

## ВІДГУК

рецензента – професора кафедри фармацевтичної хімії, доктора фармацевтичних наук Северіної Ганни Іванівни на дисертаційну роботу **Бовсуновської Юлії Василівни** на тему «**Стандартизація підходів до синтезу субстанції Еноксапарину натрію**», подану у спеціалізовану вчену раду ДФ 64.605.074 Національного фармацевтичного університету МОЗ України, що утворена для розгляду та проведення разового захисту дисертації на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація»

**Актуальність теми.** Дисертаційна робота Бовсуновської Юлії Василівни на тему «Стандартизація підходів до синтезу субстанції Еноксапарину натрію» присвячена актуальній та важливій темі сучасної фармацевтичної науки – дослідженню факторів, які впливають на симілярність субстанції Еноксапарину натрію до оригінальних субстанцій Clexane® та Lovenox® (Sanofi-Aventis), оптимізацію та стандартизацію методик синтезу його субстанції.

Використання низькомолекулярних гепаринів, зокрема Еноксапарину натрію, наразі є найбільш поширеним методом профілактики венозного тромбоемболізму. Це зумовлено значущими перевагами даної групи препаратів щодо нефракціонованого гепарину, насамперед – це прогнозована антикоагулянтна активність, висока клінічна ефективність, мінімальний вплив на функцію тромбоцитів, пролонгований ефект та, відповідно, скорочення частоти введень, а також менша ймовірність розвитку побічних ефектів. Лікування гострих коронарних синдромів, а саме нестабільної стенокардії та гострого інфаркту міокарда не обходиться без застосування низькомолекулярних гепаринів і з 2012 року їх рекомендовано Європейським товариством кардіологів для лікування хворих з гострим інфарктом міокарда з підйомом сегмента ST. Важливість Еноксапарину натрію стала очевидною в період пандемії SARS-CoV-2 у 2019 році, оскільки однією з ключових проблем коронавірусної інфекції є виникнення респіраторного дистрес-синдрому, асоційованого з патологічним протромбіновим станом з послідовним розвитком тромбозу судинної мережі легень. Застосування Еноксапарину натрію дозволило знизити смертність шляхом нормалізації гемодинамічних показників та супутньої протизапальної дії.

Слід також зазначити, що венозні тромбоемболічні ускладнення є потенційно небезпечними ускладненнями для життя у хворих, які перенесли хірургічне втручання та є провідною причиною смерті 10—12 % госпіталізованих пацієнтів. В період повномасштабного вторгнення Росії тромбопрофілактика під час

оперативного втручання вийшла на новий критично значущий рівень для виживання пацієнтів.

Враховуючи наведене, авторка мала суттєву платформу актуальності для планування та реалізації досліджень щодо опрацювання раціональних підходів синтезу Еноксапарину натрію українського виробництва, які б дозволили одержати субстанцію еквівалентну до оригінаторів. Тож актуальність теми дисертаційного дослідження є очевидною та безперечною.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.** Дисертаційна робота виконана згідно з планами науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету за темою: «Органічний синтез та аналіз БАР, розробка лікарських засобів на основі синтетичних та напівсинтетичних субстанцій» (№ державної реєстрації 0114U000943).

**Наукова новизна одержаних результатів.** Наукова новизна роботи не викликає сумнівів та ґрунтується на магістральному результаті – оптимізації та відпрацюванні методики синтезу активного фармацевтичного інгредієнта Еноксапарину натрію. Хотіла б зазначити декілька конститутивних моментів новизни рецензованого дослідження:

- вперше реалізовано дослідження щодо встановлення кореляції між технологічними параметрами синтезу напівпродуктів та готової АФІ Еноксапарину натрію та показниками якості субстанції, що описані у фармакопейній монографії;
- доведено та охарактеризовано вплив параметрів технологічного процесу на внутрішньоструктурні характеристики субстанції, зокрема олігосахаридний склад та кількість специфічних структур на відновлюваних та невідновлюваних кінцях, послідовність структурних елементів молекули та розподіл високо- та низькомолекулярних олігосахаридних ланцюгів, що є вирішальними для якості готової субстанції;
- визначено ключові технологічні параметри синтезу, які дозволяють наблизити Еноксапарину натрію до оригінальних Clethane® та Lovenox®.
- схарактеризовано можливість промислового синтезу та очищення Еноксапарину натрію та його напівпродуктів з позицій «зеленої» хімії.

**Практичне значення одержаних результатів.** У роботі наведено системне та комплексне практичне вирішення наукового завдання дослідження факторів, що впливають на структурну симілярність Еноксапарину натрію. Визначені провідні чинники технологічних параметрів синтезу, які впливають на якісний та кількісний склад АФІ. Імплементовано ряд принципів «зеленої» хімії, зокрема скорочено час синтезу бензетонієвої солі гепарину на 2 год., бензилового естеру гепарину на 3 год., зменшення температури синтезу технічного Еноксапарину натрію на 3 °С, і можливість використання регенованого метанолу. Методику синтезу

Еноксапарину натрію апробовано на промислових дільницях АТ «Фармак», що окреслює можливість напрацювання зразків субстанції у промислових масштабах та підтверджує практичне значення одержаних результатів (акт впровадження від 14.09.2023)

Крім того, фрагменти роботи впроваджено в навчальний процес і наукову роботу кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького, кафедри фармацевтичної хімії Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського, кафедри фармацевтичної хімії Запорізького державного медичного університету.

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій дисертації, їх достовірність.** Експериментальні дослідження виконані на високому науковому рівні, що забезпечено використанням сучасних методів синтезу та фізико-хімічних досліджень. Зазначу, що структурні особливості проміжних продуктів синтезу визначалися  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопією, а технічного та очищеного Еноксапарину натрію – 2D ЯМР (HSQC), а також методом ексклюзійної хроматографії (SEC). Результати аналізу порівнювалися з результатами аналізу оригінального Сlexane, посилаючись на базу даних, сформовану інститутом Ronzoni. Слід відзначити, що контроль якості проміжних та кінцевого продукту також здійснювався відповідно до вимог ДФУ та внутрішньої специфікації АТ «Фармак» методом атомно-абсорбційної спектрометрії для вимірювання кількості натрію, методом ГХ для визначення залишкових кількостей органічних розчинників, ВЕРХ застосовувалась для аналізу вмісту 1,6-ангідропохідних, вмісту бензилового спирту, кількісне визначення та специфічна абсорбція аналізувались методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ і видимих областях.

Наукові положення, висновки і рекомендації, пояснення шляхів перебігу досліджуваних реакцій та впливу різноманітних факторів на їх перебіг, які сформульовані в дисертаційній роботі, є достатньо обґрунтованими і достовірними. Висновки за окремими розділами та загальні висновки є науково обґрунтованими, викладені досить чітко, коректно та відповідають завданням.

**Повнота викладення дисертації в опублікованих працях.**

За результатами дисертації опубліковано 6 наукових робіт, з них 3 статті у наукових фахових виданнях (зокрема 2, в журналі що індексується базою даних Scopus), 3 тез доповідей у матеріалах конференцій. Вважаю, що опубліковані результати достатньо повно відображають зміст дисертаційної роботи.

**Оцінка структури та змісту дисертації.** Дисертація оформлена згідно з Вимогами до оформлення дисертації, затвердженими наказом Міністерства освіти та науки № 40 від 12.01.2017 р.

Робота викладена на 160 сторінках машинописного тексту (основний текст – 133 с.), складається з анотації, вступу, п'яти розділів, висновків, списку використаних джерел, що містить 113 найменувань, та додатків.

У **першому розділі** обговорено характеристики вихідного гепарину натрію та його низькомолекулярних аналогів, розглянуті труднощі в їх аналізі та підходи при підборі методик аналізу. Описані аналітичні методики контролю якості як гепарину та і його низькомолекулярних аналогів та критерії, за якими генеричні молекули можуть вважатися еквівалентними оригінальному. З огляду літературних джерел зроблено висновок про відсутність даних щодо аналізу факторів, які впливають на структуру та показники якості Еноксапарину натрію в умовах лабораторного та промислового синтезу.

**Другий розділ** присвячений вибору методики синтезу Еноксапарину натрію та розробці алгоритму експерименту в якому деталізовано методологію та етапи досліджень, а також розроблене «дерево рішень» при оптимізації методики синтезу Еноксапарину натрію. В розділі описані методики контролю якості отриманих зразків бензетонієвої солі та бензилового естеру гепарину, технічного та очищеного Еноксапарину натрію. Проаналізовано можливі шляхи «озеленення» кожної стадії синтезу.

У **третьому розділі** опрацьовані та запропоновані оптимальні технологічні параметри синтезу напівпродуктів – бензетонієвої солі гепарину та бензилового естеру з точки зору якості кінцевого продукту та принципів «зеленої» хімії, а також досліджено вплив часу витримки реакційних мас в процесі синтезу напівпродуктів на якість та композиційний склад молекули Еноксапарину.

**Четвертий розділ** присвячений стадії деполімеризації та оптимізації технологічних параметрів синтезу та одержанню власне субстанції Еноксапарину натрію та дослідженню його очищення в різних співвідношеннях MeOH:H<sub>2</sub>O з метою досягнення симілярності за олігосахарадними фракціями до оригінального Сlexane. Критичними параметрами на стадії деполімеризації були визначені кількість луку для реакції, час витримки та температура реакційної маси.

У **п'ятому розділі** проведена оптимізація «стандартних» умов синтезу та очищення Еноксапарину натрію шляхом визначення технологічних параметрів ключової стадії його синтезу – співвідношення луг/естер та температури реакційної маси. Зразки, отримані за співвідношенням луг/безиловий естер гепарину 0,06 та температури – 57 °С найбільш відповідають оригінатору за композиційним складом та розподілом молекулярної маси. В цьому розділі визначено, що час витримки реакційної маси впливає на процес 6-О-десульфатації кінцевих залишків молекули, що призводять до формування «відбитків пальців» Еноксапарину – 1,6-ангідроструктур.

**Зауваження щодо змісту та оформлення дисертації.** Дисертаційна робота написана сучасною науковою мовою, логічно викладена та добре структурована. Під час рецензування дисертації та публікацій здобувача порушень академічної доброчесності виявлено не було. Загальна оцінка роботи безумовно є позитивною. Поряд з позитивними характеристиками дисертації варто зазначити деякі зауваження:

1. ст. 50. на рис. 2.1 та рис. 4.1 зі схемою синтезу Еноксапарину натрію в останній стадії зазначено використання пероксиду гідрогену, тоді як далі в таблиці 2.1 серед реагентів не вказаний, як і в подальших методиках синтезу та жодним чином не обговорюється в тексті;
2. ст. 82. у другому розділі одним з висновків є «...обґрунтовано використання розчинників, що використовуються у процесі», на жаль, в самому розділі обґрунтування вибору розчинників не наводиться, обговорення токсичності та властивостей розчинників наведено у розділі 3;
3. ст. 92 рис. 3.5 на спектрі  $^1\text{H}$  ЯМР зображений синглетний сигнал близько 2,04 м.ч., інтегральна інтенсивність якого в різних зразках складає 0,50-0,52 і віднесена автором до метильної групи ацетильного фрагменту гепарину, що не виглядає коректним;
4. в методиках синтезу в експериментальних частинах не вказано кількість моль речовин, якщо для високомолекулярного гепарину це зрозуміло, то для інших речовин варто було б вказати, або хоча б вказати масове співвідношення як це подано у розділі 3;
5. не зазначені виходи продуктів реакції, зокрема бензетонієвої солі гепарину (ст. 94), технічного Еноксапарину натрію (ст. 106)

Під час аналізу виникли деякі питання, які варто обговорити під час захисту:

1. Чи не вважаєте необхідним дослідження в субстанції Еноксапарину натрію домішок вихідних реагентів та проміжних продуктів синтезу, наприклад, залишку бензетонію хлориду або бензилхлориду, який міг повністю не омилитися за вказаних умов до бензилового спирту, який ви і визначали як домішку?
2. Чим ви можете пояснити таку значущу різницю (майже в 40 разів) в залишковій кількості метанолу при очищенні субстанції Еноксапарину натрію при співвідношенні метанол:вода – 4:1 та 1:1 (343 ppm D475 та 13421 ppm D478)? Вже в 5 розділі саме очищення при співвідношенні 1:1 дає залишкову кількість 1110 ppm (Таблиця 5.8), з чим ви пов'яжете зменшення цього показника до оптимальних значень? І як домогтися стабільності цього показника, оскільки саме це співвідношення дозволяє отримати зразки, що краще співставні з фракційними діаназонами Clexane® та Lovenox®?

Проте, робота мені сподобалася, а наведені зауваження і запитання мають характер наукової дискусії та жодним чином не впливають на високу оцінку дисертаційної роботи.

**Рекомендації щодо використання результатів дослідження.** Одержані в результаті дисертаційного дослідження дані розширюють можливості для українських виробників, оскільки відпрацьовані та оптимізовані умови та параметри синтезу дозволяють синтезувати субстанцію Еноксапарину натрію симілярну до оригінальних Clexane® та Lovenox® та відповідно, окреслює можливість напрацювання зразків субстанції у промислових масштабах.

Також, слід продовжити впровадження результатів дослідження у навчальний процес при викладанні професійно орієнтованих дисциплін фармацевтичного та хімічного профілю.

**Висновок.** За результатами аналізу дисертаційної роботи Бовсуновської Юлії Василівни на тему: «Стандартизація підходів до синтезу субстанції Еноксапарину натрію», наукових публікацій, в яких висвітлені основні її положення, можна зробити висновок, що за обсягом проведених досліджень, актуальністю, науковою новизною, практичною значущістю, ступенем обґрунтованості наукових положень та висновків вона відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44, а її автор, Бовсуновська Юлія Василівна, заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» галузі знань 22 «Охорона здоров'я».

Рецензент:

Професор ЗВО кафедри фармацевтичної хімії  
Національного фармацевтичного університету,  
доктор фармацевтичних наук,  
професор

Ганна СЕВЕРІНА

Підпис д. фарм. н., проф. Ганни Северіної засвідчую  
Начальник відділу кадрів НФаУ



Орина ПРИСІЧ