

**ОТЗЫВ**  
**официального оппонента**  
**на диссертацию на соискание ученой степени**  
**кандидата химических наук Церковниковой Натальей Андреевной**  
**на тему: «СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ**  
**АКТИВНОСТИ НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ФАКТОРА Ха»**  
**по специальности 1.4.16 — «Медицинская**  
**ХИМИЯ»**

Церковникова Наталья Андреевна выполнила важную и необходимую с практической точки зрения работу, определенную рамками обстоятельств, в которых она оказалась. Сразу же необходимо отметить, что с самого начала работа не была ориентирована на получение фундаментальных результатов, и сама цель работы не предполагала их поиска. Ценность данной работы не столько в полученных экспериментальных результатах, имеющих несомненную практическую значимость и пользу, а сколько в том, что выполнение задач потребовало от автора освоения большого числа разнообразных методик из разных отраслей знания – химии, биологии, экспериментальной фармакологии и, конечно, медицинской химии. Наталья Андреевна не только провела достаточное число многостадийных синтезов, но и практически полностью выполнила биологическую часть диссертации, начиная от создания модели венозного тромбоза у крыс, забора крови для анализов и проведения многочисленных анализов, при этом осваивались и методы докинга. Задача Ученого Совета и оппонентов не только и не столько оценить научную и практическую важность представленных в квалификационном сочинении результатов (большой частью полученные результаты забудутся, за исключением тех, на основании которых будет написана соответствующая фармстатья), сколько оценить уровень соискателя учёной степени, широту приобретённых экспериментальных навыков, умений обрабатывать и обобщать полученные результаты, необходимых в последующей работе. Как отмечалось, результаты забудутся, а вот приобретенные навыки и опыт, безусловно, останутся и будут работать на диссертанта. И учёную степень специализированный Учёный совет присуждает не диссертации, а диссертанту. С этой точки зрения у оппонента нет сомнений как в уровне диссертанта, так и в соответствии диссертации требованиям ВАК.

**Общая характеристика работы**

Во **Введении** диссертации обоснована актуальность темы диссертационной работы, сформулированы цель и задачи, описана научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы. С большинством формулировок оппонент согласен, некоторые замечания представлены в соответствующей части отзыва.

В **главе 1** приводится обзор литературы по разработке ингибиторов фактора Ха. Обзор обстоятельный, за исключением отсутствия работ советских и российских учёных.

В **главе 2** приводятся обширные результаты работы и их подробное обсуждение на основе доказательной базы. Глава демонстрирует полноценность соответствия работы критериям отнесения к разделу «Медицинская химия».

В главе 3 приводятся материалы и разносторонние методы исследования. В качестве средств для докинга и оценки энергии взаимодействия лиганда использовался AutoDock, который прошел валидационный тест на наличие ключевых водородных связей между остатками Gly-216 и Gly-218 и амидными связями между циклическими фрагментами патентной формулы в отличие от AutoDock Vina (ADV), который такой валидации не прошел.

В главе 4 приводятся методики синтеза исследуемых соединений и методики изучения фармакологической активности полученных соединений, освоенные и используемые автором работы.

Нарушения в работе свертывающей системы крови приводят к образованию тромбов как в венозных и артериальных сосудах, так и в сердце. Наиболее распространенными заболеваниями, развивающимися в результате тромбоэмболии, являются: ишемический инсульт головного мозга, инфаркт миокарда, тромбоэмболия легочной артерии, тромбозы глубоких вен нижних конечностей. Для предотвращения тромбообразования используют различные антикоагулянтные лекарственные средства, поискам которых и посвящена большая по объему выполненных работ и широте подхода к решению проблемы диссертационная работа Церковниковой Н.А.

На протяжении длительного времени единственным классом доступных пероральных антикоагулянтов были антагонисты витамина К, такие как: варфарин, фенилин, неодикумарин и т.д., некоторые из которых были разработаны и выпускались и в СССР. Однако, несмотря на доказанную эффективность, данные препараты обладают рядом недостатков, требующих постоянного мониторинга состояния системы свертывания, корректировки дозы препарата, так как при передозировке возникают кровотечения и проч.

Эти недостатки мотивировали разработку других пероральных антикоагулянтов, не являющихся антагонистами витамина К и обладающими различными механизмами действия. Многочисленные исследования в данной области показали, что одной из наиболее привлекательных мишеней для создания новых антикоагулянтов является фактор Стюарта-Прауэра (ФХа), представляющий собой белок  $\gamma$ -глобулин, профермент. ФХа является как частью внешнего, так и внутреннего пути образования протромбиназы, превращающей протромбин в тромбин. Тромбин, в свою очередь, превращает растворимый фибриноген в нерастворимый фибрин – основу тромба. Поэтому выбранный путь решения проблемы представляется целесообразным, а само направление исследований – актуальным.

Современные антикоагулянтные препараты должны отвечать следующим требованиям: иметь низкую токсичность и узкий спектр побочных действий, обладать высокой антитромботической эффективностью и низким уровнем риска развития спонтанных кровотечений – главного осложнения антитромботической терапии. Как показали результаты, проведенных автором сочинения исследований, практически все требования, предъявляемые современным препаратам, в итоге были выполнены, и препарат проходит клинические испытания, что определяет практическую ценность и значимость проведенной работы.

Необходимо отметить не часто встречающийся подход, хотя он должен присутствовать во всех случаях создания лекарственных средств – поиск метаболитов и определение их токсичности и биологической активности. Работа Церковниковой – одна из немногих, где такой раздел присутствует. Необходимо отметить, что один из

предполагаемых метаболитов оказался по своей активности сравнимым с соединением-лидером. Это не часто встречающийся факт метаболической активации, когда в ходе метаболизма активность препарата не падает, а по крайней мере, остается первоначальной, что увеличивает эффективность препарата. На этот факт, достаточно уникальный, диссертант своё внимание не акцентирует и не отражает в выводах, хотя этот факт несомненно заслуживает отдельного упоминания именно в таком ключе.

Работу отличает одна особенность. Ранее в патенте ЕА015918, где Церковникова не является автором, был описан ряд структур, потенциально ингибирующих ФХа, без экспериментального подтверждения. В результате диссертанту досталась черновая работа по поиску среди запатентованных структур лидера, который мог бы претендовать на лекарство. В результате нескольких исследований, большая часть которых описана в рецензируемой работе, была выбрана молекула N-(5-хлорпиридин-2-ил)-2-({4-[этанамидоил(метил)амино]бензоил}амино)-5-метилбензамида гидрохлорида (условное название - DD217). В настоящий момент лекарственный препарат с действующим веществом на основе DD217 находится на этапе клинических исследований 2-й и 3-й фазы с перспективой регистрации, как лекарственное средство по одному из стандартных показаний, общепринятому для класса пероральных антикоагулянтов прямого действия.

Необходимо отметить правильное использование в квалификационном сочинении слова «дизайн». Большинство диссертантов под этим словом понимают поиск и синтез новых соединений.

Неожиданным оказалось использование в работе явления галогенной связи. Чистые органики не всегда обращают на неё внимание, а тем более специалисты, занимающиеся докингом. Дополнительной возможностью для экспериментального улучшения энергии связывания, которая не учитывается программами докинга, является, как показал, исходя из общего расположения лиганда в сайте связывания, диссертант, образование галогенной связи между тяжёлыми галогенами (атом брома) в позиции R3 (стр. 108 диссертации) и карбоксильной группой основной цепи Glu-147. Учитывая нетривиальность данного факта, было бы желательно рис. 53 дополнить ориентациями центроидов электронной плотности НЭП взаимодействующих атомов.

**Замечания и вопросы:** Естественно, в такой разноплановой работе должны быть замечания в значительном количестве, так как ни один человек не может быть полным специалистом и в химии, и в биологии (биохимии), и в фармакологии. Узкие специалисты всегда найдут погрешности в таких работах. В этом недостатки таких работ, но в этом и их преимущества, так как все прорывные открытия делались и делаются и будут делаться на стыках наук.

Относительно литературного обзора. Логично обзор было начать с разделения всех антикоагулянтов на два класса – прямые и непрямые (антагонисты витамина К). Раньше оппоненты обязательно указывали количество источников на иностранных языках, и большое их количество указывалось как достоинство. В данном обзоре из 160 источников только 4 – русскоязычных. Создаётся впечатление, что в СССР проблемой антикоагулянтов не занимались и своих ГЛС не было. Однако это не соответствует действительности. И варфарин выпускался, и проводился поиск его аналогов, в результате которого был создан и выпускался препарат «Фепромарон», превосходящий Варфарин. В МХТИ, ныне РХТУ им.Д.И.Менделеева, интенсивно разрабатывались производные кумарина, а сегодня на кафедре ХТОС под руководством С.В.Попкова проводятся и

публикуются работы по триазолам. Хотя и говорят, что кашу маслом не испортишь, но тут другая ситуация – забыли положить кашу, сплошное масло.

Замечание относительно научной новизны. Диссертант пишет (стр. 9. Дисс.): «Впервые проведен виртуальный скрининг структурных аналогов N-(5-хлорпиридин-2-ил)-2-({4-[этанимидоил(метил)амино]бензоил}-амино)-5-метилбензамида (DD217) на пространстве молекул, ограниченных формулой Маркуша из п.1 патента EA015918, с использованием подхода SAR для обнаружения биологически активных веществ с заданными свойствами. Число потенциальных кандидатов удалось уменьшить с  $10^{13}$  до 263 структур.»

По мнению оппонента это достижение следовало бы изложить в следующей формулировке: «Примененный авторами подход позволил число потенциальных кандидатов, обнаруженных в результате виртуального скрининга структурных аналогов N-(5-хлорпиридин-2-ил)-2-({4-[этанимидоил(метил)амино]бензоил}-амино)-5-метилбензамида (DD217) с  $10^{13}$  уменьшить до 263 структур».

При описании генераций структур при указании настроек (стр. 101 и следующие) R<sub>1</sub>-R<sub>6</sub> наблюдается несоответствие рисунку 12 (стр. 48) в части R<sub>2</sub> и R<sub>3</sub>, которые оказались инвертированы относительно друг друга.

Очень трудно на чёрно-белых рисунках 15 и 16 (стр. 56-57) различить кривые, обозначенные как серая и оранжевая, хотя их можно было бы дать сплошной и прерывистой или другими способами.

Так же трудно определить принадлежность кривых отдельным препаратам на рис. 39-42 (стр. 83-85). Приходится сопоставлять графики с табличными данными.

Стремление автора идти в ногу со временем приводит к тому, что единицы микромолей на графиках 37 и 38 (стр. 80-81) даны в тысячах наномолей, а в табл. 2 (стр. 162) время дано в десятках тысяч секунд, хотя в остальных таблицах – в часах.

На рис. 58 (стр. 136) приведена модель тромба в виде эллипсоида – тела вращения, а в подписи значится как «эллипс», что не одно и то же.

Ссылки 142 и 146 совпадают. Относительно оформления ссылок. Знаки препинания, особенно, точка, живут особой жизнью. Во многих ссылках точек не хватает. Не выдержано по ходу ссылок употребление имён и инициалов.

Не аргументировано - почему дана ссылка на известную книгу Л.Полинга «Природа химической связи» на английском языке, хотя есть издание на русском? Что нового в 3-ем издании 1960 года по сравнению с предыдущими?

Традиционные замечания относительно выводов. Выводы, как и в большинстве защищаемых диссертаций, отличаются констатирующим уклоном, а именно, - перечислением того, что было сделано. Это раздел логичнее было бы называть «Основные результаты»

Вывод 1: «Проведено моделирование структуры потенциального ингибитора DD217 в пространстве, покрытом патентной формулой с использованием текстовой нотации для структур SMILES. Найдены вещества-кандидаты, обладающие антикоагулянтными свойствами». Можно было бы изложить в следующей редакции: «Моделирование структуры потенциального ингибитора DD217 в пространстве, покрытом патентной формулой с использованием текстовой нотации для структур SMILES, позволяет найти вещества-кандидаты, обладающие антикоагулянтными свойствами».

Выводы 2-4 необходимо объединить, например, следующим образом: «Синтезированных реакцией амидирования 18 новых структурных аналогов вещества DD217, диамидов

различного строения (мочевин и амидинов), оказалось достаточным для выявления при фармакологическом скрининге 7 веществ-кандидатов на соединение-лидер наиболее перспективных антитромботических препаратов. Изучена активность этих веществ *in vitro* по отношению к ФХа и определена концентрация, удваивающая время свертывания на плазме человека».

Конечно, сделанные замечания снижают уровень достоинств диссертации, но никак не отражаются на достоверности, научной и практической значимости результатов, уровне выполнения работы, а относятся, в первую очередь, к недочётам оформления большого массива полученных автором результатов.

Относительно автореферата, который достаточно полно передаёт содержание диссертации, необходимо отметить, что структуры соединений в табл. 1 не воспринимаются невооружённым взглядом. Рассмотреть мочевиный фрагмент практически невозможно. Рациональнее было бы привести общую формулу, а в столбце два указать заместители. Это же относится и к рисунку 3. Не расшифрована аббревиатура МНО (международное нормализованное отношение), что затрудняет восприятие раздела автореферата.

### **Заключение**

**О степени достоверности результатов:** строение всех полученных соединений было подтверждено широким спектром современных физико-химических методов анализа, включающих спектроскопию ядерного магнитного резонанса, масс-спектрономию высокого разрешения. В свою очередь, биологическая активность полученных соединений измерялась согласно стандартным российским протоколам и подтверждается статистически значимой воспроизводимостью экспериментальных данных, полученных в ходе работы.

**Об апробации результатов:** основные материалы диссертации были представлены в виде тезисов докладов на «5 Международном форуме антикоагулянтной + антиагрегантной терапии (ФАКТplus2020)» и I Международной научно-практической конференции «Медико-биологические и нутрициологические аспекты здоровьесберегающих технологий» и обсуждались со специалистами при получении разрешения на клинические испытания.

**Соответствие паспорту специальности.** Диссертация соответствует паспорту специальности 1.4.16 – Медицинская химия по пяти пунктам, а именно:

1. Поиск, структурный дизайн и синтез соединений-лидеров – потенциальных физиологически активных (лекарственных) веществ, на основе: а) знания структурных параметров биомишени или особенностей патогенеза; б) анализа и модификации структур известных активных соединений; в) синтеза и биологического тестирования широкого разнообразия химических соединений,

2. Использование фундаментальных методов математической химии (компьютерного молекулярного моделирования QSAR) с целью прогнозирования возможности взаимодействия определенных химических соединений с предполагаемой биологической мишенью, а также для выявления взаимосвязи между химической структурой и физиологической активностью.

3. Оптимизация структуры соединения-лидера с целью повышения его активности и селективности и использование для этих целей создания аналогов по принципу трехмерного фармакофорного подобия).

4. Оптимизация структур химических веществ с целью улучшения их комплексных физико-химических, фармакокинетических и фармакодинамических характеристик,

6. Биологическое и физиологическое (*in vitro* и *in vivo*) тестирование сконструированных и синтезированных соединений на предмет изучения особенностей их взаимодействия с молекулярными мишенями организма.

Таким образом можно заключить, что диссертация идеально соответствует паспорту специальности 1.4.16 – Медицинская химия.

С другой стороны, автореферат и приведенные в нем публикации в полной мере отражают существо диссертационной работы.

Считаю, что по своей актуальности, научной новизне, практической значимости, достоверности результатов и обоснованности выводов, проведенное диссертационное исследование **«Синтез и исследование фармакологической активности новых ингибиторов фактора Ха»** соответствует требованиям, установленным пунктами 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 в действующей редакции), а ее автор, Церковникова Наталья Андреевна, **заслуживает** присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.16 — медицинская химия за вклад в разработку нового потенциального лекарственного препарата - антикоагулянта, проходящего 2-ю и 3-ю стадии клинического испытания. DD217, концентрация которого  $\geq 1,7$  мкМ в плазме крови человека определяет терапевтический диапазон, когда анти-ФХа активность плазмы составляет более 0,3 ЕД, что соответствует уровню современных антикоагулянтов ингибиторов фактора Ха и даже несколько превосходит их.

Оценено  
выдано  
форм. прова. не  
ленки. элем.

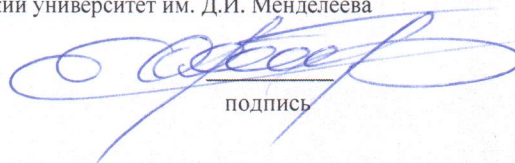
Официальный оппонент:

доктор химических наук, профессор,

профессор кафедры химии и технологии биомедицинских препаратов

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева

**Офицеров Евгений Николаевич**



ПОДПИСЬ

Дата: 15.11.2021

Контактные данные:

тел.: 8-917-590-55-45; e-mail: ofitser@mail.ru

Специальности, по которым официальным оппонентом защищена диссертация: 02.00.08 - химия элементоорганических соединений.

Соп. ля из. ценя.

Адрес места работы: г. Москва, Миусская пл. д.9. РХТУ им.Д.И.Менделеева

Тел.: 8-499-978-61-32 e-mail: eofitserov@muctr.ru

Подпись сотрудника Офицера Е.Н. удостоверяю

Евгений Сергеевич



(И.К. Камелин)