, протокол № 13 от 22.11.2019.

По итогам обсуждения диссертационной работы принято следующее заключение.

Оценка выполненной соискателем работы

Диссертационная работа Давлетшина Эльдара Валерьевича является цельной, самостоятельной и законченной научно-исследовательской работой, выполненной на высоком профессиональном уровне, и отвечает критериям пп. 9-11, 13, 14 Постановления Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Основные научные результаты, полученные соискателем

В ходе выполнения диссертационной работы получены следующие результаты:

- Разработаны рациональные методы синтеза и реализован синтез серии ранее неизвестных конъюгатов природных тритерпеновых кислот с митохондриально-тропным катионным соединением F16. Липофильный катион F16 использован для усиления биодоступности, облегченного трансмембранного переноса и селективного накопления цитотоксических тритерпеновых кислот в митохондриях опухолевых клеток. Для ковалентного связывания катионной молекулы и тритерпеноида через различные линкеры при C-2, C-3, C-28 и C-30 позициях тритерпенового ядра использованы классические реакции этерификации кислот в щелочных условиях, этерификация по Стеглиху или реакция кросс-сочетания по Соногашира арилгалогенидов с терминальными алкинами тритерпеновой структуры.

- Разработан стереоселективный синтез ранее неопisanного оксигенированного аналога бетулиновой кислоты и его конъюгата с F16, содержащих 1 α ,2 β ,3 β -полигидроксилированное кольцо A. Синтез нового тритерпеноида лупановой структуры основан на стереоселективном эпоксидировании двойной связи в 1,2-еноновом фрагменте кольца A промежуточно полученного бензилбетулоната под действием H₂O₂ в щелочной среде и на стереоселективном кислотном раскрытии эпоксидного кольца под действием HClO₄.
- На основе доступных урсоловой и олеаноловой кислот реализован многостадийный стереоселективный синтез маслиновой и коросолевой кислот. Полученные оксигенированные тритерпеноиды успешно вовлечены в конъюгацию с (E)-4-(2-(1H-индол-3-ил)винил)пиридином с получением новых гибридных катионных соединений тритерпеновой структуры.
- Исследован цитотоксический потенциал синтезированных соединений в отношении линий опухолевых клеток человека различного происхождения (опухолевые линии лейкозных клеток, карциномы и здоровые клетки фибробласты). Все синтезированные соединения проявили высокий противоопухолевый эффект на лейкозных клетках в субмикромольных концентрациях с приемлемым «терапевтическим окном» (IS=10). Гибридные молекулы превзошли свои прототипы, природные тритерпеновые кислоты, в 100-300 раз. Высокий синергетический эффект подтвердился также на исследованных линиях карцином.
- Проведен анализ влияния структуры на противоопухолевую активность гибридов, который показал, что в ряду исследуемых конъюгатов лупановой, урсановой и олеановой структуры F16-производные лупановых тритерпеноидов были наиболее цитотоксичными и селективными соединениями. Введение второго

катионного фрагмента F16 в молекулу тритерпеноида, конъюгация бетулиновой кислоты с F16 при C-30 позиции или увеличение количества гидроксильных групп в кольце А тритерпеновых кислот не дало положительного заметного изменения цитотоксической активности.

- Разработан новый метод синтеза BODIPY-меченных проб производных бетулиновой кислоты, несущих в C-28 боковой цепи концевые митохондриально-направленные трифенилфосфониевые группы. В качестве ключевой стадии синтеза использована реакция кросс-сочетания между C-2-пропинильным производным бетулиновой кислоты и галоидными производными флуоресцентного красителя, содержащего йодную функцию при C-2 или C-8 позициях BODIPY-платформы. Разработанная процедура ковалентного связывания флуорофора BODIPY с бетулиновой кислотой, позволяющая сохранить в тритерпеновом ядре нативные 3-OH и 28-COOH функции, может найти применение в синтезе других флуоресцентных BODIPY-меченных тритерпеновых кислот.
- С использованием метода конфокальной флуоресцентной спектроскопии проведена прямая визуализация внутриклеточного распределения F16-конъюгатов тритерпеновых кислот в эндотелиальных клетках мышцы. Результаты анализа показали, что гибридные молекулы поглощаются клетками и основным местом их накопления являются митохондрии.

Личный вклад Давлетшина Э.В. состоит в выполнении всего объема экспериментальных исследований, обработке и обсуждении экспериментальных результатов, подготовке данных для научных публикаций, апробации результатов и написании работы.

Достоверность полученных результатов

Высокая степень достоверности представленных результатов достигнута в результате применения современных методов идентификации впервые синтезированных соединений с помощью одномерной (^1H и ^{13}C), двумерной гомо- (COSY, NOESY) и гетероядерной (HSQC, HMBC) спектроскопии ЯМР, масс-спектропии MALDI TOF/TOF, ИК-спектроскопии, а также публикацией результатов в 9 научных статьях.

Научная новизна полученных результатов

В работе **впервые** получены следующие результаты:

Синтезированы ранее неизвестные конъюгаты природных тритерпеновых кислот, содержащие в своем составе фрагмент липофильного катионного соединения F16, использованного в качестве митохондриально-тропного транспортного средства, усиливающего трансмембранный перенос тритерпеноидов, а также перспективного для использования в качестве флуоресцентного зонда.

Систематически исследовано влияние структуры тритерпенового ядра и типа линкера на цитотоксический потенциал F16-гибридных молекул тритерпеноидов в отношении опухолевых линий лейкозных клеток и карцином. В результате выявлены соединения лидеры, многократно превысившие цитотоксическую активность исходных тритерпеновых кислот и показавшие, наряду с высоким противоопухолевым эффектом, приемлемое терапевтическое окно между опухолевыми лейкозными клетками и здоровыми клетками фибробластами человека.

Разработан новый подход к синтезу BODIPY-меченных проб производных бетулиновой кислоты, несущих в С-28 боковой цепи концевые митохондриально-направленные трифенилфосфониевые группы. Разработанный подход ковалентного связывания флуорофора BODIPY с бетулиновой кислотой, позволяющий сохранить в тритерпеновом ядре

нативные 3-ОН и 28-СООН функции, может найти применение в синтезе других флуоресцентных BODIPY-меченных тритерпеноидов.

Методом конфокальной микроскопии, выполненной на эндотелиальных клетках мыши, исследовано внутриклеточное распределение F16-производных тритерпеновых кислот. В результате показана значительная локализация испытуемых гибридных соединений в митохондриях клеток.

Практическая значимость результатов

Впервые изучено влияние введения катионного фрагмента F16 в структуру пентациклических тритерпеновых кислот на проявляемые ими цитотоксические эффекты с целью установления перспектив применения полученных гибридных соединений в качестве потенциальных митохондриально-направленных противоопухолевых лекарственных средств. На нескольких лейкозных опухолевых клеточных линиях и на линиях карцином молочной железы и немелкоклеточного рака легких показано, что конъюгация F16 с тритерпеноидами синергетически усиливает их цитотоксичность, что приводит к значительному снижению активных концентраций, до субмикромольных величин. Среди исследованных конъюгатов выявлены соединения-лидеры, которые наряду с высоким противоопухолевым эффектом продемонстрировали селективность между опухолевыми лейкозными клетками и здоровыми фибробластами. Прямая визуализация распределения F16 – производных тритерпеноидов во внутриклеточных органеллах, выполненная методом конфокальной микроскопии на эндотелиальных клетках мыши, показала значительную степень локализации гибридных соединений в митохондриях клеток. Полученные нами результаты свидетельствуют о перспективности развиваемого подхода и возможности использования F16-производных тритерпеновых кислот в качестве новых митохондриально-направленных противоопухолевых агентов.

**Полнота изложения материалов диссертации
в опубликованных работах**

По материалам работы опубликовано 9 статей в журналах, входящих в международные базы данных Web of Science и Scopus, тезисы 9 докладов на всероссийских и международных конференциях.

Основные публикации по теме диссертации:

1. Spivak, A.Yu. Pentacyclic triterpene acid conjugated with mitochondria-targeting cation F16: Synthesis and evaluation of cytotoxic activities / A.Yu. Spivak, D.A. Nedopekina, R.R. Gubaidullin, **E.V. Davletshin**, A.A. Tukhbatullin, V.A. D'yakonov, M.M. Yunusbaeva, L.U. Dzhemileva, U.M. Dzhemilev // *Medicinal Chemistry Research*. – 2021. – V. 30. – P. 940–951.
2. Gubaidullin, R.R. Design, Synthesis, and Photophysical Properties of BODIPY-Labeled Lupane Triterpenoids / R.R. Gubaidullin, D.A. Nedopekina, A.A. Tukhbatullin, **E.V. Davletshin**, A.Yu. Spivak // *Chem. Proc.* – 2021. – V. 3. – №1. – P. 11.
3. Dubinin, M.V. Mitochondria-targeted prooxidant effects of betulinic acid conjugated with delocalized lipophilic cation F16 / M.V. Dubinin, A.A. Semenova, A.I. Ilzorkina, N.V. Penkov, D.A. Nedopekina, V.A. Sharapov, E.I. Khoroshavina, **E.V. Davletshin**, N.V. Belosludtseva, A.Yu. Spivak, K.N. Belosludtsev // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2021. – V. 168 – P. 55–69.
4. Dubinin, M.V. Effect of F16-Betulin Conjugate on Mitochondrial Membranes and Its Role in Cell Death Initiation / M.V. Dubinin, A.A. Semenova, D.A. Nedopekina, **E.V. Davletshin**, A.Yu. Spivak, K.N. Belosludtsev // *Membranes*. – 2021. – V. 11. – P. 352.
5. Nedopekina, D.A. Effective Synthesis of a Novel Betulinic Acid Conjugate with Mitochondria-Targeting Cation F16 / D.A. Nedopekina, **E.V. Davletshin**, A.Yu. Spivak // *Chem. Proc.* – 2022. – V. 8. – № 1. – P. 97.
6. Spivak, A.Yu. Synthesis of BODIPY-labeled fluorescent betulinic acid derivatives with a terminal triphenylphosphonium group on side-chain C-28 /

A.Yu. Spivak, **E.V. Davletshin**, R.R. Gubaidullin, A.A. Tukhbatullin, D.A. Nedopekina // Chem. Nat. Compd. – 2022. – V. 58. – № 6. – P. 1062–1068.

7. Belosludtsev, K.N. Comparative Study of Cytotoxic and Membranotropic Properties of Betulinic Acid-F16 Conjugate on Breast Adenocarcinoma Cells (MCF-7) and Primary Human Fibroblasts / K.N. Belosludtsev, A.I. Ilzorkina, N.V. Belosludtseva, V.A. Sharapov, N.V. Penkov, D.A. Serov, M.N. Karagyaurov, D.A. Nedopekina, **E.V. Davletshin**, M.E. Solovieva, A.Yu. Spivak, U.S. Kuzmina, Yu.V. Vakhitova, V.S. Akatov and M.V. Dubinin // Biomedicines. – 2022. – V. 10. – P. 2903.

8. Dubinin, M.V. Conjugation of Triterpenic Acids of Ursane and Oleanane Types with Mitochondria-Targeting Cation F16 Synergistically Enhanced Their Cytotoxicity against Tumor Cells / M.V. Dubinin, D.A. Nedopekina, A.I. Ilzorkina, A.A. Semenova, V.A. Sharapov, **E.V. Davletshin**, N.V. Mikina, Y.P. Belsky, A.Y. Spivak, V.S. Akatov, N.V. Belosludtseva, J. Liu, K.N. Belosludtsev // Membranes. – 2023. – V. 13. – P. 563.

9. Spivak, A.Yu. Synthesis and cytotoxic activity of the conjugate of an oxygenated betulinic acid analog with the delocalized lipophilic cationic compound F16 / A.Yu. Spivak, **E.V. Davletshin**, D.A. Nedopekina, R.R. Khalitova, Yu.P. Belsky, O.Yu. Shuvalov // Chem. Nat. Compd. – 2023. – V.59. – №5. – P. 865-871.

Соответствие содержания диссертации паспорту специальности

Диссертационная работа Давлетшина Эльдара Валерьевича соответствует паспорту научной специальности 1.4.3. Органическая химия, а именно по пункту 3 (развитие рациональных путей синтеза сложных молекул), пункту 7 (выявление закономерностей типа «структура-свойство») и пункту 8 (моделирование структур и свойств биологически активных веществ).

Диссертация «Разработка новых противоопухолевых агентов «митоканов» на основе конъюгатов тритерпеновых кислот с

митохондриотропным соединением F16» Давлетшина Эльдара Валерьевича рекомендуется к представлению к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3. Органическая химия.

Заключение принято на заседании объединенного научного семинара Института нефтехимии и катализа – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

Присутствовало на заседании 43 человека. Результаты голосования: «за» – 43 чел., «против» – нет, «воздержалось» – нет, протокол № 10 от 30 ноября 2023 г.

Председатель объединенного научного семинара ИНК УФИЦ РАН, д.х.н.


_____ Сабиров Д.Ш.

Секретарь объединенного научного семинара ИНК УФИЦ РАН, к.ф.-м.н.


_____ Тухбатуллин А.А.