

ОТЗЫВ

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

Природные соединения, являются эффективным двигателем для развития синтетической органической химии и дают большое разнообразие исходных объектов для синтеза биологически активных веществ. Выбор в пользу природных субстратов, и в особенности, растений, произрастающих на территории России, является перспективным и экономически оправданным. Диссертационная работа Петровой Полины Радиковны именно и посвящена рациональному использованию направленного органического синтеза для дизайна новых соединений с противовирусной активностью, на основе природных хинолизидиновых алкалоидов.

Создание эффективных средств профилактики и лечения вирусных инфекций представляет **актуальную задачу**, особенно в свете текущей пандемии коронавируса COVID-2019. Другим примером распространённой во всем мире респираторной инфекции является вирус гриппа, сезонные вспышки которого также иногда перерастают в пандемии. На данный момент, практически все средства химиотерапии гриппа показали низкую эффективность или серьезные противопоказания к применению и побочные эффекты. Кроме того, особенности генома и механизма репликации вируса гриппа дают возможность быстрого накопления мутаций, что приводит к возникновению новых штаммов вирусов гриппа с лекарственной резистентностью. Таким образом, поиск и разработка новых противовирусных агентов является важной задачей органической и медицинской химии, что подчеркивает **актуальность диссертационной работы** Петровой П.Р.

Целью диссертационного исследования было продемонстрировать возможность применения хинолизидиновых алкалоидов – вторичных метаболитов растений семейства бобовых (*Fabaceae*), в синтезе новых производных с

противогриппозной активностью. Задачи, поставленные исследователем, полностью соответствовали указанной цели и включали три основных этапа: выявление структурных типов хинолизидиновых алкалоидов, потенциально ответственных за противогриппозную активность; синтез их производных; оценка противогриппозной активности.

Выполненный Петровой Полиной Радиковной объем исследований обладает несомненной **научной новизной**. Впервые систематически исследована алкалоидоносность трех представителей растений семейства *Fabaceae* – *Chamaecytisus ruthenicus*, *Genista tinctoria*, *Thermopsis Schischkinii* Czefr., произрастающих на территории Российской Федерации (РФ) и Республики Юашкортостан (РБ); показана противогриппозная активность их «алкалоидсодержащих» экстрактов. Разработаны принципиально новые подходы к функционализации стартовых алкалоидов (–)-цитизина и метилцитизина путем прямого электрофильного формилирования, региоселективного йодирования и введения изотиоцианатной группы в их 2-пиридоновое ядро. Осуществлен синтез конъюгатов этих алкалоидов с 1,3-диметилурацилом и урокановой кислотой, а также ряда новых мочеви́н и тиомочеви́н. Получены библиотеки новых производных 2-оксо- и 4-оксометилцитизина с галоид-, нитро- и аминогруппами, а также с фенильным заместителем, связанным со стартовым алкалоидом спейсерами различной природы. Впервые в реакцию [4+2]-циклоприсоединения с *N*-замещенными малеинимидами вовлечены 2-оксо- и 4-оксопроизводное метилцитизина; получены аддукты с потенциальной противогриппозной активностью

К **теоретически значимым** аспектам диссертационной работы Петровой Полины Радиковны можно отнести установление закономерностей распределения и накопления хинолизидиновых алкалоидов в надземной части термописа Шишкина, раkitника русского и дрока красильного, включая определение структурных типов алкалоидов, потенциально ответственных за противогриппозную активность, выявление стереохимических закономерностей протекания реакции Дильса-Альдера 2-оксо- и 4-оксопроизводного метилцитизина с имидами малеиновой кислоты в термическом ее варианте, а также данные о зависимости «структура – противогриппозные свойства», имеющие важное

методологической значение для поиска и создания новых противогриппозных агентов на основе хинолизидиновых алкалоидов данных структурных групп.

Определение оптимальных сроков сбора *Chamaecytisus ruthenicus*, *Genista tinctoria*, *Thermopsis Schischkinii* Czefr., соответствующих максимальному содержанию алкалоидов в растительном сырье, оценка противогриппозной активности их «алкалоидсодержащих» экстрактов, разработка удобных с практической точки зрения способов синтеза новых производных (-)-цитизина, метилцитизина и термопсина и обнаружение «соединений-хитов» с выраженными противогриппозными свойствами составляют **практическую значимость** данной диссертационной работы.

Объем и структура диссертации. Общий объем диссертации составляет 191 страницу, включая 14 машинописных страниц приложений. Она имеет традиционную структуру и содержит все необходимые разделы. Во **введении** хорошо обозначена актуальность исследования, и четко сформулированы цель и задачи работы. **Литературный обзор**, связанный с темой проведенного исследования, небольшой (чуть больше одной десятой части общего объема диссертации) и имеет два основных раздела: **биологический** с краткой характеристикой основных противогриппозных лекарственных средств, разрешенных к клиническому применению (включая механизмы их противогриппозного действия, достоинства и недостатки), и **химический** - посвященный хинолизидиновым алкалоидам, принадлежащим к структурным группам матрина, спартеина и (-)-цитизина, а также их синтетическим производным с противовирусной и противогриппозной активностями. Обзор достаточно полно охватывает литературу, связанную с тематикой исследования, как зарубежную (более 90%), так и отечественную; количество ссылок на статьи, вышедшие в печати за последние пять лет составляет 30%. Анализ представленных в литературном обзоре данных, с одной стороны, положен в основу формулировки цели диссертационной работы Петровой Полины Радиковны, а с другой - позволяет сделать вывод о том, что разработка противовирусных агентов на основе хинолизидиновых алкалоидов растений семейства *Fabaceae* является одним из наиболее перспективных направлений современной органической и медицинской химии. **Содержание собственных исследований** изложено во второй главе –

обсуждение результатов, и состоит из несколько разделов. Первый раздел посвящён изучению количественного и качественного состава алкалоидов в растениях ракитник русский (*Ch. ruthenicus*), дрок красильный (*G. tinctoria*) и термопсис Шишкина (*Th. Schischkinii*) в зависимости от фазы вегетации и условий произрастания. Эта объемная и протяженная во времени работа (что обусловлено сезонным характером сбора и подготовки растительного сырья) выполнена в лучших традициях отечественной школы химии алкалоидов с соблюдением всех правил и требований, предъявляемых к современным фитохимическим исследованиям. Также в первом разделе представлены результаты оценки противогриппозной активности «алкалоидсодержащих» экстрактов перечисленных растений, на основе которых, а также с учетом литературных данных, были определены объекты исследования – это хинолизидиновые алкалоиды (-)-цитизин, метилцитизин и термопсин, которые и стали исходными соединениями для синтеза на их основе новых противогриппозных агентов. Второй раздел посвящен химическим трансформациям выбранных природных соединений: в котором пошагово представлены этапы реализации предложенной автором стратегии синтеза целевых библиотек новых потенциальных противогриппозных агентов. Так, наборы производных (-)-цитизина, термопсина, 2-оксо-, 4-оксо- и метилцитизина были получены путем периферийного дизайна, включающего в себя первичную функционализацию с последующими превращениями введенных функциональных групп (для (-)-цитизина в комбинации с реакциями его вторичного атома азота) и скелетные трансформации на основе реакции [4+2]-циклоприсоединения. Необходимо отметить, что несмотря на кажущуюся внешнюю простоту предпринятых химических трансформаций, автору удалось осуществить совершенно новые для данного класса природных соединений химические превращения: прямое 9-формилирование, двухстадийное 9-йодирование и введение изотиоцианатной группы в 2-пиридиновое ядро производных (-)-цитизина. Что, в свою очередь, позволило получить новые тио- и карбоксамиды, гуанидины, конъюгаты с производными урокановых кислот и 1,3-диметилурацилом - перспективные с точки зрения проявления, как противогриппозной, так и возможных других типов биологической активности. Достаточно неожиданным оказался и стереохимический результат [4+2]-

циклоприсоединения малеинимидов к 2-оксометилцитизину; как оказалось, в отличие от 4-оксопроизводного, реакция протекает диастереоспецифично, приводя к образованию только одного диастереомера с 3aR, 4S, 12aS, 12bR конфигурацией новых асимметрических центров, что объясняется термодинамическими параметрами прямой и ретро-реакции Дильса-Альдера, полученными в результате QC расчетов, и подтверждается данными PCA. В конце второй главы диссертационной работы и в приложениях представлена активность синтезированных соединений в отношении вирусов гриппа А и парагриппа. Среди производных (-)-цитизина с фрагментами мочевины и тиомочевины в 3-положении молекулы выявлено четырнадцать соединений, проявляющих умеренную и высокую активность в отношении вируса гриппа А(H1N1) с индексами селективности (SI) от 12 до 41 и вируса парагриппа с SI от 13 до 94, соответственно. Среди аддуктов Дильса-Альдера метилцитизина идентифицированы шесть «β-эндо» диастереомеров, эффективно ингибирующих репродукцию вируса гриппа А(H1N1) с SI от 13 до 94, что заметно выше индекса селективности препарата сравнения римантадина (SI = 5) SI, а в отдельных случаях сравнимо с индексом селективности рибавирина (96). Полученные результаты биологических исследований позволяют заключить, что задача синтеза новых противогриппозных агентов на основе хинолизидиновых алкалоидов растений семейства бобовых (*Fabaceae*) решена Петровой Полиной Радиковной в полном объеме. Синтез масштабных библиотек производных (-)-цитизина, метилцитизина и термопсина и параллельный скрининг противогриппозных свойств всех синтезированных соединений, выполненный в Институте эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (г. Санкт-Петербург), в конечном итоге, позволили выявить ряд «соединений-хитов», способных эффективно ингибировать репродукцию вирусов парагриппа HPIV3, гриппа А(H1N1) и гриппа А (H5N2). Хочется отметить, что раздел, посвященный собственным исследованиям автора диссертационной работы хорошо иллюстрирован: число рисунков составляет 12), химические превращения представлены на 17 схемах, необходимые для обсуждения табличные данные сведены в 5 таблиц.

В **экспериментальной части** диссертационного исследования приведены условия проведения экспериментов и физико-химические характеристики

(спектральные данные и элементный состав) новых соединений, что подтверждает большой объем синтетической работы соискателя по поиску новых противогриппозных агентов. **Достоверность полученных результатов** не вызывает сомнений. По теме диссертации опубликовано 17 статей в рецензируемых изданиях и тезисы 11 докладов на конференциях различного уровня.

Основные положения и выводы диссертации теоретически обоснованы и исчерпывающе подкреплены экспериментальным материалом. Выводы в полной мере отражают полученные результаты. Диссертация написана весьма тщательно, хорошим литературным и химическим языком.

Тем не менее, по диссертационной работе имеется ряд вопросов и замечаний:

1. В литературном обзоре на стр 13-14 представлено предложение «Широко распространенный в России препарат Арбидол 1 рекомендованный Фармакологическим комитетом Минздрава России в качестве профилактического и лечебного средства при гриппе А и В, а также при ОРВИ для взрослых и детей, является одним из подтвержденных ингибиторов НА». Здесь следует отметить, что Арбидол является комбинированным препаратом и его активность *in vivo* в основном обусловлена индуцированием продукции интерферона. Кроме того, его активность в клинических исследованиях согласно рекомендациям ВОЗ не была достаточно доказана [*WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic Influenza A(H1N1) 2009 and other Influenza Viruses*].
2. В первой части литературного обзора сделан акцент на известные мишени противогриппозных агентов. То есть, представлен агенты, действующие на гемагглютинин, ионный канал M2, нейраминидазу, РНК-полимеразу. При этом не представлено данных о возможном механизме действия синтезированных агентов, например, молекулярное моделирование или эксперименты по времени добавления.
3. В диссертационной работе присутствуют соединения, которые были ранее получены коллегами диссертанта. Например, соединения **22-26**, **27-29** и **42-44**. Возможно, стоило отдельно отметить, для чего эти соединения были синтезированы повторно.

4. На схеме 2.8 реагенты и условия указано, что элюент $i\text{-PrOH-CHCl}_3$, а по тексту ниже указана система MeOH-CHCl_3 .
5. На стр 47 в тесте диссертации указано «С целью введения ацетиленового фрагмента в 2-пиридиновое ядро (–)-цитизина..», а по факту реакция Сонагашира с полученным йодидом цитизина не была проведена, ацетиленовая группа была введена только в метилцитизин. Поскольку наличие ацетиленовой группы открывает возможность к введению различных гетероциклов, то кажется логичным получить производные цитизина, содержащие, например, триазольный цикл, но это скорее пожелание, нежели замечание.
6. В обзоре литературы встречается использование то IC_{50} , то EC_{50} возможно в рамках одного обзора лучше было использовать один термин.
7. В пункте 1.2.1 обзора представлена противовирусная активность не только индивидуальных алкалоидов, но и их производных, возможно, это стоило отобразить в названии данного раздела.
8. Данные противовирусной активности приведены лишь для активных агентов, что не позволяет увидеть полную картину зависимости структура-активность.
9. К экспериментальной части диссертации имеется ряд замечаний:

Во-первых, хочется отметить, что сильно не хватает структур синтезированных соединений с нумерацией атомов, хотя бы несколько примеров по каждому типу. Из-за этого сложно проверять и анализировать спектры ЯМР.

Для некоторых соединений наблюдается несовпадение количества протонов в спектре ЯМР и в брутто-формуле. Например, для соединения 40 не хватает в спектре одного протона, возможно $\text{H}2'$; для соединений 47, 50, 53 в спектре ^{13}C нет сигналов от адамантанового фрагмента; для соединения 70 в спектре ^{13}C нет сигналов от циклогексанового фрагмента; для соединения 55 два раза повторяется сигнал 2.57 (м, 1H, H-5) нет сигнала H-1; для соединений 73, 74 нет сигналов 9 углеродов в ^{13}C спектре. Для соединений 63, 66, 79 а,б, 80 а,б и 81 не приведены данные элементного анализа. Для соединений 103-11 нет расчетных значений $[\text{M}+\text{H}]^+$ при описании результатов масс-спектра ХИАД. На стр. 88 встречается предложение «Реакционную массу перемешивали при 0°C в течение часа, затем подняли до комнатной температуры.» Смысл понятен, но сформулировано с ошибкой.

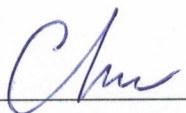
Указанные замечания не носят принципиальный характер и не влияют на высокий уровень представленной работы.

Таким образом, диссертационная работа **Петровой Полины Радиковны** «Хинолизидиновые алкалоиды растений семейства *Fabaceae* в синтезе новых противогриппозных агентов» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой решена важная для органической и медицинской химии задача синтеза новых противогриппозных агентов на основе хинолизидиновых алкалоидов растений семейства бобовых (*Fabaceae*), которая по актуальности научного направления, способам решения, объему и уровню исследований, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов, степени апробации, опубликованию основных положений в печати соответствует требованиям предъявляемым к кандидатским диссертациям, и соответствует критериям, изложенным в пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор **Петрова Полина Радиковна** заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по научной специальности 02.00.03 – Органическая химия.


Официальный оппонент:

Соколова Анастасия Сергеевна, кандидат химических наук (02.00.03 – Органическая химия), старший научный сотрудник лаборатории физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук
e-mail: asokolova@nioch.nsc.ru
тел.: 8(383)330-97-33

«23» июня 2020 г.



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН)
630090 г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, д. 9; Телефон: (383)330-88-50;
Факс: (383)330-97-52; e-mail: benzol@nioch.nsc.ru;
сайт НИОХ СО РАН: <http://web.nioch.nsc.ru/>

Подпись Соколовой  заверяю
Ученый секретарь НИОХ СО РАН




к.х.н. Бредихин Роман Андреевич