

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор ФГБОУ ВО
ВолгГМУ Минздрава России
д.м.н., проф. Стаценко М.Е.



« 19 » _____ 2021 г.

ОТЗЫВ

Ведущей организации на диссертационную работу **Церковниковой Натальи Андреевны** на тему: «Синтез и исследование фармакологической активности новых ингибиторов фактора Ха», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.16 Медицинская химия.

Диссертационная работа Церковниковой Натальи Андреевны на тему: «Синтез и исследование фармакологической активности новых ингибиторов фактора Ха» посвящена синтезу и изучению ингибирующей способности новых веществ, кандидатов на лекарство-антикоагулянт, относящихся к классу прямых ингибиторов фактора Ха (ФХа). При этом были решены следующие задачи:

- поиск и предсказание 263 структур, которые продемонстрировали энергию связывания (оценка AutoDock) большую или равную, чем вычисленная энергия для структуры DD217;
- синтез и проведение экспериментов по изучению ингибирующей способности 18-ти новых веществ, прямых ингибиторов ФХа, позволившие

- выбрать соединение-лидер;
- изучение специфической фармакологической активности перорального антикоагулянта DD217 на различных моделях *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*;
- поиск, дизайн и синтез метаболитов DD217;
- изучение специфической фармакологической активности метаболита DD217 *in vitro*.

Актуальность темы. По данным ВОЗ сердечно-сосудистые заболевания занимают ведущие место в причинах смертности населения стран с высоким и средним уровнем развития и благополучия. В причинах смертности от сердечно-сосудистых заболеваний тромбозы занимают по некоторым оценкам до 70% всех случаев. Естественный процесс гемостаза необходим для предотвращения опасных для жизни обширных кровотечений. Однако нарушение регуляции гемостаза может привести к опасной патологии, называемой тромбозом, которая характеризуется нежелательным образованием потенциально смертельного сгустка крови внутри вены или артерии. Тромбоз глубоких вен и артерий связан с тромбозом, которая, в свою очередь, вызывает серьезные сердечно-сосудистые нарушения: инфаркт миокарда, ишемический инсульт и ишемию периферических артерий. Учитывая высокий уровень смертности и экономические потери, связанные с тромбозом, имеющиеся в настоящее время меры по профилактике тромбоза недостаточны и указывают на необходимость разработки новых антитромботических препаратов.

Антикоагулянты – это терапевтические препараты, применяемые как для профилактики тромбообразования, так и для лечения, так как препятствуют образованию нитей фибрина, их полимеризации и, соответственно, приводят к прекращению роста уже образованного тромба. В отличие от антиагрегантов (лекарственные средства, ингибиторы агрегации тромбоцитов, типичным представителем которых является ацетилсалициловая кислота), антикоагулянты препятствуют образованию вторичной гемостатической пробки, тем самым создавая лучшие условия для

разрушения образовавшихся тромбов через действие фибринолитиков. Высокий риск тромбообразования у больных с мерцательной аритмией, а также у пациентов, перенесших инсульт и/или инфаркт. Список показаний к применению антикоагулянтов включает в себя использование в хирургии для предупреждений образования тромбов как во время операций, так и в раннем и позднем послеоперационном периоде, эти препараты используют для профилактики осложнений при атеросклерозе коронарных и церебральных артерий, тяжелой сердечной и дыхательной недостаточности. В соответствии с Рекомендациями МЗ РФ антикоагулянты в обязательном порядке показаны пациентам с диагнозом COVID-19 (off-label). Кроме этого, антикоагулянты в последнее время используют как средство профилактики смерти вследствие сердечно-сосудистых причин у больных ишемической болезнью сердца или заболеваниями периферических артерий.

Современная терапия тромбоза, основанная на антикоагулянтах, требует разумного подхода, т.к. возможны ситуации, когда она предотвращает свертывание крови в случаях, когда требуется свертывание (например, травма или хирургическое вмешательство), тем самым вызывая опасный для жизни побочный эффект внутреннего кровотечения. Помимо внутреннего кровотечения, клинически применяемые антикоагулянты обладают рядом недостатков. Гепарины, например, могут вводиться только в виде инъекций, имеют короткий биологический период полураспада и могут вызывать гепарин-индуцированную тромбоцитопению. Антагонисты витамина К (например, варфарин) проявляют узкое терапевтическое окно, взаимодействуют с рядом лекарств и продуктов питания, оказывают медленное начало/ослабление действия и вызывают кумарин-индуцированный гепатит. Напротив, прямые пероральные антикоагулянты (препараты класса ПОАК), такие как прямые ингибиторы тромбина (например, дабигатран) и ингибиторы ФХа (например, ривароксабан, апиксабан), демонстрируют быстрое начало/ослабление действия и предсказуемую фармакокинетику. Однако, как сообщается, даже эти новые

препараты могут вызывать опасные для жизни кровотечения. Поэтому для борьбы с тромбозом без риска кровотечения необходимы новые антикоагулянты.

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.

Одним из возможных подходов к снижению риска развития кровотечения может быть поиск биологически активных веществ с высоким сродством и избирательностью действия к белкам, участвующим в гемокоагуляции. Это позволило бы использовать низкие дозы препарата и, соответственно, снизить возможное побочное действие. Еще одним критерием при разработке эффективного антитромботического препарата является создание лекарственного средства для перорального применения.

Структура и содержание диссертационной **работы**. Представленная автором диссертационная работа оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ. Структура и объем диссертации соответствуют требованиям, предъявляемым к квалификационным работам. Диссертационная работа написана по стандартной структуре и состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка литературы, списка использованных сокращений. Материал диссертации изложен на 161 страницах машинописного текста, включает 58 рисунков, 18 таблиц, приложения. Список цитируемой литературы насчитывает 175 источников.

Во введении Церковникова Н.А. обосновывает актуальность направления диссертационного исследования, его научную и практическую значимость. Поставленная цель, а также сформулированные на ее основе задачи исследования дают ясное представление о направлении выполненного исследования.

Литературный обзор включает в себя описание теоретических основ и процедур, применяемых при поиске биологически-активных веществ, hit-to-lead оптимизации таких веществ до кандидатов в лекарственные средства, механизма действия антикоагулянтов на фактор Ха и обзор различных типов ингибиторов фактора Ха. Также в обзоре представлено сравнение наиболее часто используемых в медицинской практике антикоагулянтов.

Обзор хорошо структурирован и логично представлен в соответствии с целью и задачами, поставленными в работе. На основании проведенного анализа литературных данных Церковникова Н.А. делает вывод о том, что в настоящее время вопрос поиска новых антикоагулянтов с необходимым балансом эффективности и риска очень актуален. Основной задачей является поиск наиболее безопасного соединения.

Глава 2 (обсуждение результатов) посвящена рассмотрению результатов исследований, проведенных Церковниковой Н.А. в рамках своей диссертационной работы. В этом разделе описываются результаты применения расчётных методов для сужения числа потенциальных кандидатов при поиске оптимальной молекулы, что чрезвычайно важно с точки зрения экономии времени и других ресурсов при их синтезе. Автор приводит методики синтеза полученных в результате 18-ти новых веществ (9, относящихся к классу амидинов и 9 – к классу мочевинов) и данные исследования их биологической активности, как возможных кандидатов в лекарства-антикоагулянты. Также для поиска новых активных веществ был применен анализ метаболитов одной из полученных ранее активных субстанций, уже подтвердивших свою активность. Предсказанный метаболит был синтезирован и его биологическая активность определена. В завершающей части обсуждения результатов автором приведены результаты исследования влияния препарата на некоторые рецепторы, определяющие лекарственную зависимость.

В главе 3 автор перечисляет использованные материалы, дает ссылки на использованные в *in-silico* расчетах программные средства, а также

подробно описывает методики определения биологической активности синтезированных веществ *in-vitro* и *in-vivo*.

Глава 4 (экспериментальная часть) состоит из трех частей. В первой части автор подробно описывает численные методы, примененные для поиска и предсказания активности новых молекул, ингибиторов фактора Ха, каким образом поэтапно число возможных кандидатов было сокращено с 10^{13} до 263 структур. Во второй части приведены методики получения всех новых веществ, ссылки на которые имеются в работе. Для получаемых продуктов и полупродуктов приведены их спектральные данные ЯМР ^1H , а также данные масс-спектрометрии. Третья часть данного раздела посвящена описанию многостороннего изучения специфической фармакологической активности наиболее активного полученного кандидата *N*-(5-хлорпиридин-2-ил)-2-({4-[этанамидоил(метил) амино]бензоил}-амино)-5-метилбензамида (кратко именуемого – DD217), а также синтезированного метаболита. Описаны результаты экспериментов на стандартных *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* моделях, применяемых при изучении антикоагулянтов.

Выводы четко сформулированы и полностью отражают результаты, полученные в рамках выполнения данной диссертационной работы.

Автореферат представляет собой сжатое изложение результатов диссертации Церковниковой Н.А. и полностью соответствует диссертационной работе.

Научная повизна и практическая значимость работы. В процессе поиска производных вещества DD217 с использованием подхода SAR был проведен виртуальный скрининг на пространстве молекул, ограниченных формулой Маркуша из п.1 патента EA015918.

Впервые синтезированы, охарактеризованы физико-химическими методами 18 амидов различного строения, из которых 9 мочевины и 9 амидинов и изучена их биологическая активность *in vitro* и *in vivo*.

Впервые спрогнозирована структура возможных метаболитов DD217, один из которых затем был синтезирован и охарактеризован физико-химическими методами и изучена его биологическая активность *in vitro*.

Впервые изучена ингибирующая способность полученных производных по отношению к фактору Ха.

Впервые показано, что метаболиты DD217 обладают антикоагулянтными свойствами и могут представлять интерес, как потенциальные лекарства-антикоагулянты.

Впервые исследована специфическая фармакологическая активность DD217 и доказано, что это вещество является лекарством-антикоагулянтом.

По результатам данной работы получен патент Евразийской патентной организации.

Результаты работы имеют огромное практическое значение. Необходимо отметить, что препарат на основе DD217 сейчас находится на стадии клинических испытаний (2-я и 3-я фаза) и часть проведенных автором исследований (изучение специфической фармакологической активности DD217) входит в обязательные при подаче регистрационного досье на лекарственный препарат для получения разрешений на проведение клинических исследований, а в дальнейшем - регистрационного удостоверения. Автором закрываются возможные пробелы в обеспечении патентной защиты разрабатываемого препарата DD217. Кроме этого, результатом работы стало уточнение механизма наиболее прочного связывания малых, наиболее перспективных молекул с сайтом связывания белка ФХа.

Достоверность полученных результатов обеспечивается большим количеством проведенных экспериментов и их хорошей воспроизводимостью. Биологическая активность полученных соединений измерялась в соответствии со стандартными протоколами и подтверждается статистически значимой воспроизводимостью экспериментальных данных, полученных в ходе работы, а также публикацией основного содержания

работы в рецензируемых международных научных журналах. Диссертация содержит большое количество экспериментального материала, выводы обоснованы и логически вытекают из полученных результатов.

Основное содержание работы отражено в 2 статьях по теме диссертации, опубликованных в рецензируемых научных зарубежных журналах, 2 тезисов докладов научных международных конференций, патента Евразийской патентной организации.


Принципиальных замечаний по работе нет.


Заключение по работе. Диссертационное исследование Церковниковой Н.А. является завершённой научной работой, выполненной на высоком теоретическом и экспериментальном уровне. Основные результаты и выводы работы логичны, сделаны на обширном экспериментальном материале и не вызывают сомнений. Работа по своей актуальности, научному уровню, объёму выполненных исследований, новизне полученных результатов и их значимости для фундаментальной науки и практики полностью удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук в соответствии с пунктами 9-14 «Положения о 2016 г. № 335), а её автор, Церковникова Н.А., заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.16 Медицинская химия.

Отзыв подготовлен доктором медицинских наук (по специальности 14.03.06 — фармакология, клиническая фармакология), научным руководителем Научного центра инновационных лекарственных средств, заведующим кафедрой фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ академиком РАН Спасовым А.А. и зав. лабораторией информационных технологий в фармакологии и компьютерного моделирования лекарств НЦИЛС ВолгГМУ доктором биол. наук профессором Васильевым П.М. .

Отзыв рассмотрен и утвержден на заседании кафедры фармакологии и биоинформатики Федерального государственного бюджетного

образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» министерства здравоохранения Российской Федерации протокол № 5 от 18.10. 2021 г.


Зав.кафедрой акад.РАН Спасов А.А.


Зав.лабораторией проф.П.М.Васильев
Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего образования
«Волгоградский государственный медицинский
университет» министерства здравоохранения Российской
Федерации

Юридический адрес ведущей организации:
400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов,
1,ком.2-01
Тел.: +7 (8442)_38-30-28_____

e-mail: aspasov@mail.ru_____

Подписи Спасова Александра Алексеевича и Васильева Павла Михайловича
заверяю: Учёный секретарь Учёного совета ФГБОУ ВО ВолгГМУ, заслуженный
деятель науки РФ

Д.м.н., профессор





Воробьев А.А.