

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента, доктора фармацевтических наук, профессора, заведующего кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университета имени М.В. Ломоносова» Калениковой Елены Игоревны на диссертацию Бабкова Дениса Александровича на тему «Мишень-ориентированный поиск антидиабетических соединений и их фармакологические свойства», представленную к защите на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология

### **Актуальность проблемы**

Новая национальная стратегия развития фармацевтического рынка «Фарма 2030» предусматривает разработку инновационных лекарственных средств (ЛС), обеспечение полного цикла производства ЛП внутри страны в рамках социально ориентированного подхода с целью расширения номенклатуры эффективных и безопасных ЛС для терапии распространенных заболеваний. Рецензируемая работа посвящена решению актуальной научно-практической проблемы поиска и изучения фармакологических свойств новых соединений для лечения сахарного диабета 2-го типа (СД2). Влияние на выбранные фармакологические мишени может стать новым подходом в терапии сахарного диабета 2 типа (СД2) и предупреждения его осложнений. Выбранное направление исследований относится к современным глобальным проблемам фармакологии, поскольку затрагивает терапию социально-значимого заболевания, при этом разнообразие классов используемых противодиабетических препаратов, к сожалению, не обеспечивает все необходимые потребности практической диабетологии. По своей сути работа представляет собой фундаментальный труд, направленный на решение важных практических задач фармации и медицины. Она построена на современной концепции развития СД2, использует адекватные модели развивающегося заболевания и оценивает возможность применения исследуемых веществ для коррекции иммунометаболических нарушений.

### **Обоснованность и достоверность результатов исследования**

Представленный объем экспериментальных данных, выполненных на достаточном количестве животных (180 нелинейных крыс-самцов, 200 нелинейных мышей-самцов, 150 мышей-самцов линии C57bl/6J, 5 кроликов-самцов породы Шиншилла) и первичных клеточных линиях (фибробласты сердца крыс, перитонеальные макрофаги мышей), их корректная статистическая обработка, четкое описание и анализ позволяет квалифицировать результаты диссертационной работы как достоверные, а положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации считать обоснованными. Полученные новые научные данные имеют важное теоретическое и практическое значение.

### **Новизна и практическая ценность диссертации**

Была продемонстрирована возможность плеiotропного воздействия на ключевые звенья патогенеза сахарного диабета 2 типа посредством GSK3B, PTP1B, AMPK и GSK-опосредованной регуляции внутриклеточных сигнальных каскадов и метаболических путей.

Были охарактеризованы новые фармакологически активные соединения, обладающие потенциалом для дальнейших доклинических исследований.

Было обнаружено, что соединение K-167 является наномолярным ингибитором GSK3B, нецитотоксично и проявляет плейотропную противодиабетическую активность на животной модели диабета 2 типа. Он нормализует гиперинсулинемию, снижает резистентность к инсулину, улучшает толерантность к глюкозе, снижает массу висцеральной жировой ткани и уровень триглицеридов в печени, корректирует маркеры системного воспаления и оказывает выраженное антитромботическое действие.

Соединения VIF-68 и VIF-69 являются субмикромольными активаторами АМРК и ингибируют стимулированный LPS синтез оксида азота макрофагами с низкой цитотоксичностью, но не проявляют гипогликемической активности *in vivo*.

Соединение AZH-141a является микромольным ингибитором РТР1В и активатором АМРК, проявляющим плейотропную противодиабетическую активность на животной модели диабета 2 типа. Он улучшает толерантность к глюкозе и гликемию натощак, а также корректирует липидный гомеостаз за счет снижения концентрации общего холестерина и липопротеидов низкой плотности в плазме крови, массы висцеральной жировой ткани и массы тела животных.

Было установлено, что соединение NP-0006 является микромольным активатором GSK и проявляет плейотропную противодиабетическую активность на животной модели диабета 2 типа. Он уменьшает гиперинсулинемию, резистентность к инсулину, улучшает толерантность к глюкозе, ингибирует глюконеогенез, восстанавливает синтез гликогена, снижает массу тела животного за счет уменьшения массы забрюшинной и брыжеечно-висцеральной жировой ткани и корректирует маркеры системного воспаления. NP-0006 увеличивает пролиферативную активность эндокринных клеток в островках Лангерганса в поджелудочной железе мышей с экспериментальным диабетом 1 типа.

Была разработана методология поиска новых антидиабетических соединений, которая включает последовательное изучение *in silico*, *in vitro* и *in vivo*. Эта методология позволяет эффективно выявлять новые активные соединения с благоприятными фармакокинетическими и токсикологическими характеристиками. Виртуальный скрининг был проведен на 2309 структур, из которых 303 были отобраны для экспериментального изучения. Эффективность этой системы поиска была подтверждена выявлением новых химических классов и скаффолдов ингибиторов GSK3B и РТР1В, активаторов АМРК и GSK. Для наиболее перспективных веществ была доказана антидиабетическая активность, что делает их перспективными для создания новых лекарственных препаратов.

### **Теоретическая и научно-практическая значимость**

Теоретическое значение рецензируемой работы состоит в том, что разработана оригинальная методология комплексного направленного поэтапного мишень-ориентированного поиска новых антидиабетических соединений с рациональным выбором биологических мишеней на основе массива биомедицинских данных, последовательным изучением *in silico*, *in vitro* и *in vivo*, позволяющая эффективно выявлять новые активные соединения с

благоприятными фармакокинетическими и токсикологическими характеристиками, отсеивая ложноактивные соединения на ранних этапах.

Практическое значение работы заключается в обнаружении новых фармакологически активных соединений. Показано, что 3-арилиден-2-оксиндолы являются перспективным скаффолдом для поиска и разработки ингибиторов GSK3B. Найдены 2'-карбонитрилбифенил-конъюгированные бензо[*d*]имидазо[1,2-*a*]имидазолы, перспективные для поиска активаторов АМРК. Выявлено, что бифенил-замещенные 2-аминобензимидазолы и 2-иминобензимидазолы являются перспективным скаффолдом для поиска новых ингибиторов РТР1В. Установлено, что бис-пиридоксиновые соединения с линкерным серусодержащим алифатическим фрагментом являются новым и перспективным скаффолдом для поиска и разработки активаторов GSK. Доказана антидиабетическая активность наиболее перспективных веществ. Для этих веществ показана возможность плеiotропного воздействия на метаболические дефекты СД2 через регуляцию активности внутриклеточных сигнальных каскадов. Доказана перспективность поиска полифункциональных антидиабетических соединений. Комплексное исследование фармакологических свойств наиболее эффективных соединений обосновало перспективность доклинического изучения ингибитора GSK3B соединения K-167, ингибитора РТР1В/активатора АМРК соединения AZH-141a и активатора GSK соединения NP-0006. Заложены основы создания лекарственных препаратов с оригинальным механизмом действия для улучшения лечения социально значимых заболеваний. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта 14-25-00139 «Создание системы мишень-ориентированного поиска биологически активных соединений, влияющих на патогенетически важные звенья нарушения углеводного обмена при сахарном диабете типа 2, с использованием технологий компьютерного моделирования и медицинской химии».

#### **Соответствие диссертации паспорту специальности**

Диссертационное исследование соответствует п.3 паспорта специальности 3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология, а именно «Изыскание, дизайн *in silico*, конструирование базовых структур, воздействующих на фармакологические мишени. Выявление фармакологически активных веществ среди природных и впервые синтезированных соединений, продуктов биотехнологии, геной инженерии и других современных технологий на экспериментальных моделях *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*», п.4. «Исследование зависимости «структура–активность» в различных классах фармакологических веществ. Целенаправленный синтез и скрининг фармакологических веществ», п.5. «Исследование механизмов действия фармакологических веществ в экспериментах на животных, на изолированных органах и тканях, а также на культурах клеток», п.6. «Изучение фармакодинамики, фармакокинетики и метаболизма лекарственных средств. Установление связей между дозами, концентрациями и эффективностью лекарственных средств. Экстраполяция полученных данных с биологических моделей на человека», п.7. Экспериментальное (доклиническое) изучение безопасности лекарственных средств. Изучение токсичности при однократном и многократном введении, включая оценку специфической токсичности и нежелательных побочных эффектов (мутагенность, эмбриотоксичность, тератогенность, влияние на репродуктивную функцию, аллергизирующее действие, иммунотоксичность и канцерогенность)».

### **Полнота освещения результатов диссертации в печати**

Основное содержание диссертационной работы отражено в 16 публикациях в журналах из Перечня ВАК РФ, в том числе, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science. Ключевые результаты работы защищены 6 патентами на изобретение РФ. Публикации отражают основные результаты, полученные в диссертационной работе.

### **Структура и оформление работы**

Работа изложена на 237 страницах машинописного текста, иллюстрирована 72 рисунками и 28 таблицами. Построение диссертации классическое в соответствии с существующими требованиями. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, пяти глав, описывающих собственные результаты автора, главы обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Литературный указатель содержит 12 отечественных и 448 зарубежных источников. Диссертация хорошо оформлена, написана хорошим литературным языком и легко читается.

**В первой главе** приведен литературный обзор по теме диссертации. Представлены современные взгляды на этиологию и патогенез сахарного диабета 2-го типа, а также существующие фармакотерапевтические подходы. Особое внимание уделено проблеме потери функциональной активности  $\beta$ -клеток и смене парадигмы лечения СД2 от гликемического контроля к защите (обеспечению секреторного покоя) и стимуляции регенерации  $\beta$ -клеток. Отмечены проблемы современной разработки лекарственных средств и пути их решения, предлагаемые хемоинформатикой и другими информационными технологиями.

**Во второй главе** описаны материалы и методы исследования. Автором использован комплексный подход, вещества изучены на различных моделях в зависимости от стадии исследования: отдельные ферменты, первичные клеточные линии, животные здоровые и с моделированной патологией. Применен широкий спектр биохимических и иммуноферментных методик с различными способами детекции сигнала. При моделировании СД2 использована современная методика содержания животных на высокожировой диете, воспроизводящая ключевые звенья патогенеза заболевания. Использованные методы адекватны поставленным задачам диссертации. Количество животных, использованных в экспериментах, позволяет получить достоверные результаты. Проведена соответствующая статистическая обработка результатов.

Материалы собственных исследований изложены в главах с третьей по седьмую.

**В третьей главе** описывается разработанная система мишень-ориентированного поиска антидиабетических соединений. Представлен методический подход для оценки и приоритизации инновационных мишеней разработки ЛС, использующий комплекс геномных, протеомных, экспериментальных и клинических данных. В результате выбраны четыре инновационные антидиабетические мишени – киназа гликогенсинтазы 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), протеинтирозинфосфатаза 1 $\beta$  (PTP1 $\beta$ ), АМФ-активируемая протеинкиназа (АМПК) и глюкокиназа (GSK). Подробно описана технология отбора соединений для экспериментального исследования с учетом критериев лекарственного подобия и подструктурных маркеров токсичности.

**В четвертой главе** приведены результаты экспериментального скрининга ингибиторов GSK3 $\beta$  и изучения фармакологической активности наиболее перспективных соединений. Изучение библиотеки соединений выявило перспективный скаффолд ингибиторов GSK3 $\beta$  – 2-оксиндолы, 16 из которых проявляют субмикромольную активность, наиболее активным из которых явился 3-(2-пиридинилметил)-2-оксиндол (K-167). Соединение K-167 в исследованиях на животных моделях подтвердило антигипергликемическую, противодиабетическую, антитромботическую активность и низкую острую токсичность.

**В пятой главе** описаны результаты экспериментального скрининга активаторов AMPK и изучения фармакологической активности наиболее перспективных соединений. В экспериментальном исследовании 83 соединений было определено, что 36 из них активируют AMPK человека на 50% или более при концентрации 10 мкМ. Наибольшая активность была обнаружена у 2'-карбонитрил-дифенилзамещенных конденсированных производных бензимидазола, и увеличение размера гетероциклического ядра положительно коррелировало с активацией AMPK. Два наиболее активных из них (BIF-68 и BIF-69) затем были протестированы на воспалительную активацию перитонеальных макрофагов, где они ингибировали синтез оксида азота с IC<sub>50</sub> около 5 мкМ и низкой цитотоксичностью. Несмотря на их высокую активность *in vitro*, BIF-69 и другие идентифицированные активаторы не проявляли гипогликемической активности, вероятно, из-за плохой проницаемости мембран клеток, однако они являются ценной отправной точкой для дальнейшей оптимизации и разработки новых активаторов AMPK с противодиабетической активностью.

**В шестой главе** приведены результаты экспериментального скрининга ингибиторов RTP1 $\beta$  и изучения фармакологической активности наиболее перспективных соединений. Скрининг сфокусированной библиотеки из 51 соединения выявил 12 активных ингибиторов RTP1 $\beta$  с активностью в микромольном диапазоне. Из двух ведущих соединений, AZH-141a и BIF-10, AZH-141a не только ингибирует RTP1 $\beta$ , но и активирует AMPK. AZH-141a проявлял гипогликемический эффект при введении крысам и улучшал толерантность к глюкозе, массу тела и липидный профиль крови. Полученные результаты подтверждают концепцию о том, что модулирование активности сразу нескольких мишеней терапии СД2 может оказывать значимый плейотропный противодиабетический эффект.

**В седьмой главе** изложены результаты экспериментального скрининга активаторов GSK и изучения фармакологической активности наиболее перспективных соединений. Был проведен скрининг библиотеки целенаправленных соединений, который выявил 27 соединений, подтвержденных в качестве активаторов GSK, с эффективностью 21,3%. Значения EC<sub>50</sub> обнаруженных соединений варьируются от 19 до 82 мкМ. Был идентифицирован новый класс активаторов GSK – соединения биспиридоксина; наибольшую активность проявили соединения NP-0001, NP-0006, NP-0061, NP-0063. Фармакокинетические и токсикологические характеристики наиболее активных соединений отличаются высокой безопасностью и благоприятными физико-химическими свойствами. Оценка показала отсутствие цитотоксичности до 250 мкМ. Последующая оценка показала, что NP-0001 не был эффективен при пероральном/внутрибрюшинном введении до 300 мг/кг, тогда как NP-0006 улучшал толерантность к глюкозе без развития гипергликемии при введении доз 300 и 500 мг/кг внутрибрюшинно. NP-0006 также нормализует содержание гликогена в печени, повышает

активность GSK на 78,4% и снижает массу тела при внутрибрюшинном введении мышам DIO-C57bl/6j. Низкая острая токсичность делает его многообещающим кандидатом для дальнейшей оптимизации, учитывая ценную способность стимулировать регенерацию  $\beta$ -клеток поджелудочной железы мышей с сахарным диабетом.

**Восьмая глава** посвящена обсуждению результатов исследования. Показана важность терапевтических стратегий, направленных на сохранение функций и сохранение массы  $\beta$ -клеток. Обоснована перспективность фармакологического воздействия на киназные каскады для коррекции метаболических нарушений, связанных с инсулинорезистентностью, и противодействия системному воспалению и метавоспалению, а также поддержанию или восстановлению функциональной массы  $\beta$ -клеток, т.е. плеiotропному воздействию на ключевые факторы и звенья патогенеза СД2. Обоснована необходимость рационального выбора мишеней для разработки ЛС, предложенная технология мишень-ориентированного поиска сопоставлена с аналогичными подходами. Обобщены и обсуждены в сравнении с литературными данными результаты изучения антидиабетической активности соединений-лидеров.

Диссертация завершается выводами и практическими рекомендациями, которые соответствуют поставленным целям и задачам исследования. Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и заключения диссертанта следует признать высокой, что обеспечивается как количественной стороной изученного материала, так и качеством его обработки.

#### **Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации**

Автореферат диссертации адекватно отражает основное содержание диссертационного исследования, полностью соответствует разделам, положениям и выводам диссертационной работы.

#### **Вопросы и замечания**

Принципиальных замечаний и возражений по диссертационной работе нет. Вместе с тем, в ходе рецензирования диссертационной работы возникли следующие вопросы, требующие дополнительного уточнения, но не затрагивающие существа работы:

1. В работе сделан акцент на выбор инновационных мишеней терапии сахарного диабета. Каковы критерии, определяющие «инновационность» мишени?
2. Существует целый ряд экспериментальных моделей сахарного диабета. Почему в качестве основной в работе была выбрана именно модель с высокожировой диетой?
3. Киназа GSK3B широко экспрессируется в различных тканях. Каковы вероятные побочные эффекты ингибиторов GSK3B?

### Заключение

Таким образом, диссертационная работа Бабкова Дениса Александровича на тему: «Мишень-ориентированный поиск антидиабетических соединений и их фармакологические свойства» на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как решение актуальной научной проблемы, имеющей важное значение для фармакологии – разработке системы мишень-ориентированного поиска соединений-регуляторов активности киназ, обладающих комплексными антидиабетогенными свойствами – снижающими периферическую инсулинорезистентность и системное воспаление, стимулирующих пролиферацию  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, нормализующих метаболизм глюкозы и липидов в условиях СД2, что соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор Бабков Денис Александрович заслуживает присуждения ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология.

### Официальный оппонент

заведующий кафедрой фармацевтической химии,  
фармакогнозии и организации фармацевтического дела  
факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО  
«Московский государственный университета имени М.В.  
Ломоносова», доктор фармацевтических наук, профессор

Каленикова Елена Игоревна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»  
Адрес: 119991, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1  
Тел: +7 (495) 939-10-00, E-mail: info@rector.msu.ru  
www.msu.ru

«16» мая 2023 года

Подпись Е.И. Калениковой подтверждаю

Декан Факультета фундаментальной медицины федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», академик РАН



  
Тсанков Всеволод Арсеньевич

**Сведения об официальном оппоненте  
по диссертации Бабкова Дениса Александровича «Мишень-ориентированный поиск антидиабетических соединений и их фармакологические свойства», на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология**

Ф.И.О. оппонента	Каленикова Елена Игоревна
Учёная степень	доктор фармацевтических наук
Шифр и наименование специальностей, по которым защищена диссертация	14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология
Ученое звание	профессор
Полное наименование организации, являющейся основным местом работы оппонента	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
Занимаемая должность	Заведующая кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины
Почтовый индекс, адрес	119991 г. Москва, Ломоносовский проспект, д.27, корп. 1
Телефон	(495) 932 88 14 тел./факс: (499) 726 55 47
Адрес электронной почты	eikaleni@fbm.msu.ru eikaleni@yandex.ru
Список основных публикаций официального оппонента по профилю диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Поварова О.В., Городецкая Е.А., Каленикова Е.И., Медведев О.С. Метаболические маркеры и окислительный стресс в патогенезе ожирения у детей // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2020. – Т. 65. – № 1. – С. 22-29.</li> <li>2. Dudylyna A.L., Ivanova M.V., Ruuge E.K., Kalatanova A.V., Makarov V.G., Kalenikova E.I., Makarova M.N., Shumaev K.B. The generation of superoxide radicals by cardiac mitochondria and the antioxidant effect of the water-soluble form of ubiquinol-10 // Biophysics. – 2019. – Т. 64. – № 2. – С. 203-208.</li> <li>3. Kozaeva L.P., Gorodetskaya E.A., Kalenikova E.I., Medvedev O.S., Ruuge E.K. Beneficial effect of coenzyme Q10 injection on nitric oxide-related dilation of the rat aorta // European Journal of Pharmacology. – 2017. – Т. 794. – С. 15-19.</li> <li>4. Kalenikova E.I., Gorodetskaya E.A., Obolenskaya O.N., Shapavo N.S., Medvedev O.S., Makarov V.G. Pharmacokinetics and tissue distribution of oxidized and reduced coenzyme Q10 upon intravenous administration // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2021. – Т. 55. – № 7. – С. 633-637.</li> <li>5. Хатламаджиян М.Г., Харитоновна Е.В., Щербакова Л.Н., Каленикова Е.И., Медведев О.С., Алексеенкова М.В., Панина О.Б. Роль антиоксидантов в комплексной терапии</li> </ol>



	<p>пациенток с эндометриоз-ассоциированным бесплодием // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2020. – Т. 19. – № 6. – С. 28-33.</p> <p>6. Хатламаджиян М.Г., Харитоновна Е.В., Щербакова Л.Н., Каленикова Е.И., Медведев О.С., Алексеенкова М.В., Панина О.Б. Роль антиоксидантов в комплексной терапии и пациенток с эндометриоз-ассоциированным бесплодием // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2020. – Т. 19. – № 6. – С. 28-33.</p>
--	--

Официальный оппонент

Е.И. Каленикова

Подпись доктора фармацевтических наук, профессора Елены Игоревны Калениковой подтверждаю.

Декан факультета фундаментальной  
медицины Федерального государственного  
бюджетного образовательного учреждения  
высшего образования «Московский  
государственный университет имени М.В.  
Ломоносова»,  
Академик РАН



В.А. Ткачук

Председателю диссертационного  
Совета 21.2.005.02  
на базе Федерального государственного  
бюджетного образовательного учреждения  
высшего образования «Волгоградский  
государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения РФ  
Академику РАН, д.м.н., профессору  
В.И. Петрову  
(400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1)

### СОГЛАСИЕ ОППОНЕНТА

Я, Каленикова Елена Игоревна, доктор фармацевтических наук по специальности 14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела Факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», даю свое согласие выступить в качестве официального оппонента по диссертации Бабкова Дениса Александровича «Мишень-ориентированный поиск антидиабетических соединений и их фармакологические свойства», представленной на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

Членом экспертного совета ВАК не являюсь.

О месте и дате защиты проинформирована.

« 28 » декабря 2022г.



Подпись

Подпись доктора фармацевтических наук, профессора Елены Игоревны Калениковой подтверждаю

Декан  
Факультета фундаментальной медицины  
ФГБОУ ВО «Московский государственный  
университет имени М.В. Ломоносова»  
Академик РАН  
119192, Москва, Ломоносовский пр., д. 27, корп. 1  
Тел.: +7 (495) 932-88-14  
E-mail: info@fbm.msu.ru



В.А. Ткачук