

УТВЕРЖДАЮ



И.О. ректора Федерального
Государственного автономного
образовательного учреждения
высшего образования
«Сибирский федеральный
университет»

академик РАН

Е.А. Ваганов

«05» 07 2017 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального Государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет» о научно-практической значимости диссертационной работы Кускова Андрея Николаевича на тему «Амфифильные полимеры N-винилпирролидона и наноразмерные лекарственные формы на их основе», представленной на соискание ученой степени доктора химических наук по специальностям 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии), 02.00.06 – Высокомолекулярные соединения.

Актуальность темы исследования. Системы контролируемой доставки биологически активных (БАВ) и лекарственных веществ (ЛВ) представляют интерес для биотехнологии, биомедицины и фармацевтической промышленности в связи с возможностью получать формы введения БАВ, способные обеспечивать направленный транспорт в организме, оптимальный профиль выделения, предотвращать биодеструкцию БАВ под воздействием факторов окружающей среды, что позволит исключить возникновение побочных эффектов, необходимость применения повышенных доз и частый прием ЛВ, и другие недостатки лекарственных препаратов, а также повысить их биодоступность и биосовместимость. Перспективным направлением в области разработки новых лекарственных препаратов является создание наноразмерных носителей на основе синтетических и природных полимеров, способных к включению БАВ, в частности, полимерных наночастиц на основе биосовместимых полимеров и липосом, модифицированных такими полимерами, и обладающих повышенной стабильностью. Кроме того, инкапсулирование БАВ с использованием наноразмерных носителей становится все более востребованным в новых косметических средствах и других продуктах с лечебным эффектом, где защитные свойства носителя могут помочь предотвратить преждевременную деградацию активного вещества, увеличить его биосовместимость и биодоступность за счет направленного транспорта в организме и обеспечить оптимальную терапевтическую дозу БАВ.

Создание универсальных наноразмерных носителей биологически активных веществ предполагает использование биосовместимых материалов, не обладающих токсичностью и не вызывающих побочных реакций в организме, но в тоже время, обеспечивающих достаточную структурную стабильность и эффективность действия. Кроме того, разработка универсального подхода к иммобилизации БАВ, с использованием полимерных наноносителей, должна обеспечивать возможность контролируемого изменения таких характеристик носителей, как диаметр, степень и эффективность включения БАВ (что определяет эффективность доставки БАВ к мишени в организме и пределы достижения терапевтического эффекта доставляемого активного вещества). Наконец, эффективным носителям лекарственных веществ необходимы простые, с точки зрения их практической реализации, способы направленного транспорта к клеткам-мишеням, полного высвобождения загруженного активного вещества и безопасного выведения носителя из организма. Разработка наноразмерных систем доставки БАВ невозможна без детальных исследований механизмов и процессов самоорганизации полимерных макромолекул в живых системах, свойств, характеристик и биосовместимости наночастиц с БАВ на их основе, оптимальных способов их получения, введения и терапевтического эффекта, а так же взаимодействия с клетками, тканями, органами и другими биологическими объектами. Таким образом, создание наноразмерных форм БАВ на основе полимерных носителей оказывается сложной и комплексной задачей, требующей значительных теоретических и прикладных исследований фундаментального характера на стыке полимерной химии, биотехнологии, биохимии, биофизики, фармацевтики и клинической медицины.

В данной диссертационной работе предложены и реализованы подходы к созданию перспективной и универсальной платформы для получения эффективных наноразмерных систем доставки широкого круга гидрофобных биологически активных веществ (как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных) – полимерные наночастицы, формируемые самоорганизацией макромолекул амфифильного полимера в водных средах, и липосомы, модифицированные амфифильными полимерами, и обладающие повышенной стабильностью. Предложенные в работе новые методы синтеза исходных амфифильных полимеров на основе хорошо известного и широко используемого в медицине и фармацевтической промышленности биосовместимого полимера (поли-N-винилпирролидона) позволили получать полимеры с контролируемым строением гидрофильного и гидрофобного фрагментов и, таким образом, регулировать основные свойства и характеристики полимерных наноразмерных носителей на их основе. Это дает возможность варьировать размер носителей, эффективность включения гидрофобного БАВ, контролировать локализацию лекарственной формы и высвобождение активного вещества под действием различных физических и физико-химических факторов, повышать биосовместимость препаратов. Особую актуальность имеют также исследования, направленные на оптимизацию методов включения гидрофобных БАВ в полимерные наночастицы и полимер-модифицированные липосомы, а также изучения взаимодействия полимерных носителей с биологическими объектами, их биосовместимости, токсичности и биологической активности загруженных в них ЛВ различной природы и назначения.

В связи с вышеизложенным, диссертационная работа Кускова Андрея Николаевича, посвящённая разработке и изучению наноразмерных лекарственных форм на основе наночастиц амфифильных полимеров, представляется своевременной и актуальной. Результаты исследований и разработок универсальных полимерных носителей БАВ, представленные соискателем, имеют большое фундаментальное и прикладное значение и представляют особую важность для расширения спектра высокоэффективных препаратов на фармацевтическом рынке России и новых продуктов в сфере биотехнологической и косметической продукции.

Научная новизна исследования. Основными элементами научной новизны, содержащимися в диссертационной работе, являются следующие результаты:

Впервые разработаны методы синтеза новых амфифильных полимеров и сополимеров N-винилпирролидона, показаны пути регулирования молекулярной массы гидрофильного фрагмента полимера, природы алифатического гидрофобного фрагмента и массового соотношения гидрофобной и гидрофильной частей синтезируемых полимеров для оптимизации свойств лекарственных форм, созданных на их основе.

Установлено, что полученные амфифильные производные N-винилпирролидона при определенных концентрациях самопроизвольно образуют в водных средах организованные наноразмерные структуры. Показано, что размеры образующихся ассоциатов полимерных молекул находятся в нанометровом диапазоне и составляют от 30 до 300 нм, имеют сферическую форму, а их строение и свойства зависят от способа и условий их получения, а также от массового соотношения гидрофильной и гидрофобной частей полимера.

Впервые проведено исследование цитотоксичности, гемотоксичности и острой токсичности полученных амфифильных полимеров ВП и наночастиц на их основе в условиях *invitro* и *invivo* и показана их высокая биосовместимость.

Впервые изучены и охарактеризованы липосомы, модифицированные амфифильными производными поли-N-винилпирролидона. Установлено, что модификация липосомальных мембран амфифильными полимерами ВП с молекулярной массой гидрофильного полимерного фрагмента 2000 – 8000 Да и одной концевой гидрофобной октадецильной группой ведет к увеличению стабильности модифицированных липосом при хранении и против воздействия различных дестабилизирующих факторов (циклы заморозки-разморозки, поликатионы, рН среды, детергенты, компоненты крови), увеличению времени их циркуляции в крови и уменьшению накопления в печени экспериментальных животных, а также к повышению эффективности включенных в них противогрибковых антибиотиков нистатина и амфотерицина в условиях *invitro*. Показано влияние содержания модифицирующего полимера в липосомах и молекулярной массы его гидрофильного фрагмента на их устойчивость.

Впервые получены наноразмерные полимерные частицы из амфифильных полимеров N-винилпирролидона различного строения. Показано, что, варьируя состав амфифильных полимеров ВП, можно получать наночастицы с разным размером, распределением по размерам, поверхностным зарядом и высокой стабильностью при

хранении, лиофилизации и при взаимодействии с биологическими объектами, компонентами крови, клетками и тканями организма в условиях *invitro* и *invivo*.

Показано, что наноразмерные частицы на основе амфифильных полимеров N-винилпирролидона могут быть использованы в качестве носителей БАВ различной природы с высокой эффективностью. Впервые были получены полимерные наноносители, содержащие фактор крови IX, соевый ингибитор протеиназ типа Баумана-Бирк и его производные (препараты белковой природы, обладающие противовоспалительным и антиканцерогенным действием), противовоспалительный препарат индометацин.

Проведено сравнение различных методов получения частиц-наноносителей (диализ, эмульсионный метод и т.д.), определены оптимальные условия получения наноразмерных форм введения с высоким содержанием включенного БАВ для каждой из исследованных модельных субстанций (концентрация полимера, размер его гидрофильной и гидрофобной частей, тип растворителя, массовое соотношение полимера и БАВ).

В условиях *invitro* и *invivo* установлены преимущества новых полимерных наноразмерных форм с иммобилизованными БАВ по сравнению с неиммобилизованными БАВ, заключающиеся в повышенной или сравнимой эффективности, пролонгированном профиле выделения и пониженной токсичности по отношению к культурам клеток или в организме экспериментальных животных.

Научно-практическая значимость результатов, полученных автором диссертации. Полученные соискателем научные результаты являются важными и обладают существенным потенциалом и в прикладном плане.

В частности, работа вносит вклад в создание и усовершенствование методов синтеза биосовместимых амфифильных полимеров и сополимеров N-винилпирролидона, обладающих регулируемым строением и массовым соотношением гидрофильной и гидрофобной части макромолекулы, позволяющим контролировать строение, характеристики и свойства наноносителей на их основе.

Кроме того, разработанные и оптимизированные автором методы получения в качестве эффективных носителей БАВ полимерных наночастиц самосборкой макромолекул синтезированных амфифильных полимеров в водных средах и модификации амфифильными полимерами липосомальных мембран с целью повышения стабильности липосомальных носителей являются базой для решения целого ряда актуальных задач биотехнологии, фармацевтики и биомедицины.

Например, метод иммобилизации с использованием полимерных носителей фактора крови IX, как эффективный способ его защиты от инактивации и сохранения его активности, может применяться для разработки новых перспективных препаратов для лечения гемофилии. Разработанные эффективные методы включения противовоспалительного лекарственного вещества индометацина, могут быть использованы для получения и внедрения его высокоэффективной формы с пониженной токсичностью, ulcerогенной активностью и повышенной биодоступностью.

Исследование процессов загрузки и выделения как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных БАВ, включенных в полимерные наночастицы на основе

амфифильных полимеров, а также их взаимодействия с компонентами крови клетками и другими биологическими объектами сыграет важную роль для разработок биофармацевтических препаратов на основе белков и нуклеиновых кислот. Важно, что низкая стоимость и достаточная простота получения исходных амфифильных полимеров и полимерных наноносителей на их основе открывает возможности для их широкого применения в фармацевтике, биотехнологии и производстве косметических препаратов.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации.

Основные результаты и выводы диссертационной работы Кускова Андрея Николаевича рекомендуются как эмпирическая база для разработок и внедрения новых высокоэффективных форм введения в организм биологически активных и лекарственных веществ, биопрепаратов, продуктов персонального использования и косметических средств. Важным преимуществом использования разработок соискателя является возможность их внедрения в различные биофармацевтические и биомедицинские технологии для различных типов биологически активных веществ. Результаты и выводы диссертации могут быть включены в программу образовательных курсов по технологии высокомолекулярных соединений, биоматериалов, наноматериалов и биотехнологии для студентов, аспирантов и представителей индустрии.

Результаты, полученные в диссертации Кускова Андрея Николаевича, могут быть использованы в организациях, проводящих исследования в области получения полимерных форм биологически активных веществ и наноразмерных систем медико-биологического назначения - в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова, Российском химико-технологическом университете имени Д.И. Менделеева, Институте высокомолекулярных соединений РАН, Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского, Волгоградском государственном техническом университете, Московском технологическом университете (МИТХТ), Российском государственном университете имени А.Н. Косыгина, Сибирском федеральном университете и в ряде других организаций.

Достоверность и обоснованность результатов и выводов исследования.

Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, основываются на достаточном количестве экспериментального материала и аргументированно подтверждаются соответствующими результатами проведенных исследований. Достоверность и обоснованность результатов и выводов диссертационной работы подтверждается современным уровнем используемых экспериментальных методов, воспроизводимостью результатов проведенных экспериментов, совпадением результатов исследований, проведенных различными независимыми методами, и согласованностью с результатами работ других авторов. Полученные данные обработаны общепринятыми методами статистики, что позволяет считать результаты достоверными. Поставленные задачи решены полностью. Научные положения, выводы и рекомендации диссертации логично вытекают из проведенных исследований, что позволяет считать их обоснованными.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом. Диссертация написана по традиционной схеме, изложена на 327 страницах, содержит 35 таблиц и 83 рисунка и состоит из введения, обзора литературы (глава 1), обсуждения результатов исследования (глава 2), описания объектов и методов исследования (глава 3), выводов, и списка литературы, включающего 320 источников

В главе 1 (Обзор литературы, с.18-59) с привлечением большого числа источников, как отечественных, так и зарубежных, автором приводятся сведения о методах синтеза амфифильных полимеров и сополимеров, их основных разновидностях, о способах получения и типах наноразмерных полимерных носителей для доставки БАВ, основные области применения наночастиц, как систем доставки биологически активных веществ.

В главе 2 (Обсуждение результатов, с.60-253) представлены результаты проведенных исследований по разработке методов синтеза и анализу строения и свойств амфифильных полимеров N-винилпирролидона с разным размером и строением гидрофильного и гидрофобного фрагментов, в том числе, содержащих дополнительные функциональные группы; результаты исследования поведения синтезированных полимеров в водных средах с самопроизвольным образованием наноразмерных полимерных агрегатов и изучения свойств таких наночастиц; результаты изучения биосовместимости и особенностей взаимодействия амфифильных полимеров и наночастиц на их основе с живыми клетками, тканями и органами; результаты изучения возможности использования разработанных полимерных наноносителей в составе новых лекарственных форм для доставки в организме целого ряда различных низкомолекулярных и высокомолекулярных модельных БАВ. При обсуждении полученных результатов автором обобщены основные положения диссертации, проведен анализ полученных данных, даны рекомендации по применению результатов исследования.

В главе 3 (Экспериментальная часть, с.254-293) автор подробно описывает использованные в работе методы полимерного синтеза, функциональной модификации полимеров, а также химические, физико-химические биохимические, токсикологические и другие методы исследования. Все представленные в работе исследования проведены на высоком методическом и инструментальном уровне.

Положительно оценивая диссертационное исследование Кускова Андрея Николаевича в целом, следует отдельно отметить полноту и смысловую завершенность работы.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертационной работы и дает полное представление о содержании и качестве проведенных автором исследований.

Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати. Основные результаты, полученные автором в диссертации, опубликованы в 15 статьях в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки РФ. Новизна исследования подтверждается 8 полученными патентами на изобретение Российской Федерации.

Критические замечания. Принципиальных вопросов и возражений диссертационная работа Кускова Андрея Николаевича не вызывает. В качестве отдельных замечаний отметим:

1. Экспериментальный метод паровой осмометрии для определения молекулярной массы синтезированных полимеров описан не достаточно ясно. Не указан тип растворителя и используемых для анализа стандартов. Не указано, какая молекулярная масса полимера определялась данным методом (средне-числовая или средне-массовая).
2. В диссертации не везде указана точность определения при исследовании характеристик дисперсных систем полимерных наночастиц (например, диаметра частиц). На рисунках 2.36, 2.38, 2.39, 2.40 и др. не указаны доверительные интервалы экспериментальных значений определяемых величин.
3. При обсуждении строения иммобилизованных систем автору следовало большее внимание уделить особенностям межмолекулярного взаимодействия компонентов системы, особенно в случае иммобилизации белков.
4. В работе имеется ряд опечаток, хотя в целом она оформлена хорошо.

Однако все вышеперечисленные замечания не имеют принципиального характера и не влияют на общую положительную оценку работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Кускова Андрея Николаевича «Амфифильные полимеры N-винилпирролидона и наноразмерные лекарственные формы на их основе» является самостоятельной завершённой научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, имеющее важное значение для биотехнологии и химии высокомолекулярных соединений – изыскание новых эффективных и безопасных систем доставки биологически активных и лекарственных веществ на основе биосовместимых полимерных наноразмерных носителей.

Работа соответствует п.8 «Разработка научно-методических основ для применения стандартных биосистем на молекулярном, клеточном, тканевом и организменных уровнях в научных исследованиях, контроле качества и оценки безопасности использования пищевых, медицинских, ветеринарных и парфюмерно-косметических биопрепаратов» паспорта специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии). Работа соответствует п.9. «Целенаправленная разработка полимерных материалов с новыми функциями и интеллектуальных структур с их применением, обладающих характеристиками, определяющими области их использования в заинтересованных отраслях науки и техники» паспорта специальности 02.00.06 – Высокомолекулярные соединения.

На основании вышеизложенного можно сделать заключение, что по объёму, научной новизне, практической значимости, достоверности полученных результатов работа соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых

степеней» от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемых к докторским диссертациям, а ее автор Кусков Андрей Николаевич, заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальностям 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии), 02.00.06 – Высокомолекулярные соединения.

Отзыв на диссертационную работу Кускова Андрея Николаевича «Амфифильные полимеры N-винилпирролидона и наноразмерные лекарственные формы на их основе» рассмотрен, обсуждён и утверждён на семинаре базовой кафедры биотехнологии Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета, протокол № 22 от « 27 » июня 2017 г.

Отзыв подготовила:
профессор базовой кафедры биотехнологии
Сибирского федерального университета
д.б.н., Светлана Владиславна Прудникова
660041, РФ, г. Красноярск, пр. Свободный, 79
Тел. +7-913-83-23-544
e.mail: sweet_s@bk.ru

