

## ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Королева Дмитрия Владимировича на тему: «Разработка препаратов для тераностики и направленной доставки кардиопротективных субстанций на основе кремнеземных и магнитных наночастиц», представленной на соискание ученой степени доктора химических наук по специальностям 02.00.21 - Химия твердого тела, 02.00.16 - Медицинская химия.

Мировой фармацевтический рынок перманентно расширяется за счет появления новых лекарственных средств (ЛС), обладающих высокой эффективностью и селективностью действия. В конце минувшего года Food and Drug Administration (FDA) одобрил применение в клинической практике 24 новых ЛС. Из них 8 - предназначены для применения в онкологии, 9 - в терапии заболеваний центральной нервной системы, 7 - для лечения инфекционных заболеваний различного происхождения. Разработка оригинального лекарственного средства требует огромных интеллектуальных, финансовых и временных затрат. На старте разработки ЛС нового поколения методами компьютерного прогноза (молекулярный докинг) выполняется поиск наилучшего соответствия структуры молекул лекарственного кандидата и соответствующей биологической мишени (Drug design). Важным направлением проектирования молекул активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) лекарственных средств является «биоизостеризм», предполагающий замену карбоксильных и *цис*-амидных групп в молекулах перспективных АФИ на высокоазотистые гетероциклические фрагменты, такие как тетразольный цикл. В этом случае можно снизить риски химической деградации молекул АФИ за счет действия соответствующих деструктурирующих ферментов. Типичным примером, подтверждающим сказанное, является молекула АФИ лозартана - первого представителя гипотензивных лекарственных средств ряда сартанов - антагониста рецепторов АПФ-II (Рис.1).

09/2-71 от 31.01.2020

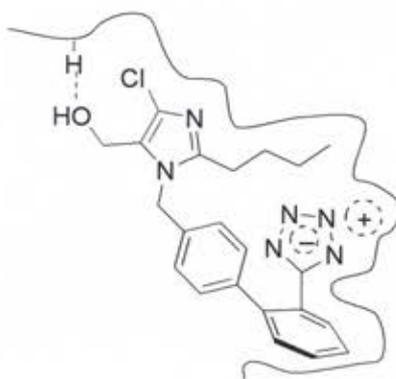


Рис. 1 Расположение лозартана в липофильном кармане  $AT_1$  рецептора ангиотензина II.

Последующие этапы разработки ЛС, на которых не буду останавливаться, требуют все больших усилий средств и времени. Создание и вывод на рынок лекарственных средств нового поколения, обладающих высокой эффективностью, селективностью действия, а также устойчивостью к действию деструктурирующих факторов - это самый сложный и многоэтапный процесс, занимающий в среднем от 5 до 15 лет. Стоимость одного такого проекта, у лидеров рынка лекарственных средств, таких как Pfizer, AstraZeneca, Eli-Lilly в среднем составляет 10-15 \$ млрд. При этом время жизни даже самого крутого бренда не превышает 5-10 лет, что требует от фармацевтических компаний постоянного обновления ассортимента продукции. По мнению ведущих экспертов, фармацевтическая отрасль в настоящее время испытывает системный кризис и нуждается в альтернативных подходах и алгоритмах создания ЛС. Большие надежды связывают с молекулярной тераностикой (МТ). МТ – современная лечебно-диагностическая полифункциональная платформа, на которой разрабатываются методы, позволяющие обнаруживать, уничтожать, контролировать визуально и инструментально в режиме реального времени патологические элементы во всем объеме циркулирующей крови. МТ – мультидисциплинарная наука, базирующаяся на достижениях молекулярной микробиологии, химии, биохимии, химии твердого тела, нанотехнологии, лазерной химии и биоинформатики. [Мелерзанов, А., Москалев, А., & Жаров,

В. Прецизионная медицина и молекулярная тераностика. *Врач*, 2016, № 12, С. 11-14]. Термин «тераностика» имеет собирательный характер, подразумевает несколько трактовок, наиболее универсальной - является «Распознавание». Тераностика объединяет методы и способы доставки непосредственно к заданным биологическим мишеням АФИ ЛС, или их фрагментов, а также фотолюминесцентных наночастиц. Начиная с середины 80-х годов XX-го века, в профессиональных кругах утвердилось понимание того, что будущее медицины будет определяться решениями проблем векторной доставки лекарств к биологическим мишеням. [Чазов Е.И., Смирнов В.Н., Торчилин В.П. Направленный транспорт лекарств: проблемы и перспективы // Журнал Всесоюзного химического общества им. Д.И. Менделеева. 1987. Т. 32. № 5. С. 485-487]. На протяжении последних 20 лет алгоритмы доставки молекул ЛС к биологическим мишеням разрабатывались применительно к онкологическим заболеваниям. В настоящей диссертационной работе, в качестве биологических мишеней впервые рассматриваются очаговые структуры заболеваний сердечно-сосудистой системы. Учитывая, что сердечно-сосудистые заболевания, традиционно входят в лидирующую группу, определяющую смертность, полагаю, что, диссертационная работа Д.В. Королева выполнена на актуальную тему.

Ключевым понятием, сквозь призму которого, разумно производить экспертную оценку диссертации, является «мультидисциплинарность». Диссертация представлена по двум специальностям – «химия твердого тела - 02.00.21» и «медицинская химия – 02.00.16». Такое решение, безусловно, оправдано, так как достижение поставленной цели и решение сформулированных задач требует от соискателя степени высокой квалификации, профессионального владения всей полнотой научной информации, а также обладания уникальным и разносторонним опытом экспериментальной работы в нескольких наукоемких и самостоятельных областях науки и технологии. Поговорим о владении информацией.

Основным разделам диссертации предпослан аналитический обзор, в котором цитируются 182 источника. Это монографии, научные статьи, тезисы профильных конференций и симпозиумов, патентные документы. Тематика практически всех работ, вовлеченных в обсуждение и анализ, имеет прямое отношение к предмету диссертации. Более 70% работ, цитируемых в аналитическом обзоре, опубликовано в течение последних 10 лет. Обобщение и критический анализ библиографии позволил в явной форме проявить контуры диссертационного исследования. Констатирую, что автор профессионально владеет современной информацией о проблемах транспорта биологически активных веществ в организмах теплокровных животных и человека. В том числе о специфике векторных процессов, осуществляемых при помощи наноразмерных носителей, способах химической модификации поверхности наночастиц фрагментами биологически активных веществ природного и синтетического происхождения, а также визуализации локализованных объектов как одному из ключевых разделов МТ. Владение полнотой информации по данной мультидисциплинарной теме, безусловно, способствовало правильной и логичной формулировке цели исследования, а также конкретизации задач, которые предстояло решить для достижения поставленной цели. Нет сомнения в компетенции Д.В. Королева как экспериментатора, реализовавшего столь сложное и многопрофильное исследование, а также в достоверности приведенных в рукописи диссертации экспериментальных данных.

Для любой научно-квалификационной работы исключительно важным представляется обоснование выбора объектов исследования. Следует признать, что мультидисциплинарный характер работы чрезвычайно усложняет решение этой задачи. С пониманием и сочувствием отношусь к тому факту, что диссертанту пришлось обосновывать выбор объектов исследования, не столько исходя из клинической целесообразности, сколько

из потребности реализовать функционирование всех химических компонентов в гармонизированном интегральном режиме. Не углубляясь в критику предложенных алгоритмов выбора компонентов, ограничусь их перечислением. В качестве кардиопротективных (кардиопротекторных) субстанций в работе использованы: Аденозин или 6-аминопурин - природный нуклеозид, содержащий пуриновый гликон, входящий в состав нуклеотидных звеньев ДНК и РНК охарактеризован весьма странным образом. Брадикинин (полипептид - ингибитор АПФ1), Креатинфосфат (КТФ) – участвует в энергетическом обмене в сердечной мышце, Акрихин (Мепакрин, Кинакрин, АКН) – влияет на постишемическое восстановление миокарда, а также является известным - флуоресцентным красителем. Важнейшее значение в контексте темы диссертации приобретает выбор наночастиц для векторной доставки ЛС: кремнезема - для «пассивной» (НЧК) и магнитных наночастиц для активной доставки (МНЧ). Следует отметить, что, если НЧК использованы в работе в виде коммерческих образцов, то МЧК – соискатель ученой степени синтезировал самостоятельно, разработав для этого оригинальные методики и оборудование. Для визуализации результатов эксперимента диссертант использовал различные варианты флуоресцентных красителей: Кинакрин. *Неудачно, что это соединение фигурирует в тексте под различными названиями. Например, Кинакрин – это уже упомянутый мной выше «Акрихин, Мепакрин, АКН».* Интересным решением следует признать применение так называемых «коллоидных квантовых точек (ККТ)». В качестве нетоксичных и доступных флуоресцентных красителей автором диссертации предложено использовать ККТ из производных дисульфида индия ( $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ ) – современного полупроводникового материала - элемента солнечных батарей. Кроме того в работе рассмотрена возможность применения для визуализации применяемых в онкологии и кардиологии рентгеноконтрастных агентов на основе 5,5'-[(2-Гидрокси-1,3-

пропандиил)бис(ацетилимино)]бис[N,N'-бис(2,3-дигидроксипропил-2,4,6-триод-1,3-бензолдикарбоксамид] (йодиксанол).

Результаты исследования можно сгруппировать в пять крупных блоков, неразрывно и последовательно связанных между собой.

**1. Выбор (в случае НЧК) и синтез (в случае МНЧ) наночастиц двух типов; Этому вопросу выше уже было уделено внимание.**

**2. Изучение физико-химических свойств и биodeградации НКЧ и МРЧ.** Вопрос о биodeградации наночастиц имеет важнейшее значение в контексте главной парадигмы медицины: «не навреди». Очевидно, что контролировать процессы деградации сложно, тем более, когда требуется сопоставление этих процессов для наночастиц двух типов. В данном случае, успех во многом определяется вооруженностью экспериментатора прецизионными методами исследования и контроля над состоянием сопоставляемых объектов, строение, индивидуальность и склонность к биodeградации которых индивидуальность которых существенно различаются. Не претендуя на глубокий анализ результатов исследования биodeградации, отмечу исключительное разнообразие использованных диссертантом инструментальных методов контроля. Просвечивающая и сканирующая электронная спектроскопия, лазерный гранулометр, автоматический порошковый рентгеновский дифрактометр, прибор для измерения Мессбауэровских спектров, энергодисперсионный рентгенофлуоресцентный спектрометр (экспресс-метод определения элементного анализа), вибрационная магнитометрия, термогравиметрия, спектрофотометрия, электрохимическое титрование. Большое внимание диссертант уделил применению математических методов для обработки результатов и теоретического исследования объектов. Например, для характеристики удельной поверхности использовали методологию Брунауэра-Эммета-Теллера. Владение столь обширным парком современных прецизионных

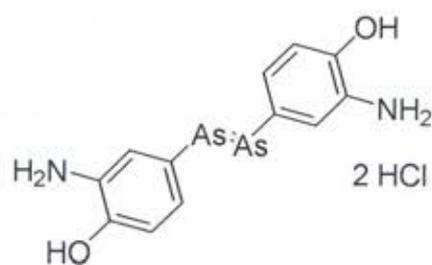
методов, а также компетенция, проявленная при интерпретации результатов исследования, объективно подтверждают высокую степень инструментальной вооруженности экспериментатора и высокую квалификацию Д.В. Королева. К сожалению, обладая столь значимыми возможностями трудно застраховаться от неточностей в изложении и интерпретации данных. Поясню на примере спектрофотометрии. На рис.54 наблюдаются сдвиги не «амплитуд», а «максимумов поглощения»; Линейные зависимости (Рис.51,52) должны наблюдаться в координатах «оптическая плотность – концентрация». В рукописи на оси абсцисс отложен вес вещества в мкг. В этом случае мы должны подвергнуть сомнению соблюдение для изучаемых объектов закона Бугера-Ламберта-Бера.

**3. Дизайн и синтез субстратов, содержащих терминальные фрагменты АФИ лекарственных средств, соединенных с поверхностными структурами наночастиц через мостиковую (спейсерную) группу.** Очевидно, что этот объемный раздел рукописи диссертации, напрямую соответствует специальности «Медицинская химия», что и обязывает меня высказаться по этому блоку достаточно подробно. По-существу речь идет о дизайне и синтезе супрамолекулярных ансамблей, в задачу которых входит транспорт фрагментов активных фармацевтических ингредиентов к биологической мишени, специфическое воздействие на эту мишень, включая визуализацию процесса, биодegradация наночастиц носителей. Обращаю внимание на тот факт, что понятие адресной доставки в данном случае не может быть строго детерминировано, так как мишень, в отличие от раковой клетки, не имеет четкой локализации в трехмерном пространстве организма. Наиболее сложным и ответственным моментом является выбор активных фармацевтических ингредиентов (АФИ), разработка оптимального дизайна и способов иммобилизации фрагментов АФИ на поверхностные структуры наночастиц. Выбор фрагментов активных молекул продиктован

совокупностью факторов и условий. Нельзя отказать соискателю ученой степени в настойчивости, упорстве и изобретательности в поисках путей преодоления трудностей подбора и мобилизации спейсеров, в задачу которых входило не только соединение ковалентными или координационно-ионными связями терминальных фрагментов АФИ и поверхностных структур НЧ, но также обеспечение комплементарности 3D-структуры АФИ – с мишенью. Впечатляющий пример ковалентной иммобилизации иодиксанола приведен на Рис. 100. К сожалению, не во всех случаях методики синтеза раскрыты исчерпывающим образом. *Химическая суть некоторых химических превращений не вполне понятна, так как методики синтеза не приведены в объеме, соответствующем нормам, принятым для описания процессов тонкого органического синтеза.* Отсутствуют весовые и мольные соотношения реагентов, не указаны катализаторы, условия смешения реагентов, выходы целевых продуктов. Рассмотрим относительно простой пример описания синтеза глицидинового спейсера (Рис.103). Очевидно, что ключевой стадией является переэтерификация простых эфиров. Хорошо известно, что этот процесс обратим. Следовательно, получение продукта переэтерификации возможно только при перманентной отгонке легкокипящего спирта – в данном случае метанола. Об этом ничего не сказано, но зачем-то упоминается о трех растворителях: циклогексан, бензол, толуол. Какой из этих растворителей был использован на самом деле, не сообщается. Как научный редактор трех международных химических журналов вынужден напомнить о каноническом требовании: методики синтеза химических соединений следует приводить в объеме, достаточном для воспроизведения грамотным синтетиком.

4. **Отработка холостых режимов транспорта НЧ к мишеням** Отмечу только, с методологической точки зрения этот раздел полностью оправдан.
5. **Выполнение и анализ результатов in vivo экспериментов с транспортными НЧ, несущими функциональные фрагменты АФИ.** В

своей профессиональной деятельности я и мои коллеги достаточно часто вступаем в контакт с биохимиками, которые исследуют наши соединения в формате *in vitro*, *in vivo*. Истинная цена и трудоемкость таких исследований мне хорошо известна. Важно, что у автора диссертации, по-видимому, сложились благоприятные условия и организовано плодотворное сотрудничество с коллегами-биохимиками. Благодаря этому удалось выполнить исследование образцов полученных им супрамолекулярных систем на животных, которые отличает высокая сложность и результативность. Оценивая трудозатраты и результаты данных исследований можно проследить определенную аналогию работами Пауля Эрлиха.



«Сальварсан»

Пауль Эрлих (1854-1915). Нобелевская премия по физиологии и медицине (1908 г.). В 1915 году Нобелевский комитет принял решение о присуждении П. Эрлиху нобелевской премии по химии. Премия не вручена в связи с уходом претендента из жизни

Пауль Эрлих реализовал себя как гениальный химик, технолог и менеджер в одном лице. Им разработан сальварсан, который оказался первым эффективным синтетическим лекарственным средством против сифилиса - чумы XIX века. Для этого потребовалось синтезировать и предварительно исследовать **606** лекарственных кандидатов, реализовать полный комплекс доклинических и клинических исследований, масштабировать процесс синтеза, организовать производство и продажу столь ожидаемого пациентами лекарственного средства (неосальварсан).

Кстати, именно Пауль Эрлих высказал возможность применения векторных подходов, называемых им «лекарственная пуля», которые мы сегодня отождествляем с понятием молекулярной тераностики.

Констатирую, что представленная на отзыв докторская диссертация Д.В. Королева «Разработка препаратов для тераностики и направленной доставки кардиопротективных субстанций на основе кремнеземных и магнитных наночастиц» выполнена на актуальную тему, содержит необходимые элементы научной новизны и практической значимости. Полученные экспериментальные данные достоверны. Возможность научного плагиата исключена.

В ходе исследований и разработок диссертантом впервые и на высоком научном уровне решена важная фундаментальная проблема – разработан оригинальный методологический подход к организации векторной доставки к биологической мишени активных ингредиентов лекарственных средств, предназначенных для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы. Созданные в ходе работы над диссертацией научно-технические решения, носят пионерский характер.

Отмечу, что полученная выпускником Санкт-Петербургского технологического института Д.В.Королевым специальность («Химия и технология гетерогенных систем»), а также специализация по которой на диссертационном совете СПбГТИ(ТУ) защищена кандидатская диссертация («Химическая технология топлив и специальных продуктов) оказались весьма уместны и полезны для успешной реализации планов докторской диссертации. В том числе уникальный опыт, приобретенный соискателем в ходе сотрудничества с СКТБ «Технолог». А именно: одно из научно-производственных направлений этой организации – детонационные наноалмазы и родственные углеродные наноструктуры, образующиеся в результате детонационных процессов. Нет сомнения в том, что профильные

знания и опыт в области медицины и медицинской химии были приобретены Д.В. Королевым в годы работы (с 2007 г.) в ФГБУ НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России.

**Публикации и апробация результатов.** Основное содержание работы опубликовано в виде 49 научных статей в отечественных и международных журналах, реферируемых в базах данных РИНЦ, Web of Science и Scopus (3 издания включены в Q2 квартиль), четырех главах коллективных монографий, 3 патентах (список приведен в приложении 1). Результаты исследования были представлены в виде 18 докладов на международных и всероссийских конференциях.

### **Замечания**

1. Проектирование молекулярной структуры активного фармацевтического ингредиента (Drug Design) предполагает доскональное знание 3D-структуры биологической мишени (фермент, клетка, бактерия, прочее), электронного и пространственного строения молекул лиганда (АФИ), особенностей взаимодействия лиганда и мишени (молекулярный докинг). В диссертации не раскрыт вопрос о молекулярной структуре супрамолекулярного комплекса АФИ - носитель в фазе активного взаимодействия с мишенью. Как именно осуществляется акт передачи на мишень фрагмента активной молекулы, до этого момента иммобилизованной на поверхности транспортных наночастиц, не сообщается. Что произошло к этому моменту времени с «транспортным элементом снаряженного «лекарственного заряда» и отделилась ли от него (терминология Пауля Эрлиха) «лекарственная пуля»? Очевидно, что этот вопрос имеет отношение к фармакокинетике био- и химической деградации наночастиц и фрагментов АФИ.

2. Вывод на фармацевтический рынок оригинальных лекарственных средств регламентируется правилами GLP (Good Laboratory Practice) и (Good Manufacturing Practice). Возможно ли в принципе организовать надлежащий

контроль над соблюдением норм и правил, когда объектами являются подобные наноструктурированные объекты.

Замечания и сформулированные выше вопросы *не носят* принципиального характера и *не отражаются* на оценке диссертационной работы в целом.

**Заключение:** Диссертация Королева Дмитрия Владимировича «Разработка препаратов для тераностики и направленной доставки кардиопротективных субстанций на основе кремнеземных и магнитных наночастиц» соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 01.09.2016 № 6821/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Королев Дмитрий Владимирович заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.21 – «Химия твердого тела» / 02.00.16 – «Медицинская химия». Пункт 11 указанного Порядка диссертантом не нарушен.

Дата 29.01.2020 г.

Член диссертационного совета

доктор химических наук, профессор,

 Островский Владимир Аронович

Подпись *Островского Владимира Ароновича*  
*Ароновича*  
Начальник отдела кадров *И. Ширяева Л.В.*

