

УТВЕРЖДАЮ

И.о. Первого проректора -
проректора по научной
работе РУДН

В.А. Ромащенко



В.А. Ромащенко

« 14 » 01 2024 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации - Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» о значимости диссертационной работы Джайн Екатерины Александровны на тему «Стандартизация и фармакологическое изучение оригинального ненуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ-1 – VMU-2012-05», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальностям: 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология; 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационная работа Джайн Е. А. посвящена стандартизации и фармакологическому изучению оригинального ненуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ-1 – субстанции VMU-2012-05 и лекарственному средству (ЛС) на ее основе.

Актуальность темы диссертационного исследования обусловлена широким распространением одного из наиболее опасных для жизни человека заболеваний – синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД), этиологическим агентом которого является вирус иммунодефицита человека (ВИЧ). Борьба с ВИЧ-инфекцией является одной из приоритетных задач.

В настоящее время наиболее оптимальным методом лечения ВИЧ-инфекции является высокоактивная антиретровирусная терапия (АРВТ), подразумевающая одновременное использование нескольких веществ с различными механизмами действия: обязательно один или несколько лекарственных средств группы нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ) ВИЧ в сочетании с нуклеозидными ингибиторами обратной транскриптазы (ННИОТ) ВИЧ и/или ингибиторами других классов.

Однако, применение этих современных соединений имеет ограничения, наиболее серьезными из которых являются развитие резистентности, необходимость замены препаратов и возникающие побочные действия, что вызывает необходимость поиска новых соединений, обладающих анти-ВИЧ активностью как в отношении дикого штамма ВИЧ-1, так и в отношении резистентных изолятов вируса, с целью создания эффективных и малотоксичных ННИОТ ВИЧ, с профилями резистентности, отличающимися от существующих.

Связь работы с планом соответствующих отраслей науки и народного хозяйства

Диссертационная работа выполнена в рамках Государственного контракта Министерства образования и науки Российской Федерации на выполнение прикладных научных исследований № 14.N08.11.0154 от 02.06.2017 «Доклинические исследования лекарственного средства на основе пиримидинового производного бензофенона для лечения ВИЧ-1 инфекции».

Новизна исследования и полученных результатов

Изучена фармакодинамика субстанции – доказан механизм действия, изучена антиретровирусная активность на клеточных линиях, установлена дозозависимость фармакологического действия, определены параметры острой и субхронической токсичности, определена стартовая доза для проведения клинических исследований 1 фазы; проведено комплексное

изучение структуры субстанции, установлены показатели, определяющие качество субстанции и установлены нормы по каждому показателю, разработаны методики контроля качества субстанции для определения показателей «подлинность», «количественное определение», «родственные примеси»; разработана и валидирована ВЭЖХ методика, изучена стабильность лабораторных и опытно-промышленных образцов субстанции.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

В настоящее время в Российской Федерации зарегистрирован только один отечественный ННИОТ второго поколения - элсульфавирин (ESV) в качестве режима первой линии АРВТ в комбинации с двумя препаратами группы НИОТ для лечения больных ВИЧ-инфекцией и включенный в «Национальные рекомендации по лечению ВИЧ-инфекции, химиопрофилактике заражения ВИЧ». Таким образом, внедрение в клиническую практику новых отечественных антиретровирусных препаратов, производимых в РФ по полному циклу, является существенной научно-практической задачей фармации и фармакологии.

В диссертационном исследовании создан существенный научно-технический задел для дальнейшей разработки и клинического изучения оригинального отечественного нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы для лечения ВИЧ-инфекции. Относительная доступность исходных продуктов для синтеза, масштабируемая технология синтеза, наличие собственных стандартных образцов для контроля качества субстанции и готового лекарственного средства являются важными преимуществами разрабатываемого «лекарственного кандидата». Можно полагать, что последующее внедрение в клиническую практику разрабатываемого препарата позволит снизить затраты на обеспечение ВИЧ-инфицированных пациентов и повысить доступность лекарственной терапии для данной категории пациентов.

Полученные в результате настоящей работы данные вошли в состав регистрационного досье на оригинальный отечественный препарат для лечения ВИЧ-инфекции (акт внедрения № 15 от 20.05.2022).

Личный вклад автора

Автор диссертации непосредственно принимал участие на всех этапах осуществления работы, включая постановку целей и задач исследования; разработку плана исследований; планирование и реализацию экспериментов; обработку экспериментальных данных, их систематизацию и обобщение; формулировку общих выводов; написание публикаций по выполненной работе и внедрение результатов исследования.

Диссертант лично участвовал на этапах изучения механизма действия исследуемой субстанции VMU-2012-05 *in vitro*, выполнения токсикологических исследований субстанции и ЛС на ее основе.

Джайн Е. А. внесла существенный вклад в разработку проекта спецификации стандартного образца фармацевтической субстанции VMU-2012-05, а также в формирование нескольких подразделов регистрационного досье на оригинальный отечественный препарат для лечения ВИЧ-инфекции. Все главы диссертации и автореферат являются личным трудом автора.

Рекомендации по практическому использованию результатов и выводов диссертационного исследования

Использованные и апробированные в ходе диссертационного исследования подходы и методики изучения структуры, физико-химических свойств, контроля качества, оценки токсичности субстанций и ЛС на их основе могут быть использованы в учебном процессе высших учебных медицинских и фармацевтических заведений по дисциплинам «Фармакология» и «Фармацевтическая химия».

Полученные в процессе работы данные и сформулированные Джайн Е.А. выводы могут служить основой для дальнейших исследований сотрудниками медицинских и фармацевтических инновационных компаний

при разработке и получении разрешения на проведение клинических исследований оригинальных перспективных отечественных препаратов для лечения ВИЧ-инфекции.

Публикации по теме исследования

Результаты диссертационных исследований отражены в 11 печатных научных работах, включающих 7 статей в изданиях, входящих в «перечень ведущих научных журналов», рекомендуемых ВАК РФ, из них 5 статей в научных изданиях, индексируемых в международных базах Scopus, Web of Science, Pubmed, 4 публикации представлены в сборниках материалов всероссийских научных конференций, в том числе, с международным участием.

Содержание диссертации и ее завершенность

Диссертационная работа Джайн Е. А. построена традиционно и изложена на 237 страницах машинописного текста, включает 48 рисунков и 53 таблицы. Она состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (главы 2-4), общих выводов, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 283 источника, из них 211 иностранных и приложений.

Во *введении* обоснована актуальность выбранной темы, оценена степень разработанности темы исследования, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

В *обзоре литературы* (глава 1) содержится характеристика и классификация ВИЧ-инфекции – одной из актуальных проблем современной медицины. Представлено описание современных направлений антиретровирусной терапии и нерешенных вопросов применения лекарственных препаратов, определяющих высокую потребность в синтезе и внедрении в клиническую практику новых лекарственных средств. Рассмотрены подходы к созданию новых ННИОТ, которые соединяют

высокую антиретровирусную активность с низкой токсичностью и редкостью возникновения значимых лекарственных взаимодействий. Автор приводит характеристику нового класса ННИОТ – N-алкилзамещенные производные пиримидиновых и пуриновых оснований, содержащие терминальные ненасыщенные и ароматические фрагменты, обосновывая выбор в качестве объекта исследования вещество VMU-2012-05 с наибольшей величиной ингибиторной концентрации. Изложены этапы процесса контроля качества инновационного препарата - активной фармацевтической субстанции (АФС), требования к спецификации на АФС.

В *экспериментальной части* (глава 2) раскрываются материалы и методы, приводятся объекты исследования: АФС (VMU-2012-05) и препарат сравнения эфавиренз, а также перечень вспомогательных веществ.

В методах рассматриваются готовое ЛС на основе АФС, различные физико-химические инструменты анализа, подтверждения структуры и характеристики субстанции VMU-2012-05: спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), рентгеноструктурный анализ, ИК-спектроскопия, высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС), высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ), газовая хроматография.

Описываются процессы получения и аттестации стандартного образца субстанции VMU-2012-05, валидации методики ВЭЖХ-УФ, разработки проекта спецификации и методов контроля качества и изучения стабильности субстанции.

Изложена методика изучения механизма действия субстанции VMU-2012-05, включающая: исследование ингибирующей активности субстанции VMU-2012-05 в отношении ОТ ВИЧ дикого типа (получение ОТ ВИЧ-1 дикого типа, определение ингибирующей активности VMU-2012-05 в отношении ОТ ВИЧ дикого типа); исследование ингибирующей активности субстанции VMU-2012-05 в отношении мутантных форм ОТ ВИЧ-1, соответствующих

лекарственно-устойчивым штаммам вируса (получение мутантных форм ОТ ВИЧ-1, определение ингибирующей активности VMU-2012-05 в отношении мутантных форм ОТ ВИЧ-1, соответствующих лекарственно-устойчивым штаммам вируса).

Рассмотрен процесс изучения специфической фармакологической активности VMU-2012-05 в отношении клеток, инфицированных ВИЧ-1 на моделях лимфоидной культуры клеток человека МТ-4 и первичных клеток периферической крови человека, инфицированных штаммами ВИЧ-1, резистентными к нуклеозидным ингибиторам ОТ вируса: определение инфекционности наработанного вируса; определение цитотоксичности субстанции VMU-2012-05; оценка способности субстанции VMU-2012-05 подавлять репродукцию ВИЧ в культуре клеток; исследование противовирусной активности лекарственного средства на основе субстанции VMU-2012-05 в отношении ВИЧ-1, резистентного к нуклеозидным ингибиторам ОТ вируса.

Представлена методика оценки токсичности субстанции VMU-2012-05 и ЛС на ее основе: изучение токсичности при однократном введении экспериментальным животным (половозрелым самцам и самкам беспородных мышей в возрасте 9-11 недель и беспородных крыс возраста 10-12 недель); изучение токсичности при многократном введении экспериментальным животным (половозрелым самцам и самкам беспородных крыс возраста 10-12 недель и кроликов породы «Белый Великан» возраста 2,5-3,5 месяца).

Предложен способ исследования генотоксичности и прогноза канцерогенности субстанции VMU-2012-05 на лабораторных животных, включающий изучение мутагенных свойств ЛС на основе VMU-2012-05 в тесте по учету микроядер в эритроцитах крови мышей и генотоксичности ЛС на основе VMU-2012-05 в тесте «ДНК-комет» *in vivo*.

Приводятся методы статистической обработки результатов.

В главе 3 изложены основные результаты диссертационного исследования.

Регистрация спектра ЯМР ^1H образца субстанции VMU-2012-05 позволила установить, что, в целом, спектр основного вещества не противоречит предложенной структуре. Общий вид молекулы и кристаллической упаковки уточнен рентгеноструктурным анализом. Получены типичные ИК-спектр и ВЭЖХ-хроматограмма субстанции. Методом ВЭЖХ-УФ определена чистота субстанции (99,3%), установлены значения предела обнаружения (0,02 мкг/мл, соответствует уровню содержания примесей 0,04%) и предела количественного определения (0,05 мкг/мл, соответствует уровню содержания примесей 0,1%) VMU-2012-05. Проведена предварительная (частичная) валидация методик анализа (контроля качества) «VMU-2012-05, субстанция» и получены удовлетворительные результаты по всем валидационным показателям, согласно разработанному протоколу предварительной валидации.

При непосредственном участии соискателя разработан проект спецификации и проведена аттестация стандартного образца субстанции для осуществления контроля качества фармацевтической субстанции VMU-2012-05. Разработанные методики позволили достоверно оценить качество фармацевтической субстанции, что было подтверждено результатами фактического контроля трех опытно-промышленных серий фармацевтической субстанции, выдержавших испытания ускоренной и долгосрочной стабильности.

Изучение механизма действия субстанции в отношении ОТ ВИЧ-1 проведено для VMU-2012-05 и препарата сравнения эфавиренз. Согласно полученным результатам, исследуемая субстанция является ингибитором ОТ ВИЧ (по ингибирующей активности как в отношении фермента дикого типа, так и в отношении его исследованных мутантных форм уступает эфавирензу), обладает низкой цитотоксичностью и в отличие от препарата сравнения, способна полностью подавлять репродукцию ВИЧ-1RES, резистентного к препаратам класса ННИОТ. Следовательно, можно полагать, что разрабатываемый лекарственный кандидат будет обладать определенными

преимуществами перед применяемыми в клинической практике препаратами класса ННИОТ.

Результаты оценки на лабораторных животных общих токсических свойств ЛС на основе VMU-2012-05 для лечения ВИЧ-1 инфекции демонстрируют его относительную безопасность при приеме в терапевтических дозах, что свидетельствует о целесообразности дальнейшего изучения специфической токсичности препарата с целью получения дополнительных доказательств безопасности и получения разрешения на проведение клинических испытаний.

Исследования по изучению генотоксических свойств (тест по учету микроядер в эритроцитах крови мышей), а также полученные результаты в тесте «ДНК-комет» (не выявлено повреждающего действия на ДНК клеток костного мозга, печени, почек, селезенки и головного мозга лабораторных крыс) позволяют спрогнозировать отсутствие канцерогенных свойств у ЛС на основе VMU-2012-05, предназначенного для лечения ВИЧ-1 инфекции.

Глава 4 посвящена обсуждению результатов исследования.

На основе анализа более чем двадцатилетней истории создания и применения антиретровирусных препаратов различной химической структуры и механизма действия установлено, что большинство из них имеют ограничения, главными из которых являются образование в процессе терапии устойчивых форм вируса, что делает необходимой постоянную смену препаратов, и побочные действия, в ряде случаев приводящие к преждевременной отмене терапии. Сформулирован вывод о том, что поиск новых соединений, обладающих благоприятным профилем безопасности и анти-ВИЧ активностью как в отношении дикого штамма ВИЧ-1, так и в отношении резистентных изолятов вируса, с целью создания лекарственных антиретровирусных препаратов представляет крайне важную и перспективную проблему современной вирусологии и медицинской химии.

Подтверждено, что соединение VMU-2012-05 относится к новому классу высокоактивных ННИОТ, показало высокую способность подавлять

репродукцию ВИЧ-1 дикого типа, а также подавляло репродукцию мутантного штамма ВИЧ-1 и имело профиль резистентности, близкий к таковому у эфавиренза. Описана технология получения VMU-2012-05. Указывается, что предлагаемое соединение отличается относительной простотой химического строения, его синтез базируется на использовании дешевого и доступного российского сырья, включает небольшое количество химических и технологических стадий, выделение и очистка субстанции не требует использования сложного и дорогостоящего оборудования. Относительно не высокая сырьевая и производственная себестоимость получения субстанции позволяет прогнозировать низкую стоимость разрабатываемого препарата и, как следствие, его более широкую доступность для пациентов.

Следует отметить, что разработку спецификации на фармацевтическую субстанцию «VMU-2012-05, субстанция-порошок» с указанием методов контроля и норм проводили на основании требований, представленных в соответствующих общих разделах (главах) и общих фармакопейных статьях Фармакопеи Евразийского экономического союза, рекомендаций Коллегии Евразийской экономической комиссии, в соответствии с принципами, изложенными в нормативных актах Евразийского экономического союза, в соответствующих монографиях Фармакопеи США, Европейской Фармакопеи действующих изданий. Приведенные методики позволят достоверно оценить качество фармацевтической субстанции, что было подтверждено результатами фактического контроля трех опытно-промышленных серий фармацевтической субстанции. При разработке методик контроля качества руководствовались фактическими данными, характеризующими качество испытуемых образцов субстанции VMU-2012-05, как в момент выпуска, так и при хранении.

Указывается, что разработанная аналитическая ВЭЖХ методика продемонстрировала пригодность для качественного и количественного определения VMU-2012-05 и его родственных примесей. Для осуществления контроля качества субстанции по показателю «Остаточные органические

растворители» использовали метод ГХ-ПИД (пламенно-ионизационный детектор). Разработанная аналитическая ГХ-ПИД методика продемонстрировала пригодность для качественного и количественного определения остаточных органических растворителей.

С целью выбора оптимальных условий хранения АФС VMU-2012-05 была составлена программа исследования стабильности, позволяющая сделать обоснованное заключение в пользу тех или иных параметров среды (температуры и относительной влажности) при долгосрочных и ускоренных испытаниях. Исследования стабильности (при долгосрочных и ускоренных испытаниях) были проведены для трех промышленных серий АФС VMU-2012-05 в течение предполагаемого срока годности (2 года) и ускоренные испытания - в течение 6 месяцев.

Установлено, что субстанция VMU-2012-05 является ингибитором обратной транскриптазы ВИЧ-1 дикого типа и шести изученных мутантных форм, соответствующих лекарственно-устойчивым штаммам вируса. В эксперименте на культуре клеток, инфицированных диким и мутантным штаммами ВИЧ-1 показана антиретровирусная активность VMU-2012-05. Выявлено, что субстанция VMU-2012-05 в отличие от препарата сравнения эфавиренз, способна полностью подавлять репродукцию ВИЧ-1_{RES}, резистентного к препаратам класса ННИОТ. Субстанция VMU-2012-05 проявляет антиретровирусную активность, зависимую от концентраций, в отношении резистентного штамма ВИЧ-1_{RES}, сохраняющуюся на протяжении всего периода культивирования (11 суток), в то время как препарат сравнения эфавиренз утрачивает свою активность к 11 суткам наблюдения.

Результаты оценки общих токсических свойств лекарственной формы лекарственного средства на основе VMU-2012-05 для лечения ВИЧ-1 инфекции продемонстрировали благоприятный профиль безопасности при приеме в терапевтических дозах.

Отмечается, что результаты теста по учету микроядер в эритроцитах мышей при пятидневном внутрижелудочном введении ЛС на основе

субстанции VMU-2012-05 показали, что препарат не обладает генотоксичностью. Отсутствие канцерогенного потенциала ЛС подтверждено результатами теста «ДНК-комет»: ежедневное внутрижелудочное введение тестируемого объекта самцам и самкам аутбредных крыс на протяжении 14 дней в дозах (1ВТД), 45 мг/кг (5 ВТД) и 90 мг/кг (10 ВТД) по действующему веществу не оказало повреждающего действия на ДНК клеток костного мозга, печени, почек, селезенки и головного мозга.

Заявлено, что исследованный препарат представляет интерес в качестве перспективного для разработки препарата прямого действия против ВИЧ-1, в том числе, против резистентных к эфавиренз штаммов ВИЧ-1, так как он обладает низкой токсичностью и высокой противовирусной активностью в отношении «дикого» и резистентного штаммов ВИЧ-1, что является неоспоримым преимуществом перед существующими препаратами класса ННИОТ.

Завершают работу общие выводы, заключение, список сокращений и условных обозначений, список использованной литературы и приложения с иллюстративным материалом.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Проведенное автором исследование имеет существенное значение для фармацевтической науки и медицинской практики. Работа написана стилистически грамотным научным языком. Научные положения, выводы и заключения вытекают из представленных автором экспериментальных данных и теоретических положений. Диссертантом четко сформулированы и профессионально грамотно решены все поставленные в диссертационной работе задачи, убедительно и достоверно изложены полученные результаты. Выводы соответствуют цели и задачам исследования.

Однако при общей положительной оценке диссертационной работы, при ее рассмотрении возникли следующие вопросы и замечания:

1. Согласно результатам проведённого контроля качества «VMU-2012-05» по показателю «Растворимость», субстанция-порошок «практически

нерастворима в воде, этаноле, гексане, очень мало растворима в метаноле, мало растворима в хлороформе».

1.1. В связи с полученными данными, к какому классу по Биофармацевтической классификационной системе (БКС) можно отнести исследуемую фармацевтическую субстанцию?

1.2. Каковы прогнозы, связанные с фармакокинетикой «VMU-2012-05»?

1.3. Какие способы технологической модификации структуры «VMU-2012-05» можно предложить для разработки лекарственных средств с улучшенной фармакокинетикой?

Указанные замечания не снижают значимости диссертационной работы, полученные результаты и выводы не подлежат сомнению.

Заключение

Таким образом, диссертация Джайн Екатерины Александровны «Стандартизация и фармакологическое изучение оригинального нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ-1 – VMU-2012-05» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук является самостоятельной и законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение важной научной задачи по стандартизации и фармакологическому изучению оригинальной молекулы нового класса нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ-1, которая представляется высокопотенциальным лекарственным кандидатом для создания и проведения клинических исследований антиретровирусного препарата, имеющей существенное значение для специальностей 3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология, 3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 16 «Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации

(Сеченовский Университет)», утвержденного приказом ректора № 0692/Р от 06.06.2022 года, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Джайн Екатерина Александровна, заслуживает присуждения ученой степени по специальностям 3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология, 3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Настоящий отзыв подготовлен профессором кафедры фармацевтической и токсикологической химии медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», доктором медицинских наук, профессором Успенской Еленой Валерьевной, обсужден и утвержден на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», протокол № 0300-35-04/11 от «18» апреля 2024 года.

Отзыв составили:

Профессор кафедры фармацевтической и токсикологической химии медицинского Института РУДН, доктор фармацевтических наук, (14.04.02. Фармацевтическая химия, фармакогнозия), доцент

Е.В. Успенская

Директор медицинского института РУДН, доктор медицинских наук



А.Ю. Абрамов

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»

117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

Тел. (495) 787-38-03, (495) 434-42-12, (495) 434-66-82

e-mail: rector@rudn.ru; rudn@rudn.ru