

ОТЗЫВ

Официального оппонента Авериной Елены Борисовны на диссертационную работу Филатова Вадима Евгеньевича «Спиро- и диспиро-индолинон- β -лактамы: синтез и исследование биологической активности», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3 – Органическая химия

Дизайн, направленный синтез и исследование противоопухолевой активности новых соединений, перспективных для мишень-ориентированной терапии онкологических заболеваний, является одним из наиболее востребованных направлений медицинской и органической химии. В настоящее время большое число исследований, связанных с разработкой таргетных противораковых препаратов, рассматривает в качестве мишени клеточный белок MDM2. Ингибирование этого белка и блокирование его взаимодействия с белком p53, выполняющим функцию онкосупрессора, приводит к прекращению жизнедеятельности раковых клеток. Известно большое число эффективных низкомолекулярных ингибиторов белка MDM2 различных структурных типов, среди которых производные имидазолина, пирролидина, пиперидинона, дигидроизохиналинона, спироиндолинона и др., однако они пока не нашли применения в клинической практике. Особое место среди лигандов белка MDM2 занимают соединения ряда спироиндолинона, поскольку имеется структурное сходство между этими ингибиторами и белком p53. Кроме того, наличие спиросочлененных фрагментов повышает стабильность и конформационную жесткость молекулы ингибитора и обеспечивает более эффективное связывание с белком-мишенью MDM2. В связи с этим тематика диссертационной работы Филатова В.Е., посвященной дизайну и разработке методов синтеза новых производных спиро- и диспироиндолинона в качестве низкомолекулярных ингибиторов белка MDM2 с целью изучения их антипролиферативной активности, является, безусловно, **актуальной**.

Диссертационная работа имеет классическую структуру и состоит из введения, литературного обзора, обсуждения полученных результатов, экспериментальной части, выводов, списка литературы, включающего 213 наименований. Диссертация изложена на 173 страницах, содержит 77 схем, 23 таблицы, 28 рисунков.

Во *Введении* автор обосновывает актуальность выполненного исследования, указывает его цель и задачи, демонстрирует научную новизну и практическую значимость полученных результатов, их апробацию.

Литературный обзор носит мультидисциплинарный характер и охватывает публикации, в основном, последнего десятилетия в области клеточной биологии, медицинской и органической химии. Автор приводит общие сведения о таргетной терапии онкологических заболеваний, уделяя особое внимание использованию низкомолекулярных ингибиторов определенных молекулярных мишеней. В обзоре приводятся характеристики и принципы функционирования одной из наиболее актуальных на сегодняшний день терапевтических мишеней – клеточного белка MDM2, рассматриваются основные структурные типы его лигандов. Основная часть обзора посвящена анализу синтетических подходов к получению спироиндолинонов, материал систематизирован по типу химических превращений, приводящих к формированию спироциклического скаффолда, включающего различные карбо- и гетероциклы, спироаннелированные с индолин-2-оновым фрагментом. Для большинства описанных реакций циклизации приводятся механизмические схемы с учетом регио- и стереохимии превращений, детально обсуждается проблема диастereo- и энантиоселективности процесса кетен-иминового циклоприсоединения по Штаудингеру, которое приводит к образованию β -лактамного цикла. Также в обзоре уделено внимание наиболее эффективным методам получения изатиниминов и кетенов, которые являются синтетическими предшественниками спироиндолинон- β -лактамов. Материал обзора тщательно систематизирован и проанализирован, что позволяет сделать автору обоснованный вывод о перспективности изучения спироиндолинон- β -лактамов в качестве ингибиторов белка MDM2 и о наиболее удобных синтетических подходах к получению данного структурного типа лигандов.

Основной **целью** собственной экспериментальной работы, которая изложена в главе «Обсуждение результатов», явился дизайн и разработка методов синтеза новых эффективных ингибиторов онкобелка MDM2 на основе спирооксииндоло- β -лактамного фрагмента, а также изучение зависимости цитотоксичности от структуры новых типов лигандов.

В рамках поставленной цели в ходе выполнения диссертационной работы автором был получен ряд новых важных и интересных результатов, которые определяют **Научную новизну и Практическую значимость работы**. Следует отметить, что автор с использованием метода компьютерного моделирования предложил новый структурный тип ингибиторов онкобелка MDM2 на основе индолин-2-онов, спиросочлененных с β -лактамным циклом. При поиске оптимальной структуры лигандов учитывалась не только природа заместителей в азетидиновом цикле, но также их пространственное

расположение, что позволило аргументировать выбор наиболее перспективных объектов исследования и сосредоточить усилия на разработке методов их синтеза.

Синтетическая часть диссертационной работы включает разработку диастереоселективных методов синтеза новых структурных типов спиро- и диспирооксииндоло- β -лактамов на основе реакции кетен-иминового циклоприсоединения по Штаудингеру с участием 3-арилиминоиндолин-2-онов и производных фенилуксусных или 2-оксопирролидин-3-карбоновых кислот. Важным теоретическим и практическим достижением диссертанта является создание универсальной синтетической методологии, позволяющей в зависимости от используемых условий и реагентов формировать преимущественно *цис*- или *транс*-диастереомеры азетидинового цикла в молекулах спиро- и диспиро[азетидин-2,3'-индолин]-2',4'-дионон. Автор также предложил наиболее вероятную механистическую схему образования азетидинового цикла с учетом стереохимии исходных иминов и кетенов, объясняющую диастереоселективность реакции. К несомненным достоинствам данного метода следует отнести доступность исходных реагентов, отсутствие необходимости выделения образующихся в ходе реакции кетенов, простоту экспериментальной методики, возможность масштабирования синтеза и вовлечения субстратов с разнообразным набором заместителей. Хочется также отметить большую работу диссертанта по получению синтетических предшественников целевых соединений. В частности, было опробовано несколько синтетических процедур получения *N*-арил-3-иминоиндолин-2-онов с использованием реакции конденсации изатинов с анилинами или аза-реакции Виттига, что позволило автору синтезировать широкий круг иминов преимущественно *E*-конфигурации с хорошими выходами.

Необходимо подчеркнуть, что диссертант не только синтезировал большой ряд новых гетероциклических соединений спиро- и диспиростроения, но также выполнил важную работу по оценке *in vitro* цитотоксической активности их индивидуальных *цис*- и *транс*-диастереомеров на серии раковых клеточных линий. Были найдены корреляции между структурными параметрами исследуемых производных индолин-2-она и их цитотоксичностью, показано, что *цис*-изомеры спирооксииндоло- β -лактамов проявляют более высокую антипролиферативную активность по сравнению с *транс*-изомерами, что согласуется с данными компьютерного молекулярного моделирования. Также было обнаружено, что наличие конформационно-жесткого диспироциклического скаффолда в молекулах диспиро[индолин-3,2'-азетидин-3',3"-пирролидин]-2,2'',4'-трионон приводит к росту цитотоксической активности даже для *транс*-диастереомеров.

Таким образом, в результате тщательно выполненного исследования диссертант разработал ряд общих эффективных методов и подходов, которые можно использовать для диастереоселективного синтеза новых структур ряда индолин-2-она спиро- и диспиростроения, а также их синтетических предшественников. Предложенные в работе методы позволяют получать спиро- и диспирооксииндоло- β -лактамы с разнообразными заместителями, осуществлять направленный синтез соединений с ожидаемой антипролиферативной активностью. Общий характер разработанных В.Е. Филатовым синтетических подходов подтверждается большим числом (>70) полученных новых уникальных соединений с ценными свойствами.

Экспериментальная часть содержит описание синтеза соединений, их спектральные и аналитические данные, а также характеристики используемых в работе приборов. Следует особо отметить, что разработанные экспериментальные методики позволяют получать целевые соединения в диастереомерно чистом виде с хорошими выходами. **Достоверность** полученных результатов обеспечена применением комплекса современных научных экспериментальных подходов, согласованностью с литературными данными, надежным доказательством строения всех полученных соединений с использованием современных спектральных методов анализа (ЯМР ^1H и ^{13}C спектроскопии, в том числе, с применением двумерных методик, ИК спектроскопии, масс-спектрометрии). Брутто-формулы новых соединений подтверждены масс-спектрами высокого разрешения, кроме того, для некоторых ключевых соединений выполнен рентгеноструктурный анализ.

Объем выполненной экспериментальной работы велик, а ее качество находится на очень высоком уровне. Основное содержание изложенного в работе материала опубликовано в 4 статьях в высокорейтинговых зарубежных и российских журналах, а также в 7 тезисах докладов на российских и международных конференциях. В результате анализа текста диссертации, автореферата и публикаций Филатова В.Е. можно заявить, что **цель работы достигнута** и все *запланированные задачи выполнены*. Принципиальных недостатков в работе Филатова В.Е. нет. Замечания не затрагивают сущность работы, носят характер пожеланий или вопросов, а также касаются оформления работы.

- С учетом целей и задач диссертационной работы в литературном обзоре было бы полезно привести данные по противораковой активности для известных ингибиторов белка MDM2, в том числе, для производных спироиндоли-2-она, которые являются прототипами изучаемых в работе соединений.

- Соотношение E\Z-изомеров при образовании изатиниминов в аза-реакции Виттига заметно различается в зависимости от электронной природы заместителя в ароматическом кольце фосфазена и увеличивается при переходе от акцепторных к донорным заместителям. Чем объясняется причина такой диастереоселективности?

- При оптимизации условий реакции Штаудингера с участием оксалилхлорида при увеличении избытка арилуксусной кислоты по отношению изатинимину до полуторакратного наблюдается увеличение количества *цис*-диастереомера спирооксиндоло-β-лактама. Может ли автор прокомментировать найденную зависимость?

- Автор проделал большую работу по анализу структуры диастереомеров производных спирооксиндоло-β-лактама с использованием данных рентгеноструктурного анализа, ЯМР спектроскопии, а также различий в хроматографической подвижности. Для удобства соотнесения E\Z-изомеров было бы полезно составить отдельную таблицу в приложении с данными R_f и характеристичными сигналами спектров ЯМР ^1H для индивидуальных диастереомеров.

- Имеются замечания по оформлению работы, в частности, рисунки с результатами молекулярного докинга малоинформативны. Имеется путаница с номерами соединений, например, на стр. 60, 69, 76, 93. Очевидно, концентрация соединений в МТТ тесте (рис. 22) должна быть приведена в мкМ (не в мМ). В экспериментальной части для выделенных с помощью метода колоночной хроматографии индивидуальных диастереомеров производных спирооксиндоло-β-лактама следует привести данные по хроматографической подвижности, также для твердых соединений необходимо указывать температуру плавления. В спектрах ЯМР ^{13}C для фторсодержащих соединений следовало бы привести КССВ С-Ф. Также в спектрах ЯМР ^{13}C соединения 18 отсутствует сигнал Ме-группы, для соединений 42, 55а, 106 имеются химсдвиги сигналов, не соответствующих структуре, для соединения 83а отсутствуют спектры ЯМР. В тексте диссертации имеются опечатки.

В целом, несмотря на отмеченные замечания, диссертация представляет собой законченную научно-исследовательскую работу на актуальную тему. Работа соответствует паспорту заявленной специальности 1.4.3. – Органическая химия в пунктах: 1. Выделение и очистка новых соединений; 3. Развитие рациональных путей синтеза сложных молекул; 7. Выявление закономерностей типа «структура-свойство»; 8. Моделирование структур и свойств биологически активных веществ; 10. Исследование стереохимических закономерностей химических реакций и органических соединений.

Результаты, полученные диссертантом, имеют существенное значение для развития синтетических подходов к практически значимым гетероциклам ряда спироиндоли-2-она.

На основании проведенного анализа можно заключить, что диссертационная работа Филатова В.Е. по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности, научной новизне и практической значимости, безусловно, соответствует требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работе подобного рода. Кроме того, работа соответствует критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, оформлена согласно положениям №5,6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, а ее автор, **Филатов Вадим Евгеньевич** заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3 - Органическая химия.

Официальный оппонент:

доктор химических наук

по специальности 02.00.03 – органическая химия,

профессор кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза

Химического факультета МГУ

Аверина Елена Борисовна

Почтовый адрес: 119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

Телефон: +74959391234

Адрес электронной почты: elaver@med.chem.msu.ru

Наименование организации:

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»,

Химический факультет

14 октября 2022 г.