

ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук

Ефремова Александра Михайловича

на тему: «**Синтез и биологическая активность новых соединений на основе**

2-оксиндольного скаффолда»

по специальности 1.4.16. Медицинская химия

Диссертационная работа Ефремова Александра Михайловича посвящена разработке новых соединений, содержащих в своем составе 2-оксиндольный фрагмент, которые, будучи аналогами мелатонина, могли бы снижать внутриглазное давление и, таким образом, помогать лечению глаукомы. В настоящее время существует немалое число препаратов для лечения глаукомы, которые относятся к различным классам, однако некоторые лекарства оказываются неэффективными ввиду индивидуальной непереносимости или в связи с возникновением тахифилаксии. Исходя из данных, что мелатонин, а в еще большей степени селективный агонист МТ₃-рецептора 5-MCA-NAT, являясь биоизостером мелатонина, способствует снижению внутриглазного давления, автором диссертации выдвинуто предположение, что, поскольку основой мелатонина и 5-MCA-NAT является индольный структурный фрагмент, его можно заменить на более стабильный 2-оксиндольный фрагмент, при этом сохранив необходимый биологический эффект. В работе поставлена следующая цель: разработать новые производные 2-оксиндолов с гипотензивной активностью, которые обладали бы нейропротекторным действием, с дальнейшей перспективой создания новых антиглаукомных препаратов с улучшенными фармакокинетическими и фармакодинамическими характеристиками. В связи с этим тематика данного диссертационного исследования, безусловно, является *актуальной*.

Диссертация А.М. Ефремова состоит из следующих частей: Введение, Обзор литературы, Обсуждение результатов, Экспериментальная часть, Заключение и Список литературы. Работа изложена на 170 страницах, содержит 74 рисунка, 22 таблицы, список литературы включает 315 наименований. Во **Введении** автор характеризует актуальность работы, формулирует цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов.

Обзор литературы состоит из четырех взаимосвязанных частей. Вначале А.М. Ефремов кратко описывает причины возникновения глаукомы, в чем она проявляется и какие способы лечения в настоящее время предлагаются. Данный раздел обзора носит в большей степени медицинский и ознакомительный характер, в нем подчеркивается, что именно стабилизация внутриглазного давления является основной целью терапии глаукомы, при этом существуют и более радикальные методы, такие как лазерная терапия, хирургическое вмешательство. Указаны способы классификации глаукомы по разным критериям (первичная и вторичная, открытоугольная и закрытоугольная, гипертензивная и нормотензивная). Отмечается, что в настоящее время исследования сосредоточены на изучении новых перспективных направлений терапии, включая разработку нейропротекторных методов лечения, не зависящих от уровня внутриглазного давления, использование генетических маркеров заболевания, а также применение передовых биотехнологий, таких как клеточная и генная терапия.

Далее автором рассмотрены препараты для терапии глаукомы, которых в настоящее время известно семь групп. Это 1) аналоги простагландинов (7 препаратов), 2) агонисты α -адренорецепторов (5 препаратов), 3) β -блокаторы (5 препаратов), 4) ингибиторы карбоангидраз (6 препаратов), 5) холинергические препараты (5 представителей), 6) ингибиторы Rho-киназы (4 известных

лекарства и два новых соединения, прошедших доклинические испытания), 7) NO-доноры (2 препарата). Каждая из указанных групп препаратов предназначена для определенной терапевтической мишени, при этом разработки новых соединений предпринимаются по разным направлениям. Так, в последние годы синтезировано и изучено немало мультитаргетных ингибиторов hCA II и AChE, что обусловлено их широким терапевтическим потенциалом не только в офтальмологии, но и при лечении других патологий. С другой стороны, изучаются новые ингибиторы ROCK и NO-доноры. Кроме того, автор отмечает, что всего мишеней, так или иначе связанных с терапией глаукомы огромное число (порядка 2700). В этой связи в обзоре рассмотрен ряд соединений, прошедших доклинические испытания и относящихся к следующим типам: модуляторы аденозиновых рецепторов, ингибиторы сосудистой эндотелиальной тирозинфосфатазы (VE-PTP), натрийуретические пептиды типа С, доноры сероводорода, модуляторы каннабиноидных, серотониновых и мелатониновых рецепторов. Последние наиболее интересны с точки зрения собственных исследований автора. Так, показано, что ранее разработанные в научной группе биоизостеры мелатонина, действующие на рецептор MT3, также способны к связыванию с ферментом хинон оксидоредуктазой 2 (NQO2). Указывается, что прямая биоизостерическая замена индола на оксиндол в структуре мелатонина, не приводящая к увеличению гипотензивного эффекта, увеличивает длительность его действия в организме за счет роста стабильности соединений такого рода.

Последняя часть Обзора литературы посвящена методам синтеза функционально замещенных 3-гидрокси-2-оксиндолов. А.М. Ефремов рассматривает три главных подхода к соединениям такого строения: замыкание оксиндольного цикла, окисление 3-замещенных оксиндолов, синтеза на основе изатина. Два первых обладают относительно небольшой областью применения, а наиболее разнообразные структуры удастся получить реакциями с изатином.

Среди них реакция Мориты-Бейлиса-Хиллмана, Фаворского, Фриделя-Крафтса, присоединение борорганических соединений и алифатических галогенпроизводных, различные реакции конденсации. Особенный интерес вызывают реакции присоединения в асимметрическом варианте. Именно на основе изатина получены новые соединения в данном диссертационном исследовании.

Следует отметить, что Обзор литературы содержит очень большой объем информации, непосредственно относящейся к тематике собственного исследования автора, материал хорошо систематизирован, для всех классов соединений, используемых для лечения глаукомы, а также и для перспективных кандидатов рассмотрены механизмы биологического действия. В части, описывающей синтетические подходы, показано несколько альтернативных подходов к получению указанных гетероциклов, приведены достаточно подробные условия проведения реакций, продемонстрирован спектр получаемых соединений, содержащих различные заместители. Всего в обзоре рассмотрено порядка 290 литературных источников, при этом примерно половина из них относятся к последнему десятилетию, что дополнительно свидетельствует об актуальности работы.

Собственные достижения А.М. Ефремова как в части синтеза новых соединений, так и исследования их биологической активности подробно изложены в **Обсуждении результатов**. В начале данной главы автором приводятся аргументы в пользу использования реакции конденсации изатина с малоновой и цианоуксусной кислотами для получения 3-цианометил и 3-карбоксиметил-3-гидрокси-2-оксиндолов, представлены два альтернативных механизма взаимодействия в условиях основного катализа. Далее обсуждаются эксперименты по оптимизации данной конденсации в условиях микроволнового облучения на примере модельной реакции 5-нитроизатина. Показано, что в

случае малоновой кислоты следует использовать ее двукратный избыток для достижения полной конверсии изатина. В оптимизированных условиях проведена серия реакций замещенных изатинов, в основном, содержащих в положениях 5 и 7 нитро- и метокси-группы, при этом проведено сравнение результатов, полученных в ходе микроволнового облучения и при обычном кипячении в диоксане. При определенном сочетании реагентов выходы целевых продуктов конденсации в том и другом случае могут превышать 90%, однако отмечается, что микроволновая активация в целом предпочтительней, т.к. в этом случае реакция проходит за 10 мин, а также реакционные смеси содержат меньше побочных соединений, что облегчает очистку продуктов. Автором также с использованием недавно разработанной методики получена серия 3-цианометил- и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов, не содержащих гидроксильной группы, для дальнейшего сравнения их активности с веществами, содержащими ОН-группу в положении 3. Выходы целевых соединений находятся в диапазоне от умеренных до очень высоких. Большинство полученных в данном разделе соединений были изучены с точки зрения их ингибирующей активности по отношению к NQO2 и гипотензивного эффекта. Наибольший гипотензивный эффект показали соединения **2i** и **2h**, снижающие внутриглазное давление на 5.60 и 5.25 мм рт.ст. соответственно, что почти вдвое превосходит эффект тимолола (2.63–3.00 мм рт.ст.) и мелатонина (2.71 мм рт.ст.). Хотя явной связи между аффинностью к данному рецептору и биологической активностью *in vivo* не было выявлено, тем не менее, был сделан вывод о полезности арильного фрагмента в структуре соединения и благотворности сочетания гидроксильной и цианометильной групп в положении 3 оксиндольного кольца.

Во второй части Обсуждения результатов А.М. Ефремов приводит результаты синтеза ряда 3-гидрокси-3-цианометил- и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов, содержащих в положении 5 арильные и тиазольный заместители. Данные продукты получены с выходами от умеренных до высоких также в

условиях микроволновой активации. Проведено молекулярное моделирование связывания полученных соединений с активным сайтом фермента NQO2. Результаты биологических испытаний, к сожалению, не дали положительных результатов в связи с высокой гидрофобностью данных соединений и невысокой степенью ингибирования фермента NQO2.

У автора возникли трудности при попытке восстановить нитрогруппу в положении 5 продуктов конденсации: никакие из опробованных им восстановителей, кроме цинка в кислой среде, не дали положительного результата. В итоге целевые 5-аминопроизводные были получены со средними выходами. Они были введены в реакцию восстановительного аминирования с рядом замещенных бензальдегидов, выходы целевых производных анилинов сильно различаются (25-81%). Ожидалось, что свободное вращение арильной группы вокруг связи C-N, а также использование соединений в виде гидрохлоридов увеличит их биодоступность и аффинность по отношению к NQO2 и усилит их гипотензивное действие. Для полученных соединений было проведено молекулярное моделирование *in silico*, а также молекулярно-динамическое моделирование для оценки образования комплексов с рецептором NQO2, в результате было предсказано предпочтительное связывание с соединением **11h**, содержащим в своем составе фрагмент 2,4-диметоксианилина. Биологические исследования выявили, что наибольший гипотензивный эффект показывает соединение **11b**, содержащее 4-хлоранилиновый фрагмент (снижение внутриглазного давления на 3.67 мм рт.ст.), при этом оно довольно слабо ингибирует NQO2, а более мощный ингибитор **11h** только незначительно снижает внутриглазное давление. Такое отсутствие корреляции между гипотензивным эффектом и взаимодействием с NQO2 свидетельствует о том, что синтезированные оксиндолы снижают давление посредством взаимодействия не с мелатониновым рецептором третьего подтипа, а с каким-то иным. При этом

снова показано, что соединение, содержащее гидрокси- и цианометильную группы в 3 положении, превосходит по биологическому эффекту свои аналоги.

На заключительном этапе работы диссертант выдвинул предположение, что введение в положение 5 оксидольного цикла сульфонамидной фармакофорной группы может заметно увеличить аффинность конечной структуры к карбоангидразам, поскольку большинство антиглаукомных ингибиторов карбоангидраз содержат в своей структуре эту группу. Сульфохлорирование изатинов проводили по известному методу с использованием хлорсульфоновой кислоты, при этом, как и ожидалось, получалась смесь двух продуктов, которую можно было использовать для получения ряда сульфонамидов взаимодействием с избытком диэтиламина, пиперидина или морфолина, однако с первичными аминами такой путь невозможен из-за побочных реакций. С другой стороны, автору удалось получить *N*-незамещенный 5-аминоссульфонизатин. Далее была осуществлена конденсация полученных 5-сульфонмидизатинов с цианоуксусной и малоновой кислотами в условиях термической активации, при этом выходы целевых соединений составили от 55 до 77%. Эксперименты *in vivo*, проведенные с использованием нормотензивных кроликов и крыс, показали, что наибольшую гипотензивную активность продемонстрировали соединения **16c** и **16f**: их показатели по снижению внутриглазного давления существенно превышают гипотензивный эффект референсных препаратов тимолола и дорзоламида, при этом исследуемые соединения применялись в значительно меньшей концентрации (0,1%) по сравнению со стандартными терапевтическими концентрациями тимолола (0,5%) и дорзоламида (2%). Максимальная активность наблюдается через 5 ч по сравнению с 3 ч у тимолола, что указывает на пролонгированный эффект. Результаты биологических испытаний *in vitro* показали, что соединение **16e** наиболее активно в ингибировании эстеразной активности карбоангидразы II, будучи при этом неактивным в снижении

внутриглазного давления; с использованием культуры клеток нейробластомы человека SH-SY5Y в рамках МТТ-теста продемонстрировано отсутствие статистически значимой цитотоксичности у большинства соединений, за исключением **16с**, показавшим очень умеренную цитотоксичность.

В **Экспериментальной части** приводятся подробные методы синтеза как описанных ранее, так и многочисленных новых соединений, полученных в ходе выполнения диссертации. Новые вещества полно охарактеризованы современными аналитическими методами: спектрами ЯМР ^1H и ^{13}C , масс-спектрами высокого разрешения, в ряде случаев приводятся данные ИК спектроскопии, элементного анализа, а также ВЭЖХ-МС. Из представленных данных следует, что вещества получены в индивидуальном состоянии, в достаточных количествах для проведения биологических испытаний, их строение однозначно установлено, методики хорошо воспроизводимы, что свидетельствует об полной **достоверности** полученных результатов и об экспериментальном мастерстве диссертанта. Вторая часть данной главы описывает разнообразные биологические испытания синтезированных соединений. Подробно рассмотрены методики проведения тестов *in vitro* и *in vivo*, исследования цитотоксичности проведены на клетках линии нейробластомы человека SH-SY5Y. В конце данной главы описываются методы изучения соединений *in silico*. В разделе **Заключение** сделаны обоснованные выводы и показаны перспективы развития данной работы. **Список литературы** содержит 315 наименований и оформлен по правилам.

Приведенные данные о разработанных синтетических подходах и впервые полученных соединениях с уникальным фармакологическим профилем однозначно свидетельствуют о **научной новизне** проведенного исследования, а также о **теоретической и практической значимости** полученных результатов.

В целом диссертационное исследование характеризуется законченностью и внутренним единством, непротиворечивостью имеющихся литературных данных, теоретическими предпосылками исследования, полученными экспериментальными данными и выводами, сделанными на их основе. Материалы исследования опубликованы в 5 научных статьях, они были апробированы на 9 российских и зарубежных конференциях.

Диссертационное исследование А.М. Ефремова удовлетворяет пунктам 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 8 Паспорта научной специальности 1.4.16. «Медицинская химия», поскольку включает структурный дизайн и синтез новых 2-оксиндолов на основе мелатонина (п. 1), молекулярный докинг для изучения взаимодействия с NQO2 (п. 2), биоизостерическую замену индола на оксиндол и оптимизацию заместителей (п. 3), изменение баланса липофильности/гидрофильности (п. 4), создание мультитаргетных соединений с гипотензивной и антиоксидантной активностью (п. 5), *in vivo* и *in vitro* тестирование (п. 6), а также ЯМР и масс-спектрометрическую характеристику (п. 8).

По работе можно сделать некоторые замечания и задать следующие вопросы:

- 1) В Обзоре литературы некоторые параграфы имеют неудачные названия: 2.3.2. Сигнальный путь ангиопоэтин/Tie и 2.3.4. Сероводород. Лучше было бы назвать, например «Доноры сероводорода».
- 2) В Обзоре литературы было бы лучше указывать выходы не диапазоном, а показывать, для каких конкретно заместителей получены те или иные выходы. Также, в части, где описываются производные 2-оксиндолов, было бы очень полезно для дальнейших обсуждения в рамках собственных работ указывать конкретные положения конкретных заместителей.

- 3) Почему в основном были синтезированы производные с заместителями в положениях 5 и 7 оксиндольного фрагмента, при этом преимущественно с нитрогруппой и метокси-группой?
- 4) Чем объяснить, что при комнатной температуре реакция изатина с цианоуксусной кислотой идет иначе, чем при нагревании?
- 5) Верно ли, что нитрилы **5a,b** более устойчивы к гидролизу, чем нитрилы **5c,d**? И если это так, с чем это может быть связано?
- 6) Для ряда соединений типа **1, 2, 15** приведены только спектры ЯМР, при этом не для всех указаны литературные ссылки (показаны ссылки только на собственные работы автора диссертации).
- 7) В спектрах ЯМР ^1H для ряда соединений в одних случаях приведено отнесение сигналов, а в других его нет.

Совершенно очевидно, что указанные замечания никак не снижают общей высокой оценки выполненной диссертационной работы.

Диссертация Ефремова Александра Михайловича является законченной научно-квалификационной работой, а задачи, связанные с проблемой разработки подходов к синтезу новых биологически активных 2-оксиндолов, которые были решены в ходе проводимого исследования, несомненно, имеют важное значение для развития медицинской химии.

Диссертация «Синтез и биологическая активность новых соединений на основе 2-оксиндольного скаффолда» Ефремова Александра Михайловича отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.4.16. Медицинская 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. Диссертационное исследование оформлено согласно

требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Ефремов Александр Михайлович заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.16. Медицинская химия.

Официальный оппонент:

доктор химических наук,

ведущий научный сотрудник кафедры органической химии химического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Аверин Алексей Дмитриевич *подпись*

14.05.2026

Контактные данные:

Тел.: +7 (495) 939-11-39; e-mail: averin@org.chem.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 02.00.03 – Органическая химия.

Адрес места работы:

119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, химический факультет.
Тел. +7 (495) 939-11-39; e-mail: averin@org.chem.msu.ru

Личную подпись *Аверин А.Д.*

ЗАВЕРЯЮ: *подпись, печать*

Зам. Нач. отдела делопроизводства
химического факультета МГУ

Паланская В. В.