

ОТЗЫВ

на диссертационную работу Веремеевой Полины Николаевны
на тему «СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ АМФИФИЛЬНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ 3,7-
ДИАЗАБИЦИКЛО[3.3.1]НОНАНА», представленную на соискание
ученой степени кандидата химических наук
по специальности 02.00.03 – Органическая химия

Рецензируемая диссертация **Веремеевой Полины Николаевны на тему «СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ АМФИФИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ 3,7-ДИАЗАБИЦИКЛО[3.3.1]НОНАНА»** представляет собой законченную научно-квалификационную работу, выполненную в актуальной области и посвященную разработке новых средств доставки и регулируемого освобождения действующих веществ готовых лекарственных средств.

Многие используемые в настоящее время субстанции проверенных временем препаратов обладают рядом недостатков, которые можно ликвидировать путём использования технологически доступных, основанных на дешевом исходном сырье и обладающих целым набором практически значимых свойств и имеющих перспективы утилитарного использования «молекулярных переключателей», встроенных в липосому, и работающих за счет конформационных перестроек молекул под действием третьих факторов.

В последнее десятилетие развиваются различные направления разработки и производства как отечественных субстанций, так и готовых лекарственных средств в рамках программы «Фарма-2020». При этом упор сделан на доступные по сырью препараты-дженерики или их аналоги, на разработку которых выделяется финансирование по статье НИОКР.

В целях облегчения процесса внедрения, уменьшения доклинических и клинических исследований, которые съедают львиную долю финансирования, западные фирмы уже давно обращаются к известным, хорошо зарекомендовавшим веществам, применение которых не выявило негативных последствий, и на их основе разрабатываются новые ГЛС. Именно это направление и было выбрано для проведения диссертационного исследования.

Оппонент с удовлетворением отмечает, что поднятый вопрос нашел решение в рецензируемой работе. Использование в качестве синтона «конформационных переключателей» соединений на основе диазабицикло[3.3.1]нонана и его производных позволяет целенаправленно создавать эффективные препараты с высокими характеристиками, поэтому диссертационная работа, выполненная Полиной Николаевной, представляется обоснованной и необходимой.

Цель работы. Автор формулирует цель работы следующим образом: синтез липидоподобных амфифильных соединений на основе 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана, способных встраиваться в липосомальную мембрану, претерпевать конформационные перестройки при добавлении водного раствора соли двухвалентной меди и протонировании, тем самым повышая проницаемость липидного бислоя, что обеспечивает управляемое выделение веществ, находящихся во внутреннем объеме липосом. Такая формулировка цели соответствует названию работы. На самом деле, рецензент считает необходимым отметить, что содержание квалификационной работы и полученные результаты, несомненно, шире заявленной тематики. Название работы «СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ АМФИФИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ

ПРОИЗВОДНЫХ 3,7-ДИАЗАБИЦИКЛО[3.3.1]НОНАНА» слишком узкое и не отражает в полной степени новизны полученных результатов и индивидуальности работы.

Актуальность и научная новизна. Что же касается содержания квалификационной работы и ее научной новизны, то в данном случае могут возникнуть замечания и возражения, если содержание работы оценивать, опираясь только на укоренившиеся рамки требований к такого уровня работам, например, «получено количество новых соединений оригинальными способами в 5-10 стадий, что отражает высокое синтетическое мастерство диссертанта». Если мы будем подходить ко всем работам с такими мерками, то не сможем решить поставленной Президентом и Правительством России задачи обеспечения лекарственной безопасности страны. Девяносто девять процентов защищаемых в настоящее время работ по синтезу новых биологически активных соединений не выйдут в промышленное производство в силу отсутствия промышленной базы исходных химических соединений, сложности используемых катализаторов и/или многостадийности.

Поэтому все попытки синтеза новых соединений, которые могут быть легко трансформированы либо в субстанции ГЛС, либо способствуют повышению их эффективности, простыми синтетическими методами, опираясь на доступное сырье, необходимо признать актуальными и важными с точки зрения национальных интересов, которые в настоящий момент для России так же высоки, как и интересы развития науки.

Оппоненту нет необходимости вымучивать и выискивать доводы, заниматься надуманным обоснованием актуальности и необходимости данного исследования. Даже беглый анализ состояния проблемы создания новых препаратов показывает, что буквально в последние годы практически все фармацевтические монстры Швейцарии, США, Германии, Франции, Японии, Тайваня, Индии и Китая, такие как Novartis AG, BASF SE, L'OREAL, Astra Zeneca AB, Fuji Yakuhin Co, National Taipei University of Technology, интенсивно занимаются совершенствованием известных ГЛС именно путем нанокapsулирования, регулирования выделения действующих веществ, созданием адресной доставки.

В ходе выполнения диссертационной работы были разработаны методы синтеза 3,7-диалкил-, 3,7-диацил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-онов и 3,7-диалкил-1,5-динитро-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанов с длинными алкильными заместителями при атомах азота, показана возможность их встраивания в липидный бислой. Данный класс соединений, как показано в работе, может использоваться в качестве «молекулярных переключателей» за счет конформационных перестроек молекул. Было обнаружено увеличение проницаемости липосомальной мембраны со встроенными 3,7-диалкил-1,5-динитро-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанами и 3,7-диалкил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло-[3.3.1]нонан-9-онами при изменении pH среды, а именно при закислении внешнего раствора.

Следует отметить, что для липосом, модифицированных 3,7-диалкил-1,5-динитро-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанами, интервал pH, в котором происходит увеличение проницаемости липосомальной мембраны смещен в более кислую область по сравнению с липосомами, модифицированными 3,7-диалкил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-онами, и процент вытекания раствора хлорида натрия при pH 5 приблизительно на 10% выше за один и тот же период времени. Образование комплекса Cu^{2+} с 3,7-диалкил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-онами оказывает влияние на упаковку липидов в бислое, резко повышая его проницаемость, тем самым приводя к высвобождению инкапсулированных веществ.

Перечисление сделанного и полученного автором диссертационной работы, необходимо привести в самом начале по следующим причинам:

- во-первых, работа может не сразу найти понимание в среде химиков-синтетиков, традиционно полагающих, что синтез ради синтеза оправдывает затраченные усилия. Однако против такого подхода протестовал еще А. М. Бутлеров;

- во-вторых, как правило, достижение поставленной цели требует комплексного решения проблемы и привлечения не только синтеза, но и дополнительных методов; такой подход находит в последнее время всё больше последователей, так как соответствует требованиям практики;

- в-третьих, работа становится междисциплинарной, что современно, но находит оппонентов среди апологетов узкой специальности.

Рецензент считает такой подход, направленный на решение проблемы, а не просто на синтез отдельных соединений, как это происходит в комбинаторике, несомненным достоинством работы. Одновременно, такой подход содействует расширению кругозора диссертанта и увеличивает его конкурентную способность на рынке труда. Специалист, освоивший наряду с основами органического синтеза ряд дополнительных и смежных методик и методов, ценится выше.

Когда ставится конкретная задача по синтезу определенных соединений даже по стандартным, описанным методикам, не всегда она легко решается и достижима, и это также должно учитываться при анализе работы. Наглядным подтверждением служит работа П. Н. Веремеевой по синтезу диазабициклононанов с высшими алкильными или ацильными заместителями. Переход в зону амфифильных соединений практически всегда приводит к трудностям при выделении соединений в чистом виде, и необходимо высокое синтетическое мастерство и профессионализм при решении этой проблемы. П. Н. Веремеева справилась с поставленной задачей и этим подтвердила свой высокий профессиональный уровень. Достаточно указать на выделение продуктов, образующихся с выходом не выше 3%.

Рецензируемая работа интересна и в историческом аспекте. Более сорока лет тому назад Н. С. Зефирова с сотрудниками активно занимался конформационным анализом производных бициклононана и его гетероаналогов. Часть работ была обобщена в виде кандидатской диссертации В. А. Палюлиным. Понадобилось более 30 лет, чтобы сделать следующий шаг – трансформировать полученные знания в новые интересные идеи по «конформационным переключателям» высвобождения действующих веществ из липосом, реализация которых обеспечивает научную новизну и практическую значимость работы.

Потенциальная практическая значимость. Впервые показана возможность использования доступных и дешевых производных 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана в качестве молекулярных переключателей освобождения действующих веществ или субстанций препаратов широкого спектра действия.

Учитывая сложившийся в РФ рынок можно ожидать, что при активной позиции авторов высока вероятность вхождения в Программу «Фарма-2020» с одним из синтезированных автором соединений, так как все необходимые предпосылки для этого есть. Остается защитить интеллектуальную собственность, найти соинвесторов и на новой платформе продолжать внедрение полученных результатов.

Реализованная практическая значимость. Предложенные или усовершенствованные автором методики позволяют получать целевые соединения с высоким выходом, в частности, выход соединения 9 с использованием в синтезе дициклогексилкарбодиимида (DCC) и 1-гидроксibenзотриазола (HOBT) на 21% выше описанного.

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Во-первых, необходимо отметить многофакторность проблемы. П. Н. Веремеева вынуждена была проводить сравнительную количественную оценку активности соединений, условий среды, вида катиона, и при этом подтверждать методами математической обработки достоверность разницы как между контролем и опытом, так и между сравниваемыми значениями одного фактора.

Необходимо отметить и грамотное использование автором таких понятий как новое соединение, субстанция, препарат, кашу и путаницу из которых часто встречаем

не только на страницах диссертаций, посвященных синтезу новых биологически активных соединений, но и на пленарных докладах конференций высокого ранга.

Замечания по работе. Как и всякая экспериментальная работа, связанная с получением и обсуждением нового, она не лишена определенного числа недочетов, описок, неточностей, которые приводятся ниже. Однако необходимо отметить, что принципиальных ошибок рецензенту обнаружить не удалось. Среди замечаний можно отметить следующее.

Так, на стр. 44 неточность в написании второй схемы. Автор на протяжении всей экспериментальной части упорно считает, что состав устанавливается данными масс-спектра высокого разрешения (стр. 49).

На стр. 58 можно прочитать следующее: «Варьируя время проведения реакции и температуру, мы установили, что **реакция проходит полностью** при кипячении и интенсивном перемешивании в течение 12 часов **с выходом 40%**. (стр. 58).

Удивляет описание ИК-спектра на стр. 60. «В ИК-спектре 1,5-диметил-3,7-дипентадецил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-ола **31** имеется полоса 2930 см⁻¹». А где полосы ОН-группы, связанной внутримолекулярными водородными связями? С сожалением должен констатировать, что с появлением и доступностью различных видов ЯМР-спектроскопии ИК-спектроскопия незаслуженно игнорируется, хотя во многих случаях она может дать информацию, не доступную другим методам.

Для получения дополнительных сведений о модифицированных 1,5-динитро-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанами липосомах автор провела их титрование раствором поли-(4-стиролсульфонатом) натрия (ПСС натрия). Однако описание соответствующего рисунка и проведенные кривые регрессии неоднозначны.

Дискуссионна схема 4. Указанные на ней конформации находятся в противоречии с написанным на стр. 79: «С целью дополнительного исследования возможного механизма образования пор в липосомах при изменении конформации КВ-КК нами были проведены эксперименты с соединением **20**, 3,7-дидодецил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонаном, которое и в щелочной, и в кислой среде по литературным данным существует в конформации КК. Для исследования проницаемости липосом, модифицированных соединением **20**, в зависимости от рН среды использовали метод кондуктометрии. Проведенные эксперименты показали, что в исследованном интервале рН 10 – 5 из внутреннего объема липосом не вытекает хлорид натрия, что свидетельствует об отсутствии дефектов в липидном бислое. Так как при протонировании одного из атомов азота изменения конформации данного соединения не происходит, то не происходит и движения длинных алкильных заместителей, ведущего к нарушению целостности мембраны».

Относительно аптамеров (стр. 32) необходимо добавить, что в настоящее время получены их производные, устойчивые к действию нуклеаз, а с другой стороны, они уже вышли на фармацевтический рынок.

Есть недочеты и при оформлении ссылок:

69. Levina O.I., Potekhin K.A., Kurkutova E.N., Struchkov Yu.T., Zefirova O.N., Palyulin V.A., Zefirov N.S. The crystal and molecular-structure of 3,7-dimethyl-1,5-diphenylbispidone-9-copper (II)chloride 1-1 complex. // *Doklady Akademii nauk SSSR*. 1986. v. 289. n. 4. pp. 876-879.

70. Comba P., Kerscher M., Schiek W. *In Prog. Inorg. Chem.* Hoboken. 2007. v. 55. pp. 613-704. Hancock R.D., Patrick G., Wade P.W., Hosken G.D. Structurally reinforced macrocyclic ligands. // *Pure and Appl. Chem.* 1993. v. 65. n. 3. pp. 473-476.

99. Osterhaut W.J.V. Some Fundamental Properties of Cellular Physiology. // *Yale University Press*. New Haven. 1927.

100. Геннис Р. Биомембраны. Молекулярная структура и функции. // М.:1997. с. 627.

102. Samoshina N.M., Lui X., Brazdova B., Franz A.H., Samoshin V.V., Guo X. Fliposomes: pH-sensitive Liposomes Containing a *trans*-morpholipocyclohexanol-Based Lipid That

Performas a Conformational Flip and Triggers an Instant Cargo Release in Acidic Medium. // *Pharmaceutics*. 2011. v. 3. pp. 379-405.

122. Гончаров А.В., Потехин К.В., Стручков Ю.Т., Светланова А.Н., Чемоданова С.В., Палюлин В.А., Зефирова Н.С. // *ДАН*. 1992. т. 323. сс.285-289.

130. Davydov D. A., Yaroslavova, E. G., Rakhnyanskaya A. A., Efimova A. A., Ermakov Y. A., Menger F. M., Yaroslavov A. A. // *Langmuir*. 2009. v. 25. pp.13528-13533

Лампрехт А. Нанолечение: концепции доставки лекарств в нанонауке. // *М: Научный Мир*. 2010

Остались без внимания рисунки, приведенные на стр. 32-33, 37.

Некоторые выводы на самом деле являются констатацией полученных фактов. Так, например, можно было бы объединить выводы 1 и 3 следующим образом: «На основе разработанных методов синтеза получены 3,7-диалкил- и 3,7-диацил-1,5-диметил-3,7-дизабицикло[3.3.1]нонан-9-онов с длинными алкильными заместителями при атомах азота, которые встраиваются в липидный бислой без нарушения целостности липосом».

Сделанные замечания не влияют на общее благоприятное впечатление от результатов комплексной по характеру работы и на суть изложения, хотя наличие предпосылок, повлекших за собой появление замечаний, есть следствие междисциплинарности темы, когда используются подходы и закономерности химии, фармакологии и биологии. Это всегда сложно для диссертанта.

В целом рецензируемая диссертация написана достаточно четко. Раздел «Обсуждение результатов» легко читается, достоверность полученных данных и предположений доказана достаточно надежно и не вызывает дискуссионного искуса к обсуждению.

Структура и объем работы. Диссертация построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 136 наименований. Работа изложена на 122 страницах печатного текста и содержит 4 схемы, 19 рисунков, 6 таблиц.

Апробация работы. Результаты работы автором докладывались на пяти научных форумах: Первой Российской конференции по медицинской химии (Москва, Россия, 2013), на Международной конференции "Frontiers in Chemistry" (Ереван, Армения, 2013), на кластере конференций по органической химии «Оргхим-2013» (Санкт-Петербург, Россия, 2013), на Всероссийских конференциях с международным участием «Ломоносов 2010, 2011» (Москва, Россия), на Международных конференциях «Менделеев -2011, 2012» (Санкт-Петербург, Россия).

Публикации. Основное содержание работы опубликовано в виде 3 статей в ведущих научных рецензируемых журналах и тезисов 7 докладов на конференциях.

Личный вклад автора. Автор участвовал в постановке целей и задач настоящей работы и проведении физико-химических исследований синтезированных соединений. Автором самостоятельно спланированы и проведены синтезы целевых соединений, выполнены эксперименты по их встраиванию в липидный бислой липосом и управляемому его разрушению, обобщены и интерпретированы полученные результаты, сформулированы выводы.

Автореферат достаточно полно отражает содержание работы.

Основные результаты, полученные автором, могут быть использованы в ИНЭОС им. А.Н.Несмеянова РАН, химических факультетах Санкт-Петербургского и Казанского университетов, РХТУ им. Д. И. Менделеева, других университетах и академиях, НИИ и иных организациях, занимающихся как исследованиями в области создания новых лекарственных средств и разработкой синтезов новых субстанций.

Заключение. В результате проведенного анализа представленной к защите работы можно сделать следующее заключение: рецензируемая диссертация

представляет собой законченную научно-квалификационную работу, отличающуюся научной новизной в части полученных принципиальных результатов по связи структуры с функциональной активностью и влияния катиона металла и протонирования на выход агрегированных в липосомах веществ, на фоне практической значимости как цели исследования, так и практической важности конечных продуктов.

Автореферат диссертации полностью передает основное содержание и выводы диссертационной работы.

Научно-квалификационная работа полностью соответствует паспорту специальности 02.00.03 – Органическая химия, а также требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», так как выполненная **Веремеевой Полиной Николаевной** диссертация на тему «СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ АМФИФИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ 3,7-ДИАЗАБИЦИКЛО[3.3.1]НОНАНА» позволила выявить условия синтеза, влияние строения полученных производных бициклононана на функциональную активность и соединения, имеющие перспективы внедрения на рынок фармацевтической продукции, что имеет значение для науки и практики. Полученные результаты являются вкладом не только в химию, но и в фармакологию, а **автор работы - Веремеева Полина Николаевна**, получившая в ходе выполнения исследований не только практические навыки по выбору методик синтеза, установлению структуры новых соединений физико-химическими методами, но и навыки работы с липосомальными контейнерами на основе синтезированных соединений, заслуживает присуждения ей искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03 – Органическая химия.

Официальный оппонент
д.х.н., профессор, декан факультета
химико-фармацевтических технологий
и биомедицинских препаратов
Российского химико-технологического
университета им. Д. И. Менделеева

Е. Н. Офицеров

Подпись Е. Н. Офицера удостоверяю,
Ученый секретарь Университета с.н. проф.



Т. В. Гусева