

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Полины Радиковны Петровой** «Хинолизидиновые алкалоиды растений семейства *Fabaceae* в синтезе новых противогриппозных агентов», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03 – Органическая химия.

Актуальность темы выполненной работы

Разработка новых лекарственных препаратов для терапии и профилактики вирусных инфекций остается первоочередной проблемой современной фармакологии и медицинской химии. Грипп является наиболее распространенным инфекционным заболеванием человека, которое ежегодно поражает порядка 10% населения мира. Наряду с вакцинацией, химиотерапия является ключевым методом профилактики и лечения вирусных заболеваний, особенно во время пандемий, когда новый вирус распространяется гораздо быстрее, чем практическая медицина может произвести вакцину и иммунизировать эпидемически значимую популяционную когорту. Высокая вариабельность вируса гриппа делает его устойчивым ко многим применяемым в настоящее время противогриппозным препаратам. Следовательно, необходимо постоянно искать новые противогриппозные препараты, относящиеся к новым структурным типам, включая те, чьи биологические мишени и механизмы действия отличаются от используемых в настоящее время. С этой точки зрения обращают на себя внимание природные хинолизидиновые алкалоиды, отрывочные и не систематизированные сведения о противогриппозной активности которых имеются в литературе.

Принимая во внимание изложенное выше, диссертационная работа Полины Радиковны Петровой, посвящённая выявлению структурных типов хинолизидиновых алкалоидов, обеспечивающих противогриппозную активность экстрактов растений семейства *Fabaceae*, произрастающих в Республике Башкортостан и Южном Урале, и синтезу неизвестных ранее производных этих алкалоидов с целью поиска новых, эффективных противогриппозных препаратов, **является актуальной.**

Цель диссертационной работы

Синтез новых производных хинолизидиновых алкалоидов – вторичных метаболитов растений семейства бобовых (*Fabaceae*) с потенциальной противогриппозной активностью.

Задачи диссертационной работы

1. выявление структурных типов хинолизидиновых алкалоидов, потенциально ответственных за противогриппозную активность, путем оценки способности алкалоидсодержащих экстрактов растений родов *Thermopsis*, *Chamaecytisus*, *Genista* (*Fabaceae*) ингибировать репродукцию вируса гриппа А (H1N1);
2. синтез новых тио- и карбоксамидов, гуанидиновых производных, а также конъюгатов с некоторыми пиримидинами и биологически значимыми органическими кислотами на основе производных хинолизидиновых алкалоидов, содержащих галоид-, нитро-, аминогруппы в 2-пиридиновом ядре;
3. разработка способа прямого формилирования псевдоароматического 2-пиридинового ядра метилцитизина, превращение полученного альдегида в соответствующие 9-енил-, 9-инил-, 9-иминопроизводные;
4. функционализация 2-пиридинового ядра 2-оксо и 4-оксометилцитизина, химические трансформации их формил-, галоид- и аминопроизводных на основе реакций построения новых связей «углерод-углерод» и «углерод-азот»;
5. синтез аддуктов Дильса-Альдера 2-оксо- и 4-оксопроизводного метилцитизина с *N*-замещенными имидами малеиновой кислоты; выявление факторов, влияющих на стереохимический результат [4+2]-циклоприсоединения;
6. оценка противогриппозной активности синтезированных соединений (совместно с Институтом микробиологии и эпидемиологии имени Пастера, Санкт-Петербург).

Структура диссертационной работы и её содержание

Диссертационная работа изложена на 191 странице, содержит 17 схем, 34 рисунка, 8 таблиц и состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка использованных источников из 177 наименований, 10 приложений с таблицами о составе алкалоидов в собранных растениях и семенах, спектрах ЯМР некоторых соединений и двух актах испытаний противовирусной активности синтезированных соединений.

Первая глава (литературный обзор) содержит характеристику противогриппозных лекарственных препаратов с указанием мишеней, на которые они воздействуют, и подробное описание противовирусной активности хинолизидиновых алкалоидов растений семейства *Fabaceae*. Проанализированы данные около 100 статей и обзоров, глубина охвата литературы с 1964 года по настоящее время. Проведенный анализ литературных данных приводит диссертантку к заключению о необходимости выявить структурные типы хинолизидиновых алкалоидов, обладающие наибольшей противогриппозной активностью, и на их основе синтезировать библиотеку соединений, перспективных для разработки новых терапевтических агентов противовирусного направления.

Вторая глава посвящена обсуждению собственных исследований и состоит из трёх разделов.

В первом разделе описываются динамика накопления и распределение хинолизидиновых алкалоидов спартеиновой, термопсиновой и матриновой групп в растениях *Thermopsis Schischkinii*, *Chamaecytisus ruthenicus* и *Genista tinctoria*, а также противогриппозная активность различных фракций, выделенных из этих растений. Делается вывод, что наибольшую противогриппозную активность проявляют фракции с мажорным содержанием спартеина, лупанина, термопсина, анагирина, аргентаминина и софорамина.

Во втором разделе описывается синтез разнообразных производных хинолизидиновых алкалоидов (-)-цитизина, метилцитизина и термопсина.

В третьем разделе приведены результаты выборочного тестирования синтезированных соединений на противовирусную активность в отношении вирусов гриппа типа А H1N1 и H5N2, а также вируса парагриппа.

Третья глава (экспериментальная часть) содержит сведения о сборе растительного сырья, выделении из него фракций алкалоидов и определении их состава. В главе приведены методики синтеза разнообразных производных хинолизидиновых алкалоидов (-)-цитизина, метилцитизина и термопсина и их характеристики (химические сдвиги в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C , данные масс-спектрометрии, величины удельного оптического вращения, температуры плавления).

Основные результаты, полученные в диссертационной работе

1. Результаты изучения содержания и противовирусной активности хинолизидиновых алкалоидов в растениях *Thermopsis Schischkinii*, *Chamaecytisus ruthenicus* и *Genista tinctoria*.

У растения *Thermopsis Schischkinii* во всех фазах вегетации (бутонизация, цветение, плодоношение) в сумме алкалоидов надземной части содержатся алкалоиды (-)-цитизин, метилцитизин, термопсин, анагирин, термопсамин, лупанин, 5,6-дигидролупанин.

У растения *Chamaecytisus ruthenicus* во всех фазах вегетации в сумме алкалоидов надземной части мажорными компонентами являются спартеин и лупанин.

У растения *Genista tinctoria* во всех фазах вегетации в сумме алкалоидов надземной части мажорными компонентами являются (-)-цитизин, метилцитизин, анагирин, лупанин, формилцитизин, баптифоллин.

Наилучшую противовирусную активность (IC₅₀ 1.0 – 4.5 мкг/мл) в отношении вируса гриппа типа А H1N1 проявили фракции, выделенные из растений *Thermopsis Schischkinii*, *Chamaecytisus ruthenicus* и *Genista tinctoria*, с мажорным содержанием хинолизидиновых алкалоидов спартеина, лупанина, термопсина, ангирина.

2. Результаты синтеза и скрининга противовирусной активности производных хинолизидиновых алкалоидов (-)-цитизина, метилцитизина и термопсина

Получена серия *N*-карбоксамидов (-)-цитизина с атомами галогенов или нитрогруппой в положениях С-9 и С-11 молекул.

Получена серия моно- и дизамещенных 9-тиокарбоксамидов и 9-гуанидинов метилцитизина.

Получены неизвестные ранее конъюгаты 1,3-диметилаурацила с 9-аминопроизводными 3-*N*-замещенных аналогов (-)-цитизина и термопсина, в которых фармакофорный пиримидин-2,4-дионовый фрагмент связан с 2-пиридиновым ядром.

Получены производные (-)-цитизина, галоидированные в положения С-9 и С-11 и функционализированные по атому *N*-3 производными урокановой кислоты.

На основе реакций конденсации 9-формил-3-*N*-метилцитизина с кетонами, нитрометаном, илидами фосфора и гидроксиламинами, а также на основе кросс-сочетания 9-бром- и 9-йод-3-*N*-метилцитизина по Хеку и Соногашире с енонами и этинилтриметилсиланом осуществлен синтез новых 9-енил-, 9-инил- и 9-иминопроизводных метилцитизина.

Получена серия 2- и 4-оксопроизводных метилцитизина, содержащих фенильную группу, связанную с молекулой алкалоида по положению С-9 спейсерами различного типа: этильным, этинильным, этинильным, акрилоильным, аминотетильным, амидным, тио- и карбоксамидным.

Получена серия аддуктов реакции [4+2]-циклоприсоединения 2- и 4-оксопроизводных метилцитизина с *N*-замещенными малеимидами. Выделены в индивидуальном виде с установлением пространственного строения – внимание! – ВСЕ диастереомеры с α -эндо и β -эндо ориентацией *N*-замещенного сукцинимидного цикла.

Таким образом, в ходе выполнения диссертационной работы П.Р.Петровой синтезировано и охарактеризовано **160 (сто шестьдесят)** неизвестных ранее производных хинолизидиновых алкалоидов (-)-цитизина, метилцитизина и термопсина. **Это поистине впечатляющий результат!**

Выборочно тестированные синтезированные соединения в основном показали умеренную ($IC_{50} = 12 - 40$ мкМ) противовирусную активность в отношении вируса гриппа типа А H1N1, но зато высокое, что очень важно, значение индекса селективности ($SI = 20-50$). Соединением-лидером оказался β -эндо аддукт реакции [4+2]-циклоприсоединения метилцитизина с *N*-3-метоксифенилмалеимидом, продемонстрировавший наивысшую активность в ряду тестированных соединений ($IC_{50} = 4$ мкМ, $SI = 79$).

Научная новизна диссертационной работы

Впервые систематически исследованы состав и содержание хинолизидиновых алкалоидов в надземной части растений семейства бобовых (*Fabaceae*) – ракитнике русском (*Chamaecytisus ruthenicus* (Fisch. ex Wolf. Klásk.)), дроке красильном (*Genistatinctoria* L.) и в термопсисе Шишкина (*Th. Schischkinii* Czefr.), произрастающих на территории Республики Башкортостан и Южного Урала, во всех фазах вегетации.

Впервые установлено, что у растения *Thermopsis Schischkinii* во всех фазах вегетации в сумме алкалоидов надземной его части мажорными являются (-)-цитизин, метилцитизин, термопсин, анагирин, термопсамин, лупанин, 5,6-дигидролупанин; у растения *Chamaecytisus ruthenicus* – спартеин и лупанин; у растения *Genista tinctoria* – (-)-цитизин, метилцитизин, анагирин, лупанин, формилцитизин, баптифолин.

Впервые установлено, что наилучшую противовирусную активность ($IC_{50} 1.0 - 4.5$ мкг/мл) в отношении вируса гриппа типа А H1N1 проявили фракции, выделенные из растений *Thermopsis Schischkinii*, *Chamaecytisus ruthenicus* и *Genista tinctoria*, с мажорным содержанием хинозолидиновых алкалоидов спартеина, лупанина, термопсина, ангирина.

Впервые синтезирована огромная (**160 соединений**) библиотека неизвестных ранее разнообразных производных хинолизидиновых алкалоидов (-)-цитизина, метилцитизина и термопсина, среди которых выявлены соединения с умеренной ($IC_{50} = 12 - 40$ мкМ) противовирусную активность в отношении вируса гриппа типа А H1N1, но с большим, что

очень важно, значением индекса селективности ($SI = 20-50$). Соединение-лидер продемонстрировало наивысшую активность в ряду ($IC_{50} = 4$ мкМ, $SI = 79$).

Практическая значимость диссертационной работы

Определены оптимальные сроки сбора надземной части растений *Ch. ruthenicus* (Fisch. ex Wolf. Klásk.), *G. tinctoria* L. и *Th. Schischkinii* Czefr., произрастающих на территории Республики Башкортостан и Южного Урала, соответствующие максимальному содержанию алкалоидов, обладающих противовирусной активностью.

Разработаны простые и удобные способы синтеза производных алкалоидов (-)-цитизина, термопсина, метилцитизина и его 2-оксо- и 4-оксопроизводных, имеющих в своей структуре галоид-, нитро-, amino-, формил-, изотиоцианатную, амидную, тио- и карбоксамидную, гуанидиновую функциональные группы; конъюгатов с 1,3-диметилаурацилом, урокановой кислотой; производных с фенильным фрагментом, связанным с 2-пиридоновой частью молекул этих алкалоидов этильным, этенильным, этинильным, аминотилеиновым, тио- и карбоксамидным спейсерами; аддуктов Дильса-Альдера метилцитизина, его 2-оксо- и 4-оксопроизводного с *N*-замещенными имидами малеиновой кислоты.

Выборочный скрининг противовирусной активности синтезированных соединений подтвердил гипотезу диссертантки, что производные хинолизидиновых алкалоидов являются перспективной платформой для создания новых, инновационно значимых противогриппозных препаратов.

Соответствие диссертационной работы заявляемой специальности

Диссертационная работа соответствует заявленной специальности 02.00.03 – Органическая химия. В ходе её выполнения Полина Радиковна Петрова синтезировала и охарактеризовала большую серию неизвестных ранее производных хинолизидиновых алкалоидов (-)-цитизина, метилцитизина и термопсина. Изучено влияние на течение реакций условий её проведения и природы реагентов. У ряда синтезированных соединений изучена противовирусная активность. Всё перечисленное соответствует пункту 1 «Выделение и очистка новых соединений», пункту 3 «Развитие рациональных путей синтеза сложных молекул» и пункту 7 «Выявление закономерностей типа “структура–свойство”» паспорта специальности 02.00.03 Органическая химия ВАК Министерства образования и науки РФ в редакции от 11.11.2011 г.

Замечания по диссертационной работе

1) Не приведена формула (-)-цитизина с используемой в диссертации нумерацией атомов, что поначалу сбивает с толку, ибо использована не традиционная, привычная оппоненту нумерация атомов, а порой очень странная ИЮПАКовская нумерация. Причем в некоторых публикациях авторов, например, в [124] используется традиционная нумерация.

2) На стр. 39 следовало расшифровать заместители R^1 и R^2 в соединениях **22-26**.

3) На стр. 42 и 49 сообщается о региоселективном элиминировании атома галогена из положения С-11 в 9,11-дибромзамещенном термопсине **79a** (стр. 42) и 9,11-дийодзамещенном метилцитизине **121c** (стр. 49). Следовало бы привести доказательства произошедшего события (в экспериментальной части для перечисленных соединений отсутствуют данные масс-спектрометрии) и прояснить движущую силу процесса.

4) На стр. 56 написано «все диастереомеры **175a,b-179a,b** и **180-184** были выделены в индивидуальном виде методом КХ на SiO_2 и полностью охарактеризованы методами ЯМР спектроскопии [171] и РСА». Однако статья [171] не имеет никакого отношения к соединениям **175a,b-179a,b** и **180-184**. В ней описано определение методами спектроскопии ЯМР и РСА структуры аддуктов реакции [4+2]-циклоприсоединения метилцитизина **2**, (-)-леонтидина и (-)-термопсина **3** с *N*-фенилмалеимидом.

5) В экспериментальной части не хватает рисунков структур соединений. НОРМАЛЬНОМУ химику ИЮПАКовские названия синтезированных алкалоидов НИЧЕГО не говорят. Можно было смело использовать тривиальную номенклатуру, взяв за основу названия

синтезированного соединения название его «родительского» (*parent*) алкалоида – цитизина или термопсина. В химии терпеноидов именно так и поступают, что в разы упрощает понимание названий соединений.

6) В экспериментальной части отсутствует описание соединения **136**.

7) На стр. 125 экспериментальной части не понятно, какое соединение описано: **137** или **138**.

8) В экспериментальной части на стр. 146, 147 описаны спектры ЯМР «Р и М конформеров» соединений **173a,b**. Не понятно, что имеется в виду. Во-первых, конформеры в индивидуальном виде не могут быть выделены в принципе (выделить можно только геометрические изомеры.). Во-вторых, не понятно, к какой структуре соединений **173a,b** относятся обозначения Р и М.

9) В экспериментальной части отсутствуют данные масс-спектров очень большого ряда соединений: **79a,b, 80a,b, 81, 89, 121a,b, 169a,b, 170a,b, 171a,b, 172a,b, 173a,b, 174a,b, 176a**. Оппонент понимает, что основную информацию как о чистоте синтезированных соединений, так и об их строении и структуре дают спектры ЯМР. Однако строгое доказательство чистоты синтезированных соединений можно получить только из масс-спектров.

10) В списке литературы две ссылки имеют номер 149 – это работы П.Р.Петровой и В.О'Neill. Под номерами 7 и 27 приведена одна и та же статья W. L Davies.

11) На стр. 43 соединения **92-98** названы конъюгатами (-)-цитизина и термопсина с **пиримидиновым** фрагментом. На самом деле этот фрагмент называется **пиримидин-2,4-дионовым**.

Сделанные замечания не затрагивают сущности работы, достоверности полученных результатов, обоснованности выводов и никоим образом не влияют на мою высокую оценку рецензируемой работы.

Достоверность полученных результатов

Достоверность полученных результатов и обоснованность сделанных на их основе выводов не вызывает сомнений. Строение и структура всех синтезированных соединений установлены методами спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C . В экспериментальной части приведены исчерпывающие данные, необходимые для анализа и понимания полученных автором результатов, а также проверки их достоверности.

Апробация полученных результатов, публикации и автореферат диссертации

Результаты исследований доложены на IX Всероссийской конференции «Химия и технология растительных веществ» (Москва-Сыктывкар, 2015), II Всероссийской молодежной конференции «Достижения молодых ученых: химические науки» (Уфа, 2016), XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии «Фундаментальные проблемы химической науки» (Екатеринбург, 2016), X Всероссийской научной конференции и школы молодых ученых «Химия и технология растительных веществ» (Казань, 2017), XX молодежной школе-конференции по органической химии (Казань, 2017), IV Всероссийской конференции по медицинской химии (Екатеринбург, 2019).

Материалы диссертационной работы П.Р.Петровой полностью представлены в 17 статьях, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК РФ, из них 14 статей опубликованы в журналах, включенных в базы данных Web of Science и Scopus, а также опубликованы в виде тезисов 11 докладов на конференциях.

Автореферат и публикации полно и правильно отражают содержание диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа **Полины Радиковны Петровой** является актуальной, цельной, законченной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком профессиональном

уровне. Цель работы, поставленная диссертанткой, достигнута, а соответствующие ей задачи полностью выполнены. Диссертация написана хорошим научным языком и красиво оформлена.

На основании изложенного выше считаю, что диссертационная работа П.Р.Петровой полностью удовлетворяет требованиям, установленным пп. 9-14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., а сама Полина Радиковна Петрова заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03 – Органическая химия.

Официальный оппонент:

Катаев

Катаев Владимир Евгеньевич,

доктор химических наук по специальности 02.00.03 – Органическая химия, профессор, главный научный сотрудник лаборатории фосфорсодержащих аналогов природных соединений Института органической и физической химии им. А. Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук».

Почтовый адрес: 420088, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Академика Арбузова, 8

Факс: (843) 273-18-72

Телефон: +7(843) 273-93-65

E-mail: kataev@iopc.ru

<http://www.iopc.ru>

Подпись	<i>Катаева В.Е.</i>
Заверяю	Начальник отдела ДИО
" <i>10</i> "	Гиззатуллина Л.Ш.
	июня 20 <i>20</i> г.

