

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата химических наук Каретникова Георгия Леонидовича
на тему: «Синтез галогенарлизоксазолов и их функционализация:
разработка подходов к новым тубулин-ингибирующим»
противоопухолевым агентам»
по специальностям 1.4.3 – Органическая химия и 1.4.16 – Медицинская
химия.

Актуальность исследования

Ежегодно в нашей стране выявляется более полумиллиона онкологических больных. Большая часть современных противоопухолевых препаратов не доступна российским больным из-за высокой стоимости, а дженерики часто не могут сравниться с оригинальными препаратами в эффективности лечения. Разработка методов синтеза инновационных отечественных противоопухолевых препаратов ставится одной из наиболее приоритетных задач отечественной фарминдустрии. Перечень лекарственных средств для химиотерапии рака, утвержденный в Российской Федерации, включает порядка 50 препаратов-цитостатиков. Важной клеточной мишенью ряда этих веществ является белок тубулин, который в клетке полимеризуется с образованием микротрубочек. Цитостатики селективно связывающиеся с тубулином в опухолевых клетках, вызывает нарушение динамики и/или структуры микротрубочек митотического веретена, что приводит к неспособности раковых клеток завершить свое деление или к аномальному делению, и в результате происходит гибель этих клеток.

Использующиеся в клинках природные таксаны, винка-алкалоиды, подофилотоксины, также влияют на механизмы работы микротрубочек. Однако их применение сопровождается серьезными побочными эффектами, включая периферическую нейропатию. Недавно, клинически было доказано, что вещества, ингибирующие полимеризацию микротрубочек, признаны перспективными противоопухолевыми агентами, обладающие меньшими побочными эффектами. Кроме того, их применяют и как антигельминтные

препараты, ведутся работы по их использованию в борьбе с насекомыми-вредителями. Ряд таких ингибиторов нарушает деление клеток бактерий за счет связывания с белком FtsZ, имеющего сходный сайт связывания с тубулином эукариотов. И совсем недавно Федеральное агентство по лекарствам США (FDA) зарегистрировала мощный ингибитор полимеризации тубулина Сабизабулин, действующий по колхициновому сайту, для борьбы с коронавирусами. Он оказывает прямое воздействие на транспортировку S-белка SARS-CoV-2 в микротрубочки, потенциально снижая выработку инфекционных вирионов, в частности, за счет воздействия на репликацию и сборку вируса, а также выход вирионов.

Главным моментом при выполнении данной работы является целенаправленный поиск эффективных и общих путей синтеза дестабилизаторов микротрубочек в ряду диарилизоксазолов. Благодаря разработке общего подхода, синтезированы большие серии аналогов как 3,5- так и 3,4-диарилизоксазолов для скрининга, что позволило выявить высокоактивные структуры, нарушающие деление опухолевых клеток в наномольных концентрациях.

Целью работы является поиск гетероциклических аналогов комбретастина среди многочисленных классов антитубулиновых структур именно в ряду изоксазолов. Оптимизация структур для синтеза осуществлена с помощью методов молекулярного дизайна. Необходимо было продумать и разработать синтетические методы для введения как ароматических, так алифатических заместителей в любые положения изоксазольного цикла и изучить особенности протекания реакций. В конечном итоге была поставлена задача проанализировать соотношения структура – активность и выявить соединения-лидеры, а также закономерности модификации молекул для получения активных веществ.

Практическая значимость и новизна диссертации заключается в разработке последовательных методов введения практически любых заместителей в любое положение изоксазольного цикла. Известно

множество гетероциклических аналогов комбретастина, но изоксазольных цикл занимает особое место, поскольку только в ряду орто-диарилизоксазолов найдены высокоактивные структуры с минимальным количеством метокси-групп. По-видимому, это связано его уникальными свойствами по связыванию в кармане колхицинового сайта, что побудило автора заняться именно изоксазолами.

Выполнена показательная работа, где используется как отличная классическая органическая химия, так и современная методология поиска биологически активных веществ. В итоге удалось выявить перспективные молекулы и провести их дальнейшие доклинические испытания.

Биологические данные планируемых к синтезу молекул прогнозировались на основании литературных аналогий, и анализа рентгеноструктурных параметров колхицинового сайта связывания. Предпосылкой для выбора темы диссертации послужили биологические данные о важности 3-амино-4-метокси-фрагменте в плане усиления цитотоксичности и водорастворимости комбретастинов.

Кроме того, работа базировалась на разработанном в лаборатории удобном и практичном способе получения галогенизоксазолов из арилгалогенциклопропанов на основе доступного сырья – стиролов, хлороформа и других бром- и фторгалогенметанов.

Важно отметить, что среди многочисленных методов получения изоксазолов автор выбрал реакцию Сузуки, и доказал, что одна и та же реакция годится для последовательного введения практически любых заместителей в различные положения цикла. Каретников нашел, что 3-арилизоксазолы селективно иодируются именно в 4 положение изоксазола, что является ключевым моментом для синтеза наиболее активных структур. Стоит отметить, что эта практически важная реакция иодирования заслуживает дальнейшего исследования в присутствии, других окислителей, например, периодата или перекиси водорода вместо нитрозилсерной кислоты, чтобы увеличить выходы иодизоксазолов. Из прочтения хорошей работы возникает

много идей по ее развитию, в частности синтез уникальной молекулы с 5-F-изоксазолом **127** представляет интерес для исследования реакционной способности и биологической активности на других мишенях. Хотя эта молекула оказалась неактивной в данной работе, причиной этого может быть наличие нитрогруппы к кольце, а не атома фтора.

Разработанные методы и реакции позволили целенаправленно получать большой набор разнообразных по структуре молекул для скрининга.

Основной проблемой в биологических испытаниях является плохая водорастворимость молекул. Именно поэтому автор направил усилия на введение аминогруппы, которая улучшает растворимость, путем гидрирования нитрогруппы, что предсказать заранее было весьма проблематично, учитывая легкость раскрытия изоксазольного цикла. Автор с успехом справился с этой задачей и нашел селективный восстановитель дитионит.

Другой важный момент работы – это демонстрация возможности вводить заместители в 5-положение цикла, в частности метильной группы. На мой взгляд, автор мало уделил внимание изоксазолу **150** с 5-метильной группой в цикле. Эта молекула всего в 2 раза ниже по активности на клетках (что в пределах ошибки измерения активности), чем его 5-H-аналог. Это необычный факт, поскольку во всех других аналогах комбретастина любые заместители гетероцикле, в том числе и метильная группа, резко снижают активность. Кроме того, в этой работе открываются перспективы введения водорастворимых группировок в 5-положение изоксазола, поскольку синтез водорастворимых структур, даже при некотором снижении активности, важная практическая задача для медицины.

Желательно было сделать упор на исследовании таких структур, например, вместо изучения 3,5-диарилизоксазолов, которые априори не обладали существенной активностью, что следовало из литературы и подтвердилось в данной работе, как докинг-расчетами так и экспериментом.

Хорошо продумана и квалифицированно выполнена синтетическая часть диссертации - удалось создать простые и общие способы синтеза целевых 3,4-диарилизоксазолов, арилизоксазолов с атомами галогенов в 4- и 5-положениях. Изоксазолилацетилены, которые автор использовал для синтеза гибридных изоксазол-триазолов, являются хорошими синтонами и для формирования на месте ацетилена незамещенных гетероциклов – пиразолов, изоксазолов, 1,2,3- и 1,2,4-триазолов. Известно, что такие гетероциклы могут связываться с колхициновым сайтом тубулина, как и 3,4,5-триметоксифенильный фрагмент.

В подтверждение высокой квалификации диссертанта достаточно привести несколько примеров, где автор проявил мастерство и изобретательность: осуществление двойной реакции Сузуки с введением последовательно метильного и триметоксифенильного заместителей в изоксазол, селективное гидрирование нитрогруппы в присутствии лабильного изоксазольного цикла с высокими выходами, детальное исследование электрофильного иодирования изоксазола без затрагивания ароматических циклов.

В итоге синтезировано около 150 новых соединений с полным доказательством структур современными физико-химическими методами. Важное место в работе занимают биологические исследования на современном уровне. Автор лично участвовал в разработке растворимых препаративных форм для испытаний *in vivo*, где не только использовал солюбилизующие добавки, но и экспериментально проверял стабильность, условия хранения и контролировал гомогенность растворов непосредственно перед инъекцией мышам. Тем не менее, не вполне ясным остается ряд вопросов. Чем объясняется изготовление форм для инъекций не с индивидуальными солюбилизаторами, а с их смесями (Таблица 11 №№1-8). Почему не разработано несколько препаративных форм с одним из лучших солюбилизаторов - плуроником F127 (3-5%) без других добавок, который на 2 порядка менее токсичен, чем коллифор и дает более стабильные растворы?

Форма №5 с 10%-ной концентрацией коллифора (таблица 11) хранится всего 10 мин. А лучшие препаративные формы получены с очень высокой (20%) концентрацией коллифора (№№ 12-13) стабильны в течение 1-2 суток. Но при попадании в кровь животных эти формы реально разбавляются более, чем в 2 раза и должны быть нестабильными в условиях испытаний? Конечно, такие вопросы выходят за рамки диссертации, и ответы на них не знают даже многие биологи-экспериментаторы.

Хорошо продумана весьма полезная для цели диссертации тема **литобзора**, который посвящен синтезу и биологическим свойствам гетероциклических аналогов комбретастина. Обзор написан грамотным и понятным языком, причем в основном исключительно по зарубежным работам. Правда встречаются незначительные недоточеты: Неправильно нарисована формула комбретастина А-2 на стр.9 На стр. 24, где приведены формулы трех изомерных изоксазолов 4б 4б 50а, надо было нарисовать и четвертый известный изомер 3-(3,4,5-триметоксифенил)-4-(4-метоксифенил)-изоксазол, причем наиболее активный среди них (<https://doi.org/10.1007/s10517-023-05677-6>).

Диссертация выполнена в актуальной области на современном уровне как по постановке задачи и стратегии выполнения, так и по экспериментальному мастерству. Она очень хорошо оформлена, опечатки практически отсутствуют, в эксперименте абсолютно для всех структур помимо ЯМР- и Масс- спектров, выполнен элементный анализ и измерены точки плавления. В экспериментальной части в масс-спектрах приведены даже отнесения пиков, чего уже многие давно не делают. Везде приведены структурные формулы, что сильно облегчает чтение и поиск нужной молекулы.

В диссертации принципиальных недостатков нет, скорее имеются небольшие замечания и пожелания.

1. Желательно было экспериментальную определить растворимость в воде 143, 144, 150 и сравнить с веществом 146 (растворимость менее 0.2 мкг на мл), чтобы показать, что дала аминогруппа в плане растворимости.
2. Для точки плавления вещества 146 в эксперименте следовало привести литературные данные.
3. В таблице 5 отсутствуют номера S10, S11, S13, на которые автор ссылается в тексте
4. Не приведены экспериментальные данные по методике приготовления препаративных форм для испытаний на мышах
5. При обсуждении цитотоксичности автор почему-то использует термин CC50, а не общепринятые IC50 или GI50
6. Синтез фосфата комбретастина А4 и разделение изомеров с TBDMS-защитой следует перенести из обсуждения в эксперимент, поскольку он проводился по известным методикам, или обсудить более детально, если автор внес какие-либо модификации.
7. Почему твин-80 и колифор называются плюроники (стр. 97). В классическом определении плюроники – это полимеры с разлным соотношением этилен- и пропиленоксидных звеньев.

В целом выполнена фундаментальная и одновременно прикладная работа, которая помогает осваивать современную методологию поиска биологически важных веществ, что весьма необходимо для химиков-органиков, работающих в области медицинской химии.

В итоге поставленная в начале диссертации задача по синтезу галогенаризоксазолов и перспективах их использования в новых аспектах медицинской химии решена. Представленное исследование демонстрирует несколько важных путей развития в биологическом и синтетическом направлениях. Необходимо отметить полную достоверность основных положений и выводов диссертации, новизну полученных результатов.

Заключение

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.4.16 – «медицинская химия» и 1.4.3 - «органическая химия» (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель **Каретников Георгий Леонидович** заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 1.4.16 – «Медицинская химия» и 1.4.3 - «Органическая химия»

Автореферат и публикации правильно отражают содержание диссертации.

Официальный оппонент:

Доктор химических наук,

Зав. лабораторией медицинской химии

ИОХ им. Н.Д. ЗЕЛИНСКОГО РАН

Семенов Виктор Владимирович

14.10.2023

Контактные данные:

тел.: 7(499)1356343, e-mail: vs@ioc.ac.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена

диссертация: 02.00.03 – Органическая химия

Адрес места работы:

119991, (Россия) г. Москва, Ленинский проспект, д.47,
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ им. Н.Д. ЗЕЛИНСКОГО
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
Тел.: +7 499 137-71-80; e-mail: ikk@ioc.ac.ru

Подпись д.х.н. В.В.Семенова

Удостоверяю
Ученый секретарь Института Органической
химии им. Н.Д.Зелинского РАН

к.х.н. И.К.Коршевец