

«УТВЕРЖДАЮ»

Ректор ФГБОУ ВО СПХФУ

Минздрава России,  
Доктор фармацевтических наук, профессор

Игорь Анатольевич Наркевич

« 30 » августа 2023 г.

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-практической значимости диссертации Козина Дмитрия Андреевича на тему: «Разработка методов анализа и стандартизации производных индоло[2,3-а]карбазола, обладающих противоопухолевым действием», представленной в диссертационный совет ДСУ 208.002.02 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

#### Актуальность темы выполненной работы

Поиск новых, более эффективных и менее токсичных препаратов для лечения различных форм онкологических заболеваний остается актуальной проблемой фармации и медицины на протяжении многих десятилетий. Одной из наиболее перспективных групп соединений с установленной противоопухолевой активностью являются производные индолокарбазола.

На протяжении ряда лет сотрудниками ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России ведется работа по синтезу и исследованию противоопухолевой активности N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазола. Два соединения, получившие лабораторные шифры ЛХС-1208 и ЛХС-1269,

показали наиболее выраженную противоопухолевую активность и были отобраны как потенциальных кандидатов активных фармацевтических субстанций.

Поскольку одним из важных этапов при продвижении потенциальных кандидатов активных фармацевтических субстанций в медицинскую практику является установление показателей качества и параметров стандартизации с последующим созданием соответствующих нормативных документов, тема диссертационного исследования Козина Д.А. «Разработка методов анализа и стандартизации производных индоло[2,3-а]карбазола, обладающих противоопухолевым действием» является актуальной.

### **Связь темы работы с проблемным планом соответствующих отраслей науки и народного хозяйства**

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ кафедры химии Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)», 01.2.011.68237 «Новые знания и подходы в оценке качества и сертификации биологически активных соединений синтетического и природного происхождения, лекарственных препаратов, изделий медицинской техники (технологические и экологические аспекты)» и планом научно-исследовательских работ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, АААА-А20-120031190013-9 «Фармацевтическая разработка и доклинические исследования оригинальных инновационных лекарственных средств с улучшенным профилем безопасности для лечения злокачественных новообразований».

### **Новизна исследований и полученных результатов**

Новизна диссертационной работы Козина Д.А. заключается в том, что в ходе проведения исследования были впервые определены физико-химические свойства субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269, на их основе разработаны методики подтверждения подлинности и количественного определения. В субстанции ЛХС-1269 идентифицированы родственные примеси. Пригодность разработанной методики количественного определения методом ВЭЖХ

субстанции ЛХС-1269 и примеси ЛХС-1269-У была подтверждена статистической обработкой, которые были проведены в соответствии с требованиями ОФС. 1.1.0012.15. и ОФС.1.1.0013.15. Для фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 установлены нормы качества, исследована стабильность, определены сроки годности и составлены проекты нормативной документации (спецификации).

### **Значимость для науки и практики полученных автором результатов**

Обоснованы показатели качества для ЛХС-1208 и ЛХС-1269 как фармацевтических субстанций и проведена их стандартизация. Разработаны методики анализа и составлены проекты нормативной документации, которые могут использоваться при контроле качества фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269, при разработке и производстве лекарственных средств на их основе.

Стоит отметить, что результаты, полученные в ходе проведенных исследований могут быть использованы в качестве основы для стандартизации и разработки методик анализа и контроля качества других фармацевтических субстанций, относящихся к группе производных индоло[2,3-а]карбазола.

Научные положения, выводы и рекомендации диссертационной работы Козина Д.А. внедрены:

- в учебный процесс кафедры химии Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплины «Методы фармакопейного анализа», читаемых студентам по направлению подготовки (специальности) 33.05.01 «Фармация» (Акт внедрения №160 от 7 ноября 2022 г.).
- в работу лабораторий химико-фармацевтического анализа, фармакологии и токсикологии и химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Акт внедрения от 9 ноября 2022 г.).

### **Личный вклад автора**

Вклад автора является определяющим на всех этапах исследования. Личный вклад автора включает выбор и обоснование темы диссертации, подготовку

публикаций и выступления на научных конференциях. Лично автором были получены и интерпретированы спектральные характеристики исследуемых соединений, определен ряд физико-химических показателей, включая содержание органически связанного хлора, воды, сульфатной золы и тяжелых металлов. Автором разработаны методики для подтверждения подлинности (ИК-спектрометрия, УФ-спектрофотометрия, поляриметрия) и количественного анализа фармацевтических субстанций методом ВЭЖХ. Применяв метод ВЭЖХ-МСМС, диссертант идентифицировал две примеси в субстанции ЛХС-1269. При непосредственном участии автора показана возможность применения разработанной методики ВЭЖХ для определения ЛХС-1208 в биологических жидкостях и осуществлен встречный синтез образцов сравнения примесей в субстанции ЛХС-1269. Автором самостоятельно проведена статистическая обработка экспериментальных данных и валидация разработанных методик, составлены проекты нормативной документации и сформулированы выводы. Написание диссертации и автореферата является личным трудом диссертанта.

#### **Рекомендации по практическому использованию результатов научной работы и выводов диссертации**

Результаты диссертационной работы Козина Д.А. рекомендуются к внедрению в деятельность организаций, занимающихся производством, контролем качества, а также разработкой новых лекарственных средств.

Помимо этого ряд экспериментальных результатов рекомендуется использовать в учебном процессе медицинских и фармацевтических высших учебных заведений при освоении студентами дисциплин по специальности 33.05.01 «Фармация».

#### **Публикации по теме диссертации**

Научные положения и выводы диссертации обоснованы необходимым количеством изученных литературных источников отечественного и зарубежного происхождения, проведением достаточного объема экспериментальных исследований, подтверждены логикой обработки первичных экспериментальных данных.

По материалам диссертации Козиным Д.А. опубликовано 10 печатных работ. Из них одна научная статья опубликована в журнале, включенном в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России и две статьи в научных изданиях, индексируемых в международной базе Scopus. Помимо этого, в иных изданиях опубликовано 7 публикаций.

Результаты диссертационного исследования были доложены на следующих конференциях: XV Международная (XXIV Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых (Москва, 2020); X Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2020); III Международная научно-практическая конференция «Гармонизация подходов к фармацевтической разработке» (Москва, 2020); XXIV Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2021); Первая всероссийская школа для молодых ученых по медицинской химии «MEDCHEMSCHOOL 2021» (Новосибирск, 2021); V Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2022» (Волгоград, 2022).

### **Структура и содержание диссертации**

Диссертационная работа Козина Д.А. изложена на 142 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав результатов собственных исследований, выводов, списка литературы и четырех приложений, содержит 33 таблицы и 57 рисунков.

Во введении диссертант обосновывает актуальность исследования и информацию о степени разработанности темы исследования, а также формулирует цели и задачи.

В литературном обзоре (глава 1) автором дана ретроспектива исследования биологически активных производных индоло[2,3-а]карбазола, природного и синтетического происхождения и представлена схема синтеза ЛХС-1208 и ЛХС-

1269 и показаны современные подходы к разработке методов качественного и количественного анализа производных индоло[2,3-а]карбазола.

Глава 2 традиционно посвящена материалам и методам исследования, описаны использованные приборы, реактивы и характеристика объектов исследования.

Главы 3 и 4 посвящены собственным экспериментальным исследованиям и обоснованиям результатов, включающие спектральные и физико-химические характеристики субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269, разработку методик их качественного, количественного определения и возможных примесей в субстанциях. В диссертации Козин Д.А. подробно представил все этапы разработки каждой методики, обосновал оптимальный в каждом конкретном случае способ подготовки образцов, выбор условий для хроматографического анализа и способы детектирования. Достоинством работы является установление значения ряда валидационных параметров разработанных методик.

Общие выводы диссертации полностью отражают полученные результаты и соответствуют поставленной цели и задачам.

В приложения вошли акты внедрения результатов диссертационного исследования в учебный и научно-исследовательский процессы и проекты спецификаций на фармацевтические субстанции ЛХС-1208 и ЛХС-1269.

#### **Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации**

Достоинством диссертационной работы Козина Д.А. является последовательная и четкая структура. Подлинность исследуемых образцов ЛХС-1208 и ЛХС-1269 доказана несколькими аналитическими методами (<sup>1</sup>H-ЯМР-спектromетрии, ИК-спектromетрии, УФ-спектromетрии и тандемной масс-спектromетрии). В субстанции ЛХС-1269 идентифицированы две близко родственные примеси. Установлены значения ряда валидационных параметров разработанных методик и близко родственных примеси ЛХС-1269-У в субстанции ЛХС-1269. Представлены проекты спецификаций на фармацевтические субстанции ЛХС-1208 и ЛХС-1269.

В общей сложности диссертационная работа Козина Д.А. заслуживает положительную оценку, однако имеется ряд вопросов и замечаний:

1. Поскольку, вопросы синтеза именно изучаемых субстанций в литературном обзоре представлены не полностью, какие органические растворители использовались при этом? Были ли проведены исследования остаточных растворителей в изучаемых субстанциях?

2. В результате исследования были определены две близко родственные примеси в субстанции ЛХС-1269 (обозначенные шифрами ЛХС-1269-Х и ЛХС-1269-У). Согласно ОФС1.1.0006.15 для родственных примесей в фармацевтических субстанциях, к которым относятся данные, требуется устанавливать пределы содержания с учетом параметров их безопасности. Проведены ли данные исследования? Позволяет ли предлагаемая Вами методика определить допустимое содержание указанных примесей?

3. На стр 91, указано, что «...содержание примесей в образцах удалось снизить», но данная информация дана без уточнений и пояснений. До какой степени «удалось снизить» данный показатель?

4. Почему для изучаемых субстанций и разработки методик количественного определения не были предложены абсолютные методы? На стр 57, таблица 9 и стр. 81 таблица 15 даны конечные результаты количественного определения, но без статистической обработки результатов.

5. Результаты, приведенные в таблицах 11 и 33 (изучение стабильности субстанций), следовало проиллюстрировать хроматограммами или спектрами.

6. Как результаты определения предела обнаружения и предела количественного определения изучаемых субстанций будут соотноситься с предполагаемыми дозировками лекарственного средства, каковы предполагаемые терапевтические дозы изучаемых субстанций?

7. Раздел диссертации 3.6 «Разработка методик определения ...в биологических жидкостях для изучения доклинической фармакокинетики» вызывает много вопросов:

- количество животных, взятых для эксперимента, не соответствует требованиям (ГОСТ ISO 10993-11-2021 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 11. Исследования общетоксического действия);
- нет результатов валидационной оценки методик изолирования и обнаружения субстанции в биологических объектах (кровь и моча).
- поясните методику подготовки модельной смеси крови с изучаемой субстанцией (стр. 63). Показателем эффективности экстракции является степень экстракции целевого анализа, тогда как вы выбрали «внешний вид экстракта». Как определялась селективность экстрагентов?
- на стр. 67 дан рисунок 37 и в комментариях указано, что это «полулогарифмическая зависимость», тогда как оси обозначены в часах и содержании субстанции (мкг/мл). На графике отмечается снижение концентрации за 8 часов, однако нулевое значение не достигнуто. Почему не продолжили исследование до снижения концентрации субстанции до минимальных значений? Это позволило бы установить предел обнаружения или предел количественного определения Ваших методик.
- на рисунке 36 представлен спектр в ультрафиолетовой области, однако он не соответствует спектру изучаемой субстанции, т.к. на нем присутствует максимум в области 235 нм. Если это спектр только с «одной хроматографической зоны», то данный спектр не соответствует целевому веществу. Этот спектр совпадает со спектром на рисунке 44, где указано «...пиков вещества и примесей субстанции». Просим пояснить данный результат.

8. В работе некорректно представлены результаты статистической обработки, ГФ регламентирует до сотых долей, в работе одни представлены по-разному, в зависимости от таблицы.

9. В работе встречаются стилистические ошибки и некорректность формулировок: такие как «злокачественными опухолями заболевают»; в соответствии с Государственной Фармакопеей РФ существует понятие «фармацевтическая субстанция» и нет понятия «действующее вещество



фармацевтической субстанции», пояснить, что понимается под термином «физиологически активное соединение» или на стр 54 – «действующее вещества в биологически активном веществе», стр 91 – «концентрация субстанции и концентрация действующего вещества», в чем разница. Данная нечеткость в терминах приводит к непониманию представленной информации (например, таблицу 21 на стр. 94). В ИК-спектрах принято говорить о полосах поглощения, а в УФ спектрах о максимумах.

10. В списке литературы более 30 изданий со сроком более 25-30 и в некоторых случаях более 35 лет, в том числе 6 учебников и учебных пособий 1986-1987 годов издания. Хотя ГОСТ и позволяет представлять литературные источники и по автору или по названию издания, однако в рамках одной работы следовало бы придерживаться одной формы.

Стоит отметить, что обозначенные замечания носят уточняющий характер и не снижают общую научно-практическую ценность и достоинство настоящей диссертационной работы.

### **Заключение**

Таким образом, диссертационная работа Козина Дмитрия Андреевича на тему «Разработка методов анализа и стандартизации производных индоло[2,3-а]карбазола, обладающих противоопухолевым действием», на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи по разработке методов контроля качества новых фармацевтических субстанций, имеющей существенное значение для фармацевтической науки, что 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 от 06.06.2022 г. № 0692/Р, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Козин Дмитрий Андреевич, заслуживает

присуждения искомой ученой степени по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Отзыв на диссертационную работу Козина Д.А. заслушан и утвержден на заседании кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, протокол № 1 от 31 августа 2023 г.

**Отзыв подготовил:**

Доктор фармацевтических наук (3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия), доцент, заведующий кафедрой фармацевтической химии, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Стрелова Ольга Юрьевна

«31»августа 2023г.

Адрес: 197022, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, улица Профессора Попова, д. 14, литера А. Телефон: +7 (812) 499-39-00  
E-mail: rectorat.main@pharminnotech.com



Подпись руки Стреловой О.Ю.  
удостоверяю 31.08.2023  
Начальник отдела документации Павлюк И.Е.  
ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России