

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

**Егоровой Анны Петровны**

**на тему «Синтез и исследование производных изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола, обладающих противовирусной активностью»,**

представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03 – «Органическая химия»

### **Актуальность работы.**

Важной и актуальной задачей современной органической и медицинской химии является направленный синтез соединений с полезными фармакологическими свойствами, а также установление взаимосвязи между этими свойствами и структурой полученных веществ. В частности, разработка новых противовирусных лекарственных средств представляет собой актуальную прикладную задачу, учитывая растущую медицинскую проблему вирусных инфекционных заболеваний, а также их потенциально пандемический характер, усугубляющийся быстрым появлением лекарственно резистентных штаммов. Диссертационная работа **Егоровой Анны Петровны**, посвященная синтезу и изучению биологических свойств новых противовирусных агентов, активных в отношении самых часто встречающихся в мире инфекционных агентов – энтеро- и риновирусов рода *Enterovirus* семейства *Picornaviridae*, несомненно обладает **высокой важностью и актуальностью**.

Следует отметить, что разработка новых противовирусных агентов является весьма непростой областью исследований. Это связано с относительно небогатым выбором биомишеней для активных соединений; с высокой частотой возникновения вирусных мутаций, зачастую приводящих к дезактивации лекарств; с тем обстоятельством, что большую часть цикла своей жизнедеятельности вирус проводит внутри клетки инфицированного организма, защищающей его от внешних воздействий, в том числе от действия лекарств. В результате, для того чтобы быть успешным в клинической практике, противовирусное лекарственное средство должно обладать уникальным набором фармакологических характеристик. В этом смысле задача, поставленная автором настоящего исследования, является чрезвычайно сложной.

**Цель** представленного диссертационного исследования заключается в направленном дизайне и синтезе неописанных ранее производных класса изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола в качестве противовирусных агентов широкого спектра действия. Следует сразу отметить, что поставленные автором задачи, а именно: дизайн и синтез оригинальных производных изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола; изучение противовирусной активности полученных целевых соединений в отношении ряда энтеро- и риновирусов и выявление закономерностей структура-активность синтезированных производных были успешно реализованы.

**Структура и объем работы.** Диссертация построена по традиционной схеме и состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 129 наименований. Работа изложена на 156 страницах печатного текста и включает 24 рисунка, 57 схем и 12 таблиц.

Во «Введении» автор определяет актуальность и цели поставленного исследования, а также кратко охарактеризовывает полученные результаты, составляющие научную новизну и практическую значимость работы.

**Литературный обзор** логично построен, написан хорошим языком, дает достаточно полное представление о изучаемой проблеме за последние двадцать лет. Целью обзора являлось обобщение современных имеющихся знаний о синтезе, взаимосвязи структура-активность и проблемах разработки капсид-связывающих ингибиторов как эффективных антиэнтеровирусных препаратов широкого спектра действия. Описанию структуры и жизненного цикла энтеровируса посвящена первая глава литературного обзора. Далее в литературном обзоре рассмотрено поэтапное развитие так называемых «WIN-соединений», приведшее к открытию плеконарила, а также последующие попытки его модификации с целью улучшения биологических свойств. Особое внимание уделено описанию синтетических методов получения библиотек соединений и выявленным ранее биологическим свойствам описанных агентов. В заключительной главе представленного обзора кратко рассмотрен синтез и биологические свойства ингибиторов капсида других химических классов. Следует отметить, что автором сделан важный вывод о ключевых структурных особенностях, требуемых для проявления целевой биологической активности и необходимых фармакологических параметров.

Раздел диссертации, посвященный **обсуждению** полученных автором **результатов** собственных исследований, начинается с дизайна синтеза новых веществ, основанного на развитии противовирусных WIN-соединений. Автором работы была поставлена задача – исследовать, как различные заместители в третьем положении изоксазольного цикла будут влиять на ингибирование энтеровирусов. Для решения этой задачи был синтезирован ряд целевых производных изоксазол-5-илпропоксибензил-1,2,4-оксадиазола со сложноэфирной, амидной и N-замещенной амидной группами, а также незамещенным и замещенными фенильными кольцами. Автором подробно описаны все стадии получения целевых соединений, включая обсуждение механизма исследуемых реакций. Цитотоксичность и противовирусная активность полученных производных изоксазол-5-илпропоксибензил-1,2,4-оксадиазола была исследована в отношении серотипов Коксаки-вируса В3 и серотипов риновируса (А2, В5 и В14) в анализе ингибирования цитопатического эффекта. По результатам проведения анализа взаимосвязи структура-противовирусная активность автором наиболее перспективными заместителями в изоксазольном цикле были выбраны метокси- и этоксикарбонильные, а также диметилкарбамоильная группы.

Дальнейшая работа Егоровой А.П. была сосредоточена на получении производных изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола, имеющих различные по электронным и стерическим эффектам заместители в фенильном кольце, для изучения широты их биологического действия. Особое внимание было уделено получению производных, имеющих фрагмент амино-фенил-5-трифторметил-1,2,4-оксадиазола. Эта не самая простая задача была решена с использованием в качестве восстановителя дигидрата хлорида олова в этиловом спирте. В дальнейшем промежуточный амин был вовлечен в синтез целевых соединений. После изучения цитотоксических и противовирусных свойств библиотеки синтезированных веществ, автор делает выбор наиболее перспективных агентов.

Развивая поиск новых эффективных противовирусных агентов, автор ставит себе целью провести синтез аналогов соединений лидеров, в которых будет изменен тип линкера между фармакологически важными фрагментами. В результате реализации разработанных автором синтетических схем, были синтезированы новые соединения, в которых в качестве линкера были сера- и азот-содержащие алифатические фрагменты, либо биоизостерные пиперазиновые гетероциклы. Указанные вещества были проверены в качестве антиэнтеровирусных агентов и проведено подробное изучение связи структуры с активностью.

В заключение раздела, посвященного усилиям в области синтеза новых соединений, диссертантом была поставлена задача выявления важности наличия гетероциклического фрагмента 1,2,4-оксадиазола на проявляемую противовирусную активность. Для этого, в представленной работе автором был синтезирован ряд производных, в которых заменяли указанный 1,2,4-оксадиазол на различные алкил и ариламины. В результате скрининга активности соединений в отношении Коксаки вируса и анализа взаимосвязи структуры-активность было показано, что соединение, содержащее диметилкарбамоильную группу в изоксазольном цикле и тиоморфолинкарбонильный фрагмент на месте 5-трифторметил-1,2,4-оксадиазола, превосходило соединения такого же строения с этим гетероциклом в отношении Коксаки-вируса.

Вторая часть обсуждения результатов, полученных в ходе диссертационного исследования, посвящена изучению индукции изофермента цитохрома P450 соединением 3-(3-метил-4-(3-(3-N,N-диметилкарбамоил-изоксазол-5-ил)пропоксифенил)-5-трифторметил-1,2,4-оксадиазолом. Изофермент CYP3A4 высоко индуцируем и участвует в биотрансформации примерно половины всех лекарств, которые подвергаются окислительному метаболизму. Его индукция представляется одной из ключевых проблем капсид-связующего препарата плеконарила, которая была найдена ранее в ходе клинических исследований. Полученные автором результаты позволили заключить, что указанное соединение менее вероятно представляет риск индукции изофермента CYP3A4, по сравнению с плеконарилом. Небольшой по объему, но важный с точки зрения фармакологических

характеристик, раздел по изучению фармакокинетических параметров соединения-лидера, приведен автором в конце части, посвященной обсуждению результатов.

В экспериментальной части диссертационного исследования приведены спектральные характеристики более 120 новых соединений, что подтверждает большой объем синтетической работы соискателя по поиску новых агентов. Строение выделенных автором веществ подтверждено методами  $^1\text{H}$  ЯМР и элементным анализом.

**Научная новизна** рецензируемой работы заключается в получении новых фундаментальных данных о строении и биологических свойствах новых аналогов плеконарила. Так, в области органической химии важным моментом является описание и реализация единой препаративной схемы получения производных изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола с различными заместителями в третьем положении изоксазольного цикла и в третьем положении фенильного кольца. Егоровой А.П. впервые осуществлен синтез неизвестных ранее аналогов изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола с модификациями алкильной цепочки и заменённым на алкил- и ариламида оксадиазольным циклом. Кроме того, показано, что 3-N,N-диметилкарбамоилизоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазолы обладают высокой активностью в отношении спектра энтеро- и риновирусов. Обнаружено, что вещества с небольшими функциональными группами в третьем положении центрального, фенильного, кольца проявляют более высокую ингибирующую способность, чем соединения с объемными заместителями. Выявлено, что структура заместителя в третьем положении изоксазольного цикла является критичной для преодоления вирусной резистентности. Впервые изучена роль алкильного связующего мостика и 1,2,4-оксадиазольного цикла в проявлении противоэнтеровирусной активности.

**Практическая значимость.** В результате биологического скрининга новых соединений обнаружено два активных вещества, действующих в отношении всех изучаемых в данной работе плеконарил-чувствительных и плеконарил-резистентных вирусов со значениями ингибирующей концентрации  $IC_{50}$  от 0.003 до 7.63 мкМ. Полученные в данной диссертационной работе результаты чрезвычайно важны в практическом плане, так как, во-первых, получен перспективный лекарственный кандидат, а во-вторых, на основе полученных теоретических и экспериментальных данных созданы предпосылки для разработки новых перспективных физиологически активных веществ.

Основные результаты, полученные автором, представляют интерес для специалистов, работающих в области изучения органической и медицинской химии, и могут быть использованы рядом ведущих отечественных научно-исследовательских организаций.

Внимательное прочтение диссертационной работы позволяет заключить **успешное решение поставленных задач и достижение цели**, обозначенной

соискателем. Сформулированные научные положения и выводы являются обоснованными, автореферат диссертации изложен логично и отражает содержание исследования. Список используемых публикаций оформлен в соответствии с правилами.

По результатам проведенных исследований опубликовано 4 статьи в ведущих зарубежных и российских журналах и 3 тезиса докладов на научных конференциях. Следует также особо отметить, что три из четырех статей опубликованы в журналах, относящихся к 1 квартилю.

**Автореферат диссертации** в полной мере отражает содержание и выводы диссертационной работы.

Диссертант, безусловно, обладает хорошей квалификацией химика-синтетика, т.к. поставленные цели и задачи, а также объекты, с которыми он работал, очень не простые по структуре и требуют внимательного и аккуратного отношения.

В работе отсутствуют ошибки, которые могли бы сказаться на обоснованности выводов и заключений, сделанных диссертантом. В то же время некоторые замечания, касающиеся оформления работы, необходимо отметить.

1. В литературном обзоре автор располагает схему синтеза соединений зачастую не сразу после описания этого синтеза, а после дополнительных абзацев, посвященных дальнейшим работам. Это несколько затрудняет восприятие текста.
2. В работе присутствует ряд опечаток: так, на стр. 15, схема 2 ошибка в изображении структуры 13; на стр. 51 на рисунке заместители обозначены R2 и R3, и тут же в схеме синтеза они уже обозначаются как R4 и R5; стр. 70 – ошибка в номере соединения - вместо 43 написано 40; стр. 79, схема 37 - не расшифрован заместитель R у структуры 68 а,б.
3. В некоторых случаях, автор после схемы реакции приводит описание возможного механизма ключевых стадий. Это, безусловно, полезно как для читателя, так и для автора, однако, правильнее писать не «предполагаемая схема протекания реакции», а предполагаемый механизм.
4. На стр. 48 перед таблицей 1 целесообразно было бы привести номера соединений под изображенными структурами, так читателю было бы гораздо нагляднее. В той же таблице сокращение «н/п» не расшифровано. Возможно, это опечатка.
5. На стр. 57 есть описание биологических свойств веществ в отношении мутантных Коксаки-вирусов В3 (I1207M и I1207T). Однако автор не уточняет какие именно вирусы использовались. Это резистентные вирусы или полученные дополнительно для изучения механизма действия методами геномной инженерии, например, с использованием методов сайт направленного мутагенеза.
6. В таб. 3 на стр. 58 данные IC<sub>50</sub> приведены до 3 знака после запятой, что является не корректным, особенно при том, что не приведен доверительный интервал.
7. Основное замечание касается описанию физико-химических характеристик веществ. Так, для всех новых веществ приводятся данные спектров ЯМР Н1, в то

время как для полного описания новых органических соединений необходимо приводить также данные спектров C13. Особенно это касается тех соединений, структуру которых невозможно подтвердить только на основании данных ЯМР Н1. Так, например, в синтезе агентов, содержащих 1,2,4-оксадиазол, имеющий CF3 заместитель, данные протонного спектра никак не могут подтвердить образование такого фрагмента. Подтверждать синтез новых гетероциклических соединений необходимо с использованием полного набора физико-химических методов, даже наличие масс спектров высокого разрешения не является подтверждением.

8. Вызывает вопросы и описание экспериментальных процедур. Так, на стр 92 (и далее по тексту) не указывается какие загрузки исходных веществ в граммах были использованы. Приведенная экспериментальная процедура звучит так: «Смесь соответствующего бензонитрила 1, или 11а-ж, или 28 (1.0 моль), 5-хлоро-1-пентина (1.5 моль), растертого K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5.0 моль), KI (0.01 моль) в N-метилпирролидоне перемешивали при 65 °С в течение 24 ч» При этом не понятно, автор действительно работал с таким количеством вещества? Так, например, 1 моль бензонитрила это 103 грамма, а 5 моль углекислого калия это 690 грамм? Если имелось в виду соотношение реагентов, то принято писать эквиваленты. Либо это опечатки во всех экспериментах и использовались миллимолярные загрузки.

Сделанные замечания **не носят принципиального характера** и никак не влияют на общую весьма положительную оценку работы Егоровой А.П.. Результаты и выводы, сделанные на основании большого и тщательно выполненного эксперимента, не вызывают сомнений и возражений.

По результату рецензирования представленной к защите работы **Егоровой Анны Петровны** можно заключить, что рассматриваемая диссертация является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, посвященной разработке способов синтеза новых производных класса изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола, обладающих широким спектром противовирусной активности и выявление закономерностей структура-активность синтезированных производных. Данные результаты имеют высокую значимость, как для фундаментальной науки, так и в области практического применения.

По своему содержанию диссертация отвечает паспорту специальности 02.00.03 – Органическая химия в части формулы специальности: п. 1 – установление структуры и исследование реакционной способности органических соединений; п. 2 – направленный синтез соединений с полезными свойствами и новыми структурами. В части области исследований: п. 1 – выделение и очистка новых соединений; п. 3 – развитие рациональных путей синтеза сложных молекул; п. 7 – выявление закономерностей типа «структура – свойство».

По актуальности, новизне, уровню выполнения, объему, научной и практической ценности полученных результатов диссертация полностью отвечает требованиям,

предъявляемым к кандидатским диссертациям в «Положении о порядке присуждения ученых степеней», утвержденном постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (пункты 9-14), а ее автор **Егорова Анна Петровна**, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03 – Органическая химия.

**Официальный оппонент:**

Доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологически активных веществ НИОХ СО РАН (Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук)

Яровая Ольга Ивановна



03.09.2020

630090 г. Новосибирск, проспект Академика  
Лаврентьева, д. 9, Федеральное государственное  
бюджетное учреждение науки Новосибирский институт  
органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского  
отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН)  
Телефон:(383)330-88-50, +7913 9094763  
Факс:(383)330-97-52  
e-mail: ooo@nioch.nsc.ru (Яровая О.И.)

Подпись Яровой О.И. заверяю:  
Ученый секретарь НИОХ СО РАН  
К.х.н. Бредихин Р.А.

