

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Фирсовой Алины Александровны «Разработка и валидация методик количественного определения физиологически активных веществ на основе камфоры, дегидроабиединовой и усниновой кислот для фармакокинетических исследований», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 - биохимия

Рецензируемая диссертационная работа Фирсовой Алины Александровны посвящена разработке методик количественного анализа низкомолекулярных соединений (потенциальных фармацевтических препаратов) и доведения этих методик до стадии валидации, когда достигаются необходимые параметры воспроизводимости, чувствительности, калибровки, подбора внутренних стандартов и ряда других. Это далеко не тривиальная задача, и от ее правильного, оптимального решения критически зависят результаты доклинических испытаний и дальнейший ход последующих разных фаз клинических испытаний с соответствующими корректировками. Поставленная правительством цель достигнуть лекарственной независимости подразумевает поиск и создание новых отечественных фармацевтических препаратов и важнейшей составляющей этих исследований является разработка аналитических методик количественного определения, на которых, в свою очередь, основаны исследования фармакокинетики, метаболизма, распределения веществ по органам, тканям, компонентам крови. Кроме того, правильно выбранные методы количественного анализа дают возможность оптимизировать терапевтическую схему для дальнейших исследований, точно подобрать необходимую дозу и найти оптимальную лекарственную форму.

Разработка и валидация биоаналитических методик с достаточной чувствительностью к целевому соединению и его предполагаемым метаболитам является сложной задачей для исследователей при проведении экспериментов *in vivo*. Основная трудность таких работ заключается в необходимости поиска оптимального способа пробоподготовки и условий анализа для количественного определения аналитов, которые должны удовлетворять жестким требованиям по валидации, предъявляемым к биоаналитическим методикам.

Диссертационная работа изложена на 157 страницах машинописного текста, содержит 63 рисунка, 25 таблиц и состоит из Списка специальных терминов и сокращений (2 стр.), Введения (9 стр.), трех глав: Литературного обзора (5 подразделов, заключение, 29 стр), Обсуждения результатов (4 основных раздела, 55 стр.) и Экспериментальной

части (32 подраздела, 21 стр.), Заключение, Выводов, Списка цитируемой литературы (174 литературных источника) и двух Приложений.

Во введении автор показывает актуальность и степень разработанности темы исследования, определяет задачи исследования (разработка и валидация методик количественного определения трех перспективных для фармацевтики соединений - камфецина, агента KS-389 (конъюгат дегидроабиетиламина и 1-адамантиламина) и агента OL9-116 (конъюгат усниновой кислоты и 4-(3-аминопропил)-2,6-ди-трет-бутилфенола) в плазме крови и других органах мышей с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС), научную новизну исследования и теоретическую и научно-практическую значимость, основные положения, выносимые на защиту, методологию и методы исследования, а также личный вклад автора и связь результатов диссертационной работы с внедрением результатов. На примере литературных данных автор раскрывает большое значение природных соединений и их аналогов в современной фармацевтике. Фармакокинетические исследования основываются на определении концентрации активного вещества в биологических жидкостях и тканях органов с использованием физико-химических (инструментальных) методов анализа. В настоящее время для этого используются главным образом методы высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании и масс-спектрометрическими методами детектирования (ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-МС/МС), обеспечивающие высокую чувствительность, точность, быстроту и гибкость анализа. Основная трудность таких исследований в условиях проведения экспериментов *in vivo* заключается в сложности органических матриц и поиске оптимального способа пробоподготовки и условий анализа для количественного определения аналитов, которые должны удовлетворять жестким требованиям по валидации, предъявляемым к биоаналитическим методикам. В качестве объектов исследования автор обосновывает выбор трех полученных ранее в Лаборатории физиологически активных веществ НИОХ СО РАН образцов производных природных соединений, проявивших высокую биологическую активность в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Соединение камфецин показало высокую активность в отношении вируса гриппа A/H1N1, агент KS-389 и агент OL9-116 являются эффективными ингибиторами фермента репарации ДНК TDP1.

Целью данной работы, а фактически и задачами исследования являются разработка и валидация:

- методик количественного определения камфецина в плазме крови крыс с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС, исследование его распределения между компонентами крови в различных условиях, а также исследование стабильности образцов сухих пятен цельной крови, содержащих камфецин, при различных условиях хранения;

- методик количественного определения агента KS-389 в цельной крови, мозге, печени и почках мышей и исследование фармакокинетики и распределения агента в крови и органах мыши при однократном внутривенном введении в дозе 5 мг/кг;
- методик количественного определения агента OL9-116 в цельной крови, легких, печени и почках мышей, исследование фармакокинетики на мышах при однократном внутривенном и внутривенном введении в различных дозах и распределения в органах здоровых мышей и мышей с перенесенной карциномой легких Льюис.

В Главе 1 «Обзор литературы» автор рассматривает и детально обсуждает особенности применения масс-спектрометрии в доклинических исследованиях, методы обработки биологических образцов, методы гомогенизации тканей, классические методы пробоподготовки биологических образцов для анализа инструментальными методами (ВЭЖХ-УФ или МС/МС), современные методы микроэкстракции и делает выводы о важности биоаналитических методик в анализе фармацевтических препаратов в тканях и биологических жидкостях. Современные инструментальные методы анализа и методы обработки биологических образцов позволяют проводить детальное изучение новых препаратов.

В главе 2 «Обсуждение результатов» в первой части автор представляет описание результатов исследования противовирусного агента камфецина, а именно, оптимизацию ранее разработанной методики пробоподготовки сухих пятен крови, исследование стабильности камфецина в сухих пятнах крови, разработки и валидации методики анализа камфецина в плазме крови, исследование распределения камфецина между компонентами крови с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС.

Во второй части Главы 2 автор приводит результаты исследований фармакокинетики и распределения конъюгата дегидроабетиламина и 1-адамантиламина (KS-389), ингибитора TDP1, исследования стабильности KS-389 в образцах цельной крови, разработки метода пробоподготовки образцов цельной крови и тканей, валидации методик для количественного определения KS-389 в биологических матрицах, а также исследований фармакокинетики KS-389 и его распределения по органам.

В третьей части Главы 2 автор приводит результаты исследований фармакокинетики агента OL9-116, ингибитора TDP1 на основе урсеновой кислоты, описывает подбор хроматографических и масс-спектрометрических условий анализа, разработки методики пробоподготовки образцов цельной крови и исследование стабильности OL9-116 в цельной крови, валидации методики количественного определения OL9-116 в цельной крови, а также исследований фармакокинетики агента OL9-116 и исследований противоопухолевого эффекта OL9-116 в комбинации с

топотеканом в различных схемах на модели карциномы легких Льюис. Автором также были выполнены исследования распределения агента OL9-116 в органах, оптимизация условий хроматографического разделения, разработка протокола пробоподготовки образцов тканей легких, печени, почек, валидация методик количественного определения OL9-116 в легких, печени, почках, исследование распределения OL9-116 в легких, печени, почках здоровых животных и опухоленосителей.

В главе 3 «Экспериментальная часть» автор приводит данные о материалах, реагентах, оборудовании, рабочих растворах, экспериментальных животных, подготовке биологических образцов. Автор описывает эксперименты *in vitro*, куда включено приготовление градуировочных образцов и образцов контроля качества для биологических жидкостей, приготовление образцов при различных температурах, приготовление образцов с различными значениями гематокрита, приготовление образцов для изучения процессов сорбции, пробоподготовка образцов плазмы крови, цельной крови, образцов гомогенатов тканей и исследование стабильности агентов. В разделе «Аналитические методы» приведены условия анализа камфецина, KS-389 и OL9-116, данные по валидации методик количественного определения, градуировочная зависимость и нижний предел количественного определения, точность и прецизионность, степень извлечения и матричный фактор. В разделе эксперименты *in vivo* - приготовление лекарственных форм, исследование фармакокинетики и исследование распределения. Можно отметить, что экспериментальная часть проработана очень подробно и тщательно и несомненно может служить источником надежных методик и аналитических алгоритмов в дальнейших исследованиях.

Закключение и выводы полностью соответствуют поставленным целям диссертационной работы соискателя. Основные положения, выносимые на защиту, полностью выполнены автором и представляют из себя новые значимые научные результаты и данные, полученные и проанализированные автором самостоятельно.

Научная новизна, теоретическая и научно-практическая значимость исследования заключается в оптимизации методики количественного определения камфецина в сухих пятнах крови, что увеличило степень его извлечения из биологической матрицы и позволило снизить нижний предел количественного определения вещества. Впервые исследована стабильность образцов сухих пятен крови, содержащих камфецин, при различных температурах и показано, что для их длительного хранения и/или транспортировки необходима глубокая заморозка.

Автором впервые изучено распределение камфецина по компонентам крови в широком диапазоне концентраций. Показано, что распределение агента не зависит от

температуры и гематокрита, а его адсорбционные характеристики имеют обратимый характер. Эти результаты могут быть использованы для упрощения процедуры клинических испытаний.

Разработаны методики количественного определения агента OL9-116 в цельной крови и гомогенатах тканей легких, печени, почек мышей; агента KS-389 в цельной крови и гомогенатах тканей мозга, печени, почек мышей; камфецина в плазме крови крыс.

Впервые доказана способность KS-389 проникать через гематоэнцефалический барьер, что является важным для разработки препаратов вспомогательной терапии для лечения онкологических заболеваний, включая глиомы.

Автором показано, что внутрибрюшинное введение агента OL9-116 позволяет снизить дозу в 30 раз для достижения значений максимальной концентрации. Использование полученных данных повысило эффективность терапии карциномы легких Льюис в экспериментах *in vivo*.

Впервые было изучено распределение агента OL9-116 по органам при внутрижелудочном введении агента в группах здоровых мышей и мышей с карциномой легких Льюис. Установлено, что у здоровых животных значения максимальной концентрации вещества в органах выше, чем у опухоленосителей. Сделан вывод о необходимости дальнейших исследований для более глубокого понимания механизмов изменения фармакокинетики соединения OL9-116 в условиях протекания опухолевого процесса.

По материалам диссертации опубликованы тезисы 15 докладов, 5 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Результаты исследования докладывались на конференциях в виде 8 устных докладов.

Полученные результаты работы соискателя имеют значительную практическую ценность. Так, эти результаты вошли в цикл доклинических исследований камфецина, в итоге по результатам которых получено разрешение Министерства Здравоохранения РФ №160 от 17.04.2020 на проведение клинических испытаний вещества.

В целом, диссертация написана хорошим литературным языком, практически без опечаток, библиографические ссылки оформлены корректно, текст диссертации соответствует установленным правилам научного цитирования.

Существенных недостатков в представленной диссертационной работе нет. Можно отметить небольшую неточность автора, когда в разделе введения «Особенности применения масс-спектрометрии в доклинических исследованиях» автор указывает, что масс-спектрометрия как специфическая система обнаружения в течение нескольких лет

ограничивалась применением совместно с газовой хроматографией (ГХ). Скорее здесь нужно сказать «нескольких десятков лет».

Незначительные замечания также связаны с тем, что в тексте встречаются орфографические ошибки, примерно одна на две страницы.

По ходу текста автор приводит очень удачные адаптированные рисунки и схемы, наглядно раскрывающие смысл той или иной методики или процесса. Однако на стр. 38, Рис. 15 автор почему-то не стал переводить текст на русский язык. Почему?

На стр. 64, Рис. 30 значения масс ионов на структурной схеме и в спектре различаются, на схеме 171.2, в спектре 173.2; на схеме 284.2, в спектре 286.4. Хорошо бы, если бы автор объяснил это различие. На стр. 82, Рис. 44 значения масс на схеме и в спектре совпадают.

Высказанные замечания и небольшие недостатки не снижают общего положительного впечатления от диссертации и не вызывают сомнений в достоверности полученных А.А. Фирсовой результатов и обоснованности выводов.

Представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук диссертация Фирсовой Алины Александровны выполнена на высоком научном уровне и является завершенной научно-квалификационной работой. В работе содержится решение научной задачи, имеющей существенное значение для развития биохимии, в целом, эта работа по новизне, научной и практической значимости, объему и полученным результатам соответствует паспорту специальности 1.5.4 – биохимия и требованиям пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Фирсова Алина Александровна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4. - биохимия.

Официальный оппонент,

Дмитренко Павел Сергеевич

Доктор химических наук, специальность 1.4.9 – биоорганическая химия, член-корреспондент РАН, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук.

Контактные данные

Почтовый адрес: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного

отделения Российской академии наук, 690022, г. Владивосток, проспект 100-лет
Владивостоку, 159

Тел. +7 904 624 08 62

Электронная почта: paveldmt@piboc.dvo.ru

«18 » ноября 2025 г.

П.С. Дмитренко

Согласен на включение моих персональных данных в документы, связанные с
работой диссертационного совета, и их дальнейшую обработку.

Подпись Дмитренка П.С. заверяю:

Ученый секретарь ТИБОУ ДВО РАН.

К.Х.Н.



К.Л. Борисова

«18 » ноября 2025 г.