



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
**ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**  
*им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова*  
Российской академии наук  
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика  
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: [office@ibch.ru](mailto:office@ibch.ru), [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru)  
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

11.11.2016 № 401/9-217.1-839

на № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_



УТВЕРЖДАЮ  
Директор Федерального  
государственного бюджетного  
учреждения науки Института  
биоорганической химии имени  
академиков М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова РАН,  
академик РАН, профессор  
В.Т. Иванов



“11” ноября 2016 г.

**ОТЗЫВ  
ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

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).

Разработка лекарственных средств, нацеленных на одну мишень, очень часто приводит к наличию дополнительных побочных эффектов, как положительных, так и отрицательных, и выявляемых только на стадиях доклинических или клинических испытаний, а иногда и после выхода препарата на рынок. Незапланированные при разработке побочные эффекты возникают по двум причинам. Первая причина - наличие дополнительных мишеней, неизвестных или не принятых во внимание при разработке препарата, и вторая – химические превращения препаратов в организме, приводящие к появлению физиологически активных продуктов. Критическую роль в окислении лекарственных препаратов до физиологически активных метаболитов играет цитохром P450.

С целью доказательства специфичности действия препарата на искомую мишень в доклинических исследованиях используется комбинация прямых гомогенных *in vitro*

тестов на рекомбинантных белках (ферментах) и различных биологических тестов как на клеточных репортерных системах, так и клеточных моделях, которая позволяет доказать специфичность к выбранной мишени. Как правило, при правильном выборе аналитических методик удается разработать достаточно специфические препараты уже на самом первом этапе. Камнем преткновения является предсказание токсичности и путей биотрансформации потенциальных лекарственных препаратов у человека на стадии доклинических испытаний. Проблема состоит в том, что ни одна животная модель не соответствует человеку по профилю экспрессии и активности изоформ цитохрома P450. Половина отозванных с рынка лекарственных препаратов по причине гепатотоксичности не показывала таковой в доклинических испытаниях на животных. В последнее десятилетие в ведущих странах – Германии, России, США - для решения этой проблемы предлагается разработка микробиореакторов с использованием клеточных моделей человека – «человек-на-чипе», и в частности «печень-на-чипе».

Диссертационная работа Захарянц А.А. выполнена в рамках и при поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы», и посвящена разработке методов доклинической оценки токсичности и путей биотрансформации потенциальных лекарственных препаратов в микробиореакторе «печень-на-чипе». Предметом исследования явились два потенциальных антигипоксических препарата, идентифицированные ранее в репортерном анализе на клетках нейробластомы человека, отбирающем активаторы фактора, индуцируемого гипоксией (HIF). Предполагалось, что соединения являются специфическими ингибиторами фермента HIF пролилгидроксилазы человека, но прямые доказательства этого – ингибирование очищенного фермента отобранными соединениями - в литературе отсутствовали. При этом в репортерном анализе идентифицированные соединения намного превосходили по эффективности ингибиторы, разработанные фирмой GlaxoSmithKline и Fibrogen и находящиеся в стадии завершения клинических испытаний. Более того, в отличие от коммерческих препаратов в стадии клинических испытаний, данные соединения проникают через гемато-энцефалический барьер. Целью работы диссертанта было выяснение перспективности дальнейшей разработки новых потенциальных антигипоксических препаратов, используя самые современные подходы к оценке их токсичности и путей биотрансформации.

Интерес к разработке ингибиторов фермента HIF пролилгидроксилазы человека в мире огромен. Ведущие фармацевтические компании - -Abbott, Johnson&Johnson, Amgen, Merck, GlaxoSmithKline, Fibrogen – находятся на стадии клинических испытаний своих запатентованных ингибиторов данного фермента. Ингибиторы HIF пролилгидроксилазы предотвращают гидроксирование транскрипционного фактора HIF и тем самым его последующее распознавание комплексом убиквитинлигазы и протеасомную деградацию; стабилизация HIF приводит к его транслокации в ядро и

запуску генетической программы антигипоксической защиты. В принципе, эффективный и проникающий через гемато-энцефалический барьер ингибитор фермента представляет собой панацею от ишемии мозга, и не только. Эритропоэтин – лишь одна из мишеней транскрипционного фактора, но именно она вызывает повышенный интерес, поскольку рынок рекомбинантного эритропоэтина для лечения анемии оценивается в 9 млрд долл США, и ингибиторы фермента могут легко вытеснить рекомбинантный эритропоэтин. Таким образом, диссертационная работа Захарянц А.А. посвящена исключительно актуальной и важной в практическом отношении проблеме.

С фундаментальной точки зрения, механизм регуляции антигипоксической защиты находится в фокусе исследований с момента открытия HIF в 1994 г. 13 сентября 2016 г. троим ученым была вручена престижная премия в области медицины – премия Ласкера – проф. Г.Семенца (Гарвард) за открытие HIF, проф. У.Каэлину (Гарвард) – за открытие механизма убиквитинирования HIF, и проф. П. Ратклиффу (Оксфорд) – за открытие фермента HIF пролилгидроксилазы. Как фундаментальная, так и практическая значимость разработок в области регуляции активности фермента не вызывает сомнений. Фермент существует в трех изоформах, лишь для одной из них были получены кристаллы и определена трёхмерная структура. Изоформы фермента имеют и другие субстраты помимо HIF. Поэтому исследования роли и функций фермента продолжаются.

В диссертационной работе Захарянц А.А. был разработан метод непрерывной регистрации побочной активности фермента, который позволил впервые провести реактивацию фермента из телец включения *E.coli*. Новый метод позволяет получать значительные количества активного фермента (изоформа 2), и в принципе в дальнейшем открывает возможность для разработки аналогичных методик получения двух других, гораздо менее изученных изоформ фермента. С использованием препарата очищенного фермента было показано, что соединения, отобранные на клеточном репортере, действительно являются прямыми ингибиторами фермента HIF пролилгидроксилазы. Таким образом, была показана специфичность данных соединений к выбранной мишени.

Для решения второй части задачи – доклинической оценки гепатотоксичности и путей биотрансформации потенциальных антигипоксических препаратов – в диссертации Захарянц А.А. была разработана панель субстрат-ингибитор цитохрома P450 для использования в отечественном микробиореакторе «Гомункулус» с имитацией микроциркуляции и использованием сфероидов дифференцированных клеток *HepaRG* в качестве модели печени человека. Был проведен большой объем экспериментальной работы, включая валидацию разработанной панели с помощью двух хорошо известных лекарственных препаратов – варфарина и дазатиниба. Разработанная панель сама по себе представляет практическую ценность и может быть

использована для оценки путей биотрансформации любых препаратов.

В диссертации Захарянц А.А. разработанная панель была опробована для предсказания гепатотоксичности и путей биотрансформации двух потенциальных антигипоксических препаратов. Была показана перспективность дальнейшей разработки указанных препаратов. В свете вышесказанного, диссертационная работа Захарянц А.А., посвященная разработке методов доклинической оценки гепатотоксичности и путей биотрансформации лекарственных препаратов, является актуальной и практически значимой.

Диссертационная работа Захарянц А.А. построена по традиционной схеме. Она состоит из следующих разделов: Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результатов и их обсуждения, Выводов и Списка литературы. Диссертация изложена на 131 странице, включает 48 рисунков, 11 схем уравнений реакций, 14 таблиц и 137 литературных ссылок.

Обзор литературы состоит из четырех частей. Первая часть посвящена роли цитохрома P450 в детоксикации ксенобиотиков: рассмотрены реакции, катализируемые ферментом, механизм катализа и проблема субстратной специфичности 57 изоформ цитохрома P450 человека. На основании краткого обзора литературных данных делается вывод о необходимости разработки систем с клеточными моделями печени человека для тестирования потенциальных кандидатов в лекарственные препараты на самой ранней стадии их разработки. Во второй части обзора очень подробно рассмотрены различные клеточные линии, используемые для моделирования печени человека, проведено их детальное сравнение, в том числе и по профилю экспрессии и активности изоформ цитохрома P450, с первичными гепатоцитами. На основании тщательного анализа литературных данных делается вывод о наибольшем соответствии первичных гепатоцитов линии дифференцированных клеток *HepaRG*. Третья часть обзора кратко описывает биочип, разработанный в России и используемый в работе, и результаты его оптимизации; «печень-на-чипе» использует в качестве модели печени человека трехмерные сфероиды, образованные дифференцированными клетками линии *HepaRG*. Заключительная глава освещает новые тенденции в разработке лекарственных средств, а именно, препаратов, модулирующих эпигенетическую регуляцию, и эффекторов транскрипционных факторов, в частности, подробно описывает практическую значимость разработки ингибиторов фермента NIF пролилгидроксилазы человека. Рассмотрены каталитические свойства фермента и методы скрининга ингибиторов фермента с использованием клеточных репортеров нового поколения. В целом Обзор литературы хорошо построен и дает подробное представление о текущем состоянии проблем разработки лекарственных препаратов и методов их решения. Из Обзора литературы логично вытекают поставленные цели и задачи диссертационной работы Захарянц А.А.

В разделе Материалы и Методы описаны материалы, которые были использованы автором в его исследовании, и приведено подробное описание современных методов, использованных в работе. Этот раздел свидетельствует о том, что данная диссертационная работа охватывает различные области современной науки и говорит о большом объеме проведенных исследований и высокой квалификации автора в области современной биотехнологии, а также молекулярной и клеточной биологии, биохимии, химической энзимологии, физической химии и микробиологии.

Раздел результаты и их обсуждение состоит из трех глав. Результаты всех экспериментов проиллюстрированы на соответствующих рисунках, графиках, диаграммах и систематизированы в соответствующих таблицах.

В первой главе Обсуждения результатов подробно описано конструирование векторов для экспрессии всех трех изоформ HIF пролилгидроксилазы человека в двух вариантах – с гистидиновым тагом и без него – в клетках *E.coli*. На основании сравнительного анализа уровней экспрессии проведен выбор оптимальной конструкции для последующей разработки метода реактивации фермента из телец включения *E.coli* и его сравнения с ферментом растворимой фракции. В данном разделе автором впервые разработана и подробно описана методика получения данного фермента путем реактивации его нерастворимой формы. Разработка и оптимизация метода реактивации из телец включения стала возможна благодаря разработанному автором непрерывному спектрофотометрическому методу регистрации побочной активности фермента, ранее не описанному в литературе. Было показано, что реактивированный фермент имеет более высокую активность, чем фермент растворимой фракции, и доступен в гораздо больших количествах. На препарате очищенного реактивированного фермента подтверждено ингибиторное действие двух потенциальных антигипоксических соединений, идентифицированных ранее методом скрининга на клеточных репортерах. Таким образом, был впервые подтвержден факт их прямого ингибирования фермента.

Во второй главе на основе подробного анализа литературных данных по специфичности и параметрам ингибирования четырех изоформ цитохрома P450 предложена комбинация специфических субстрата и ингибитора для каждой из изоформ. Для каждого субстрата и основного продукта его гидроксирования соответствующей изоформой цитохрома P450 была разработана методика хромато-масс-спектроскопической детекции, позволяющая одновременно количественно идентифицировать все 8 соединений в культуральной жидкости из микробиореактора, работающего в режиме микроциркуляции на сфероидах дифференцированных клеток *HepaRG*. Таким образом, была разработана панель субстрат-ингибитор для доклинической оценки биотрансформации лекарственных соединений в «печени-на-чипе». Следует отметить колоссальный объем экспериментальной работы по оптимизации масс-спектроскопической детекции субстратов и их метаболитов.

Разработанная панель была с успехом апробирована автором для предсказания биотрансформации двух известных препаратов – варфарина и дазатиниба. Полученные результаты соответствовали опубликованным данным по метаболизму данных двух препаратов, и таким образом, была подтверждена готовность использования разработанной автором панели субстрат-ингибитор для изучения двух потенциальных антигипоксических препаратов, являющихся прямыми ингибиторами NIF пролилгидроксилазы человека, как было показано автором в первой части результатов.

В третьей главе Обсуждения результатов проведены эксперименты по апробации разработанной автором панели для доклинической оценки двух новых антигипоксических препаратов, находящихся в стадии разработки. Автором впервые показано, что указанные потенциальные антигипоксические препараты не являются токсичными для дифференцированных клеток *HepaRG* (клеточная модель печени человека) в широком диапазоне концентраций (на два порядка превышающем диапазон биологически активных концентраций). Использование разработанной автором панели субстрат-ингибитор для предсказания биотрансформации исследуемых соединений однозначно показало, что указанные соединения гидроксилируются двумя изоформами цитохрома P450 - CYP3A4 и CYP2B6. Неожиданным результатом работы явилось открытие эффекта значительной активации(индукции) последней изоформы цитохрома P450 под действием изучаемых соединений. Следует отметить, что выбор автором именно этой изоформы цитохрома P450 для создания панели субстрат-ингибитор оказался оправданным. Несмотря на то, что эта форма метаболизирует не более 10% всех известных лекарственных препаратов, именно она отличается у человека наибольшим полиморфизмом и индуцибельностью. Обнаруженный автором эффект активации заслуживает отдельного исследования механизма явления в будущем.

В заключение главы автор делает вывод о перспективности двух исследованных препаратов для последующей разработки антигипоксических препаратов на их основе. Полученные автором результаты представляют, как фундаментальный интерес, с точки зрения методов реактивации ферментов-диоксигеназ и наличия у ферментов побочных редокс-активностей, так и имеют важное практическое значение, поскольку разработанная автором панель субстрат-ингибитор может быть использована для доклинической оценки биотрансформации различных препаратов в стадии разработки.

Необходимо отметить аккуратное и наглядное оформление всех рисунков, графиков, диаграмм и таблиц, что значительно упрощает восприятие большого количества экспериментального материала. Работа написана грамотным научным языком и выполнена на высоком теоретическом и экспериментальном уровнях с использованием самых современных и разносторонних методов исследования из различных областей науки (биотехнология, молекулярная и клеточная биология, биохимия, микробиология, химическая энзимология, физическая химия,

биоинформатика и др.). Результаты диссертации конкретны и обладают большой научной новизной и практической значимостью. Выводы диссертации хорошо обоснованы и непосредственно следуют из представленных экспериментальных данных. Данная работа вносит существенный вклад в разработку современных методов доклинической оценки токсичности и путей биотрансформации потенциальных лекарственных препаратов.

При ознакомлении с работой возникли следующие замечания и пожелания:

- во всей работе автор использует сокращенные названия и на русском, и на английском языках. В связи с устоявшимися английскими сокращениями для ферментов и транскрипционных факторов, можно было бы все сокращения писать в английском варианте с целью унификации;

- в работе присутствует небольшое количество опечаток и неточностей:

(а) на стр. 7 отсылка к Рис.1 – на самом деле он обозначен как Рис 1.1

(б) на стр. 10, 8-строка сверху - пропущен предлог «на»

(в) на стр. 14 в Табл. 1 – неправильный перенос слова «высокая», и использовано английское сокращение N/A (not applicable)

(г) стр. 19 – отсылка к необозначенному на Рис.2.1.1 Соединению I.

Данные замечания являются техническими, относятся к оформлению работы и никоим образом не связаны с научными аспектами и не снижают общую положительную оценку работы, которая выполнена на высоком профессиональном уровне. Выводы логично вытекают из экспериментальных данных. Особо следует подчеркнуть объем экспериментальной работы по оптимизации масс-спектроскопической детекции субстратов панели и их метаболитов в смеси. По результатам работы были опубликованы 3 статьи в журналах, входящих в Перечень ведущих научных изданий ВАК РФ, и 4 тезисов докладов на российских и международных конференциях и симпозиумах. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации.

Полученные автором результаты могут быть использованы в лабораториях, работающих в области биохимии, молекулярной биологии и биотехнологии - в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН, Институте физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, на Химическом и Биологическом факультетах и Факультете биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова.

Диссертационная работа Захарянц А.А. удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым в пунктах 9-14 «Постановления о порядке присуждения ученых степеней» (№ 842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор безусловно заслуживает присвоения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии). Работа была обсуждена на заседании лаборатории биокатализа ФГБУН ИБХ им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова.

Отзыв был заслушан и одобрен на заседании лаборатории биокатализа  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт  
биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
\_7 ноября 2016 г.

Заведующий лабораторией биокатализа  
Института биоорганической химии имени  
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
академик РАН,  
доктор химических наук, профессор

А.Г.Габибов

Подпись А.Г.Габибова заверяю  
Ученый секретарь ИБХ РАН д.ф-м.наук

В.А.Олейников

117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт  
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук (ФГБУН ИБХ РАН)

Отдел пептидно-белковых технологий, Лаборатория биокатализа,  
тел. +7 (495) 727-38-60,  
gabibov@mx.ibch.ru