

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу **Левшуковой Полины Олеговны** на тему «**Новые подходы к синтезу биологически активных производных 1,3,5-триазина**», представленную в диссертационный совет 21.2.063.01, созданный на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по научной специальности 3.4.2.

Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Актуальность темы исследований. Фрагмент 1,3,5-триазина входит в структуру многих биологически активных соединений. В частности, одни из наиболее ярких примеров – противоопухолевые препараты азациитидин и децитабин, в которых родство электронного строения 1,3,5-триазина и пиримидина позволяет модулировать синтез и свойства ДНК. Кроме того, небольшой размер гетероцикла позволяет использовать этот фрагмент в дизайне новых лекарственных препаратов. Они нашли применение в качестве стимуляторов дыхания, недеполяризующих миорелаксантов, противомикробных и антипротозойных средств, а также в сельском хозяйстве как гербициды и фунгициды.

Наиболее часто синтез производных 1,3,5-триазина строится на базе цианурхлорида посредством нуклеофильного замещения в положения 2, 4 и 6. Многостадийность этих подходов, ограничения в выборе допустимых нуклеофилов и зачастую низкие выходы ограничивают их использование и при этом актуализируют задачу поиска новых путей синтеза 1,3,5-триазинов.

До публикаций автора диссертационной работы на данную тему в литературе не было сведений о получении 2-алкил/арил-замещенных 1,3,5-триазинов взаимодействием 2,5-дизамещенных-4-гидрокси-6Н-1,3-оксазин-6-онов с 1,3-бинуклеофильными реагентами.

Диссертация выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по теме «Получение и изучение фармакологического действия биологически активных веществ (БАВ) с целью создания инновационных лекарственных средств» (государственная регистрация №01201252027).

Цель и задачи исследования. Автор работы изучила методы получения, строения, свойств и биологической активности ранее не описанных 2,4,6-тризамещенных производных 1,3,5-триазина. Для этого решались задачи по:

- разработке лабораторных способов получения новых производных 1,3,5-триазина путем рециклизации 2,5-дизамещённых-4-гидрокси-6*H*-1,3-оксазин-6-онов двуцентровыми 1,3-бинуклеофильными реагентами: алкил- и арилимидадами, *S*-метилизотиомочевинной.
- доказательству строения и индивидуальности синтезированных соединений с помощью современных методов анализа: ЯМР-спектроскопии (¹H и ¹³C), масс-спектрометрии, ИК-спектроскопии, элементного анализа, тонкослойной хроматографии (ТСХ).
- установлению потенциала биологической активности полученных соединений путем компьютерного анализа с помощью программ GUSAR и PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances).
- определению острой токсичности и изучению некоторых видов биологической активности синтезированных веществ *in vitro* и *in vivo*.
- разработке разработать параметры аттестации для первичного стандартного образца соединения с наиболее оптимальным соотношением активности и безопасности.

- доказыванию индивидуальности синтезированных соединений с помощью физико-химических методов анализа: РСА, ЯМР-, ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии, элементного анализа, ТСХ;
- установлению потенциала биологической активности полученных соединений путем компьютерного анализа с помощью программ GUSAR и PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances);
- определению острой токсичности и изучения биологической активности синтезированных веществ *in vivo*. Установить взаимосвязь «строение - биологическая активность»;
- изучению физико-химических свойств соединений с наилучшим профилем безопасности и эффективности в рамках разработки подходов к аттестации первичных стандартных образцов.

Научная новизна исследования. Работа Левшуковой П.О. – первое целенаправленное исследование рециклизации 2,5-дизамещенных-4-гидрокси-6H-1,3-оксазин-6-онов с участием 1,3-бинуклеофильных реагентов, в результате которого были синтезированы 45 новых производных 1,3,5-триазина, доказано их строение, разработан полный спектр аналитических методик для аттестации первичных стандартных образцов и контроля качества наиболее активных соединений, проведена валидация некоторых наиболее значимых методик.

Также изучена токсичность и биологическая активность 8 производных 1,3,5-триазина, проведена аттестация первичного стандартного образца нового соединения с наилучшим профилем эффективности-безопасности.

В частности, автор работы выяснила, что взаимодействие 2,5-дизамещенных-4-гидрокси-6H-1,3-оксазин-6-онов с 1,3-бинуклеофильными реагентами приводит к получению производных 1,3,5-триазина с выходом 43-88%. В дальнейшем замена среды реакции с пропанола на диметилсульфоксид (ДМСО) при температуре 95-98 °С позволила сократить время реакции до 1,0-3,5 ч. и получить целевые продукты с выходом 51-80%.

Исследования показали, что прогноз острой токсичности в программном обеспечении GUSAR для новых производных 1,3,5-триазина коррелирует с данными эксперимента *in vivo*. Данные соединения являются мало или практически нетоксичными.

Был определен потенциал биологической активности полученных триазинов *in silico*, при этом в эксперименте 2-фенил-4-(4-хлорфенил)-6-этил-1,3,5-триазин показал сравнимую с современными лекарственными препаратами противоопухолевую активность в отношении карциномы легкого человека. Для него был разработан и аттестован первичный стандартный образец.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно пунктам: 1. Исследование и получение биологически активных веществ на основе направленного изменения структуры синтетического и природного происхождения и выявление связей и закономерностей между строением и свойствами веществ; 2. Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств. **Теоретическая и практическая значимость работы.** Автор диссертации разработала лабораторные методы синтеза новых ранее не описанных 2,4,6-тризамещенных производных 1,3,5-триазина. Оценка острой токсичности и биологической активности полученных соединений показала, что наиболее перспективное соединение – 2-фенил-4-(4-хлорфенил)-6-этил-1,3,5-триазин. Для него разработан первичный стандартный образец. Проведена его аттестация.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс и научно-исследовательскую деятельность кафедры органической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-

фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Диссертационное исследование выполнено на высоком научном уровне. Использован комплекс теоретических, синтетических, технологических, физико-химических и фармакологических методов исследований, обеспечивающих получение эффективных и безопасных лекарственных средств. Применено современное технологическое и аналитическое оборудование. Результаты исследований статистически обработаны.

Личный вклад автора в общем объеме работ составляет не менее 95%. Все экспериментальные исследования выполнены лично автором либо при его непосредственном участии с соавторами научных публикаций. Автор лично выполнила основные этапы диссертационного исследования: провела поиск, систематизацию, обобщение литературных данных, подготовила и провела экспериментальные работы, обработала и проанализировала полученные результаты, оформила диссертацию и автореферат, а также представляла основные результаты исследований на научно-практических конференциях всероссийского и международного уровня.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций, а также 1 статья в издании, включенном в международные наукометрические базы данных Scopus и Web of science. Получены 2 патента РФ на изобретение.

Общая характеристика диссертационной работы. Материал изложен на 134 страницах машинописного текста формата А4, состоит из введения, обзора литературных данных, обсуждения результатов собственных экспериментов, экспериментальной части и выводов, содержит 27 таблиц и 71 рисунок. Библиография включает 80 ссылок.

Во **введении** соискателем обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и задачи, показана научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, представлены основные положения, выносимые на защиту.

В **первой главе** проведена систематизация известных методов синтеза 1,3,5-триазинов путем нуклеофильного замещения в цианурхлориде или рециклизацией 5- и 6-членных гетероциклических систем, описаны возможные механизмы химических реакций.

Вторая глава посвящена экспериментальным изысканиям по получению производных 1,3,5-триазинов посредством взаимодействия 2,5-дизамещенных-4-гидрокси-6*H*-1,3-оксазин-6-онов с 1,3-бинуклеофильными реагентами. Описаны оптимизационные процедуры и сделано заключение о наиболее оптимальных условиях синтеза. Доказано строение полученных соединений.

В **третьей главе** приводятся данные исследования биологической активности, а именно противомикробной, противогрибковой, диуретической и противоопухолевой активности. Сделано заключение о наиболее перспективной молекуле, которая обладает низкой токсичностью и противоопухолевой активностью, превышающими по уровню эффекта используемый препарат сравнения. В данном исследовании самым активным был признан 2-фенил-4-(4-хлорфенил)-6-этил-1,3,5-триазин.

Четвертая глава посвящена разработке аналитических методик и аттестации первичного стандартного образца нового производного 1,3,5-триазинов – 2-фенил-4-(4-хлорфенил)-6-этил-1,3,5-триазина с предоставлением значения аттестуемой величины с неопределенностью анализа.

В **пятой главе** приведен полный перечень и описание методик, используемых в ходе выполнения диссертационного исследования, а также приведены спектральные данные синтезированных молекул.

Заключение диссертации полностью отражает содержание работы, сформулировано четко и логично.

В приложениях приведены акты внедрения результатов диссертационного исследования в учебный процесс и научно-исследовательскую деятельность кафедры органической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Также здесь размещена копии двух патентов на изобретение.

Достоинства и недостатки по содержанию, оформлению, общая оценка диссертации. Материал диссертационного исследования Левшуковой П.О. изложен грамотным научным языком, логично и последовательно, экспериментальные работы спланированы грамотно и направлены на решение поставленных задач.

Тем не менее, при прочтении диссертации возникли следующие замечания и вопросы:

1. Свободное основание амидина в первую очередь должно вступать в реакцию солеобразования с исходным 1,3-оксазином. Это не отражено на рисунке 46 с механизмом реакции, при этом образование аниона оксазина предполагает исследование более широкого ряда вспомогательных реагентов и растворителей основного характера.
2. Почему в исследовании диуретической активности для исследуемых соединений выбрана одинаковая доза 20 мг/кг, при том что дозы препаратов сравнения – гипотиазида и фуросемида составили 4,24 и 6,78 мг/кг, соответственно?
3. В исследовании противоопухолевой активности выглядит более логичным в качестве препаратов сравнения использовать известные препараты – производные 1,3,5-триазина: азацитидин или децитабин.
4. Исследованный диапазон концентраций при оценке противоопухолевой активности (30-100 мкМ) слишком мал, что

делает невозможным выведение величины IC_{50} и затрудняет достоверное сравнение препаратов.

5. По данным литературы для линии А-549 величина IC_{50} доксорубицина составляет около 70 нМ, что примерно в 1000 раз меньше концентраций, исследованных в данной работе. Продемонстрированный низкий ответ клеток на доксорубицин может указывать на наличие резистентности в этом образце линии, что делает ее частным случаем и одновременно предполагает более широкую программу дальнейших исследований.
6. Чем можно объяснить тот факт, что цитотоксичность соединения VIIб выше, чем VIб, однако по величинам LD_{50} на мышах ситуация противоположная?
7. На каком приборе проводили элементный анализ?

Приведенные вопросы и замечания, однако, носят частный и уточняющий характер и не затрагивают выводов и результатов диссертации

Рекомендации по использованию результатов для науки и практики. Результаты исследований представляют практический интерес для фармацевтической отрасли с точки зрения обеспечения отечественного здравоохранения новыми препаратами с противоопухолевым действием. Кроме того, материалы диссертации уже используются в учебном процессе при подготовке фармацевтических кадров в высших учебных заведениях, а также в научно-исследовательских лабораториях: они внедрены в учебный процесс и научно-исследовательскую деятельность кафедры органической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Учитывая все вышеизложенное, можно сделать заключение, что диссертационная работа Левшуковой Полины Олеговны на тему «Новые подходы к синтезу биологически активных производных 1,3,5-триазины» является законченным научным исследованием, имеющим существенное значение для развития фармацевтической науки и практики.

В диссертации решена научная задача, состоящая в разработке новых технологичных методов синтеза потенциально биологически активных 2,4,6-тризамещенных 1,3,5-триазинов на широком наборе исходных реагентов.

В соответствии с обозначенной актуальностью темы диссертационной работы достигнута поставленная цель и решены необходимые задачи по изучению методов получения, строения, свойств и биологической активности ранее не описанных 2,4,6-тризамещенных 1,3,5-триазинов. Данная работа, по праву, представляет собой первое целенаправленное исследование реакций рециклизации 2,5-дизамещенных-4-гидрокси-6*H*-1,3-оксазин-6-онов с 1,3-бинуклеофильными реагентами (амидинами и *S*-метилизотиомочевинной) с характеристикой полученных соединений с помощью физико-химических методов анализа.

Изучена острая токсичность и биологическая активность 8 новых производных 1,3,5-триазинов и выявлено наиболее активное и наименее токсичное соединение.

Кроме того, разработан полный спектр аналитических методик для аттестации первичных стандартных образцов и контроля качества наиболее активных соединений. Проведена валидация некоторых наиболее значимых методик.

По актуальности и важности темы, объему и глубине исследования, теоретической и практической значимости, обоснованности и достоверности результатов и выводов диссертационная работа Левшуковой Полины Олеговны соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства

Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. № 1539, от 26.09.2022 г. № 1690, от 26.01.2023 г. № 101, от 18.03.2023 г. № 415, от 26.10.2023 г. № 1786, от 25.01.2024 г. № 62), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Левшукова Полина Олеговна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата фармацевтических наук по научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

ОФИЦИАЛЬНЫЙ ОППОНЕНТ

Шутов Роман Вадимович,
владелец продукта
департамента разработки инновационных малых молекул
акционерного общества «Биокад»,
кандидат фармацевтических наук
(15.00.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия)

«27.11.2024»



Шутов Р.В.

Акционерное общество «Биокад», департамент разработки инновационных малых молекул.
Почтовый адрес: 198515, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, п. Стрельна, ул. Связи., 34-А.
Телефон: +79217962413;
e-mail: shutovrv@biocad.ru.