ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу *Северіної Ганни Іванівни* на тему: «Синтез та фізико-хімічні характеристики ЦНС-агентів серед похідних піримідин-4-ону та піримідин-2(4)-тіону», представлену до спеціалізованої вченої ради Д.64.605.01 при Національному фармацевтичному університеті надану на здобуття наукового ступеня доктора фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 - фармацевтична хімія та фармакогнозія

1.Актуальність теми дисертаційної роботи та її зв'язок з державними і галузевими програмами, пріоритетними напрямками розвитку науки та техніки. Дисертаційна робота Северіної Ганни Іванівни «Синтез та фізико-хімічні характеристики ЦНС-агентів серед похідних піримідин-4-ону та піримідин-2(4)-тіону» присвячена актуальній проблемі сучасної фармацевтичної хімії – молекулярному дизайну гетероциклічних структур як потенційних біологічно активних речовин та є продовженням масштабних досліджень, що проводяться науковцями Національного фармацевтичного університету щодо цілеспрямованого пошуку ЦНС-агентів, зокрема протисудомних засобів. Не викликає сумніву раціональність дослідження саме похідних піримідину як потенційних ЦНС-агентів, адже їх безпосередній вплив на функції ЦНС був доведений неодноразово, а впровадження у медичну практику лікарських засобів на їх основі розпочалося ще за часів виявлення барбітурової кислоти та її аналогів. Опрацювання раціональних підходів до дизайну ЦНС-агентів з поєднанням фармакофорної моделі протисудомної активності, гібрид-фармакофорного підходу та інноваційних віртуальних методів скринінгу є безперечно вдалим, актуальним та сучасним науковим підходом, особливо в умовах необхідності обґрунтованого та виваженого застосування піддослідних тварин. Авторка вдало поєднує мотодики *in silico* скринінгу з використанням та обробкою експериментальних даних в цьому напрямку, що збільшує ефективність та результативність дослідження, та дозволяє дотримуватися біоетичних норм використання тварин. Отже, вибір об'єктів дослідження, постановка завдання є вдалими, теоретично обґрунтованими та ретельно спланованими, а актуальність дисертаційної роботи не викликає сумніву.

Дисертаційна робота виконана відповідно до плану проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України і є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету за темою «Молекулярний дизайн і цілеспрямований синтез нових біологічно активних органічних речовин та їх фокусованих комбінаторних бібліотек» № державної реєстрації № 0114U000944

2. Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Глибокий аналіз літературних даних щодо структурних особливостей інноваційних протиепілептичних засобів, напрямків епілептогенезу, механізмів реалізації

протисудомної дії відомих протиепілептичних препаратів, структури біомішеней, конформаційного аналізу розміщення та відповідного каскаду перетворень обумовили логічну та виважену тактику експериментальних досліджень. Кожний етап експерименту має під собою достатній рівень теоретичного обґрунтування та підкріплений результатами *in silico* розрахунків методами віртуального скринінгу. Використання молекулярного докінгу є коректним та виконано за допомогою програми з вільним доступом – AutoDockVina. Все це у комплексі дозволило звузити коло пошуку, оптимізувати напрямки досліджень та обрати найбільш перспективні структури серед згенерованої оригінальної бібліотеки піримідинових похідних.

Достовірність одержаних автором результатів не підлягає сумніву оскільки всі характеристики об'єктів визначені з використанням сучасних фізико-хімічних методів, зокрема ^{1}H, ^{13}C ЯМР та NOESY-спектроскопії, хромато-мас-спектрометрії та рентгеноструктурний аналіз. На мою думку, поставлені в роботі мета та завдання реалізовані на високому науковому рівні.

3. Новизна дисертаційних досліджень. Уперше теоретично обґрунтовано та експериментально доведено сучасну методологію таргет-орієнтованого пошуку ЦНС-агентів у ряду похідних піримідин-4-ону та піримідин-2(4)-тіону. Визначено ефективні методики синтезу й одержано нові похідні піримідину, з'ясовано їх будову, вивчено фізико-хімічні властивості та проведено системний скринінг на PTZ-моделі судом. За результатами скринінгу визначено великий кластер значущих та критичних для прояву протисудомної активності фрагментів і сформульовано чіткі закономірності зв'язку «структура – антиконвульсантна активність».

Дисертанткою визначено умови для регіоселективного перебігу реакції алкілування 2-алкіл/арил-5,6-R^1,R^2-піримідин-4(3*H*)-онів хлорацетамідами та доведений вплив субституєнтів у 2 положенні базового гетероциклу на перебіг реакції та вперше одержано відповідні ізомерні *N*- та *O*-заміщені похідні. Методом РСА доведено, що алкілування 1-арилпіразоло[3,4-*d*]піримідин-4-онів хлорацетамідами та хлор-1-(4-арилпіперазиніл)етаноном відбувається за атомом нітрогену в 5 положенні піразолопіримідинового циклу. Розроблено оптимальні методики та одержано серії нових амінованих похідних 4-хлоро-2-метил/арил-6-R-піримідину: 4-гідразино-, 4-арилпіперазино-2-метил/арил-6-R-піримідинів, а також 2-(6-метил-2-(4-трифлуорометил)-піримідин-4-іл)аміноацетатну та -амінопропіонову кислоти. Одержано 2-ариламіно-, 2-ариліденгідразино- та N-ацетил/бензоїлгідразино-6-метил-піримідин-4(3*H*)-ону з використанням як вихідного інтермедіата 6-метил-2-метилтіопіримідин-4(3*H*)-ону.

Уперше систематизовано та обґрунтовано вибір біомішеней для молекулярного докінгу щодо механізмів реалізації конвульсивної дії у скринінгових моделей та експериментально доведено можливість їх використання для прогнозування активності в експерименті *in vivo*. За результатами експериментальних даних сформовано уніфікований алгоритм раціонального пошуку ПЕП, що складається з поетапного використання

докінгових досліджень та скринінгових *in vivo* моделей і ґрунтується на взаємозв'язку «біомішень – референс-ліганд – конформаційне розміщення ліганду – скринінгова модель – механізм реалізації активності». Одержані дані є цінним вкладом для спільноти науковців, які займаються раціональним «drug-design».

Авторкою ідентифіковано найактивнішу субстанцію – 1-(4-метоксифеніл)-5-(2-(4-(4-метоксифеніл)-піперазин-1-іл)-2-оксо-етил)піразол[3,4-d]піримідин-4-он («Епімідин») – з багатофакторним профілем протисудомної активності, низьким рівнем токсичності та сприятливими супутніми властивостями.

Новизна рецензованого дослідження захищена 2 патентами України на винахід: пат. № 105242 N-(3,4-диметоксифеніл)-2-{[2-метил-6-(піридин-2-іл)піримідин-4-іл]тіо}ацетамід, що проявляє протисудомну активність; пат. №116226 5-R-1-Арил-1,5-дигідро-4H-піразоло[3,4-d]піримідин-4-они, що виявляють протисудомну активність.

Одержані в дисертаційній роботі результати повністю відповідають критеріям новизни в галузі органічної, фармацевтичної та медичної хімії серед похідних піримідин-4-ону та піримідин-2(4)-тіону і свідчать про високий науковий рівень роботи.

4. Теоретичне значення результатів дослідження. Рецензована робота Северіної Г. І. безперечно є теоретичним підґрунтям для подальших наукових досліджень в ряду похідних піримідин-4-ону, піримідин-2(4)-тіону та піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону. Запропонована дисертанткою оригінальна стратегія до раціонального та оптимізованого дизайну потенційних протисудомних засобів, яка враховуючи її нестандартність, безсумнівно є важливим вкладом у медичну та фармацевтичну хімію. В роботі вдало застосовано фармакофорну модель протисудомної активності з розстановкою акцентів, щодо важливості та ролі кожного з них, що може стати теоретичною основою для наступних дизайнів ЦНС-агентів. Визначені закономірності «структура-протисудомна активність» можуть стати підґрунтям ймовірного прогресу в створенні фармакотерапевтичних агентів для терапії епілепсії, оскільки поповнили арсенал теоретичних знань щодо раціонального конструювання ЦНС-агентів.

5. Практичне значення результатів дослідження. У роботі наведено системне дослідження фізичних, хімічних та фармакологічних властивостей похідних піримідин-4(*3H*)-онів та -2(4)-тіонів, які є новими та цікавими реагентами для досліджень в хімії гетероциклічних сполук. В ході виконання експериментальної частини роботи розроблено доступні методики синтезу, що можуть бути покладені в основу синтезу групи нових біологічно активних речовин похідних піримідин-4-ону, піримідин-2(4)-тіону та 1-арилпіразоло[3,4-d]піримідин-4-ону. Розроблені методики контролю якості «сполуки-лідера» – 1-(4-метоксифеніл)-5-(2-(4-(4-метоксифеніл)-піперазин-1-іл)-2-оксо-етил)-піразол[3,4-d]піримідин-4-ону, зокрема і визначенні супровідні домішоки супстанції епімідину. Модифіковану методику синтезу щодо принципів «зеленої хімії» та умов промислового виробництва та

методики контролю якості субстанції «Епімідин» апробовано в умовах підприємства АТ «Фармак». Субстанція «Епімідин» внесена до плану наукових розробок лікарського засобу АТ «Фармак» на 2019-2022 рр (акт впровадження №127/7 від 28.01.2021).

Визначена кореляція між *in silico* та *in vivo* експериментальними даними, чітко опрацьовані та прописані методології процесу докінгу з описом координат активних сайтів обумовлює доступність запропонованого алгоритму пошуку ПЕП до застосування науковцями для інших похідних піримідину, що має практичне значення та може стати інструментом раціоналізації фармакологічних досліджень.

Результати експериментальних досліджень використовуються в науковому та навчальному процесі кафедр фармацевтичної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова, Запорізького державного медичного університету, Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, Національного університету «Чернігівський колегіум» ім. Т. Г. Шевченка, Одеського державного медичного університету.

6. Повнота викладу основних результатів дисертації в наукових фахових виданнях. Фаховість та високий рівень наукових досліджень доводять опубліковані у міжнародних та фахових виданнях України наукові праці: 19 статей, з яких 8 – у виданнях, що індексуються базою даних Scopus (дві статті у журналах Q2, дві – Q3, три – Q4). Також одержано 2 патенти України на винахід та 1 інформаційний лист про нововведення у сфері охорони здоров'я. Матеріали фрагментів дисертаційної роботи також опубліковані в 21 тезах доповідей та обговорювались на з'їздах та конференціях різних рівнів. Опубліковані роботи повністю відображають зміст та результати дисертаційної роботи.

7. Зауваження щодо змісту і оформлення дисертації та автореферату, завершеності дисертації в цілому. Дисертаційна робота викладена на 310 сторінках основного тексту, складається із вступу, огляду літератури, п'яти експериментальних розділів, загальних висновків, списку літератури та семидодатків, який містить 448 найменувань, з них 381 латиницею та 67 кирилицею, 8 додатків. Роботу проілюстровано 15 схемами, 135 рисунками та 78 таблицями.

В огляді літератури представлено дані щодо епідеміології епілепсії у різних країнах, наведена сучасна класифікація судомних нападів та можливості їх фармакокорекції їх терапії; деталізовано відомі напрями запобігання епілептогенезу, описано наявні інноваційні біомішені для протиепілептичних та інших ЦНС-агентів, схарактеризовано їх структуру та активні сайти, розглянуто можливі варіанти конформаційного розміщення лігандів у біомішенях з відповідною фармакологічною відповіддю рецептору/ферменту. Проведено системний аналіз сучасних досягнень щодо впливу похідних піримідину на діяльність ЦНС та обґрунтовано актуальність і перспективи подальших досліджень зазначеного класу сполук.

У *другому розділі* складено дизайн дослідження з використанням сучасних принципів «drug-design», згенеровано структуру цільових сполук у відповідності з сучасною фармакофорною концепцією протисудомної активності. Запропоновані ГАМКергічні біомішені для віртуального скринінгу з метою прогнозування активності сполук на пентилентептразолові моделі судом щодо механізму реалізації конвульсивної дії хемотоксину. Здійснено ранжування сполук за афінітетом після докінгу в активні сайти ГАМКергічних біомішеней та відібрані сполуки-кандидати для синтезу. Для всіх структур з використанням онлайн-ресурсу SwissADME було додатково оцінено фізико-хімічні та фармакокінетичні властивості, параметри лікоподібності та «medicinal chemistry friendliness», серед яких методи – BOILEDEgg, iLOGP та радар біодоступності.

У *третьому розділі* наведено експериментальні результати синтетичної частини досліджень та представлені різноманітні підходи до функціоналізації піримідин-4(3*H*)-ону та його конденсованих піразоло[3,4-*d*]піримідинових похідних. Авторкою вивчені умови алкілування 2-алкіл/арил-5,6-заміщених піримідин-4(3*H*)-онів хлорацетамідами, ацетатної кислотою та її ефіром. Доведено, що регіоселективність їх алкілування залежить від замісника у 2 положенні та умов проведення реакції: 2-алкілпохідні піримідин-4(3*H*)-ону в середовищі діоксан/$NaHCO_3$ утворюють N-ацетамідні похідні; 2-арилпохідні в аналогічних умовах – суміш N-та O-продуктів, а в ДМФА/K_2CO_3 – індивідуальні N-ацетаміди; у разі алкілування 2-арилпохідних хлорацетатною кислотою та її естером у діоксані/$NaHCO_3$ утворюються тільки продукти O-алкілування. Розроблено методики одержання та структурної функціоналізації похідних 4-хлоро-2-метил/арил-6-R-піримідину, що дозволило отримати серії нових 4-гідразино-, 4-арилпіперазино-2-метил/арил-6-R-піримідинів. Синтезовано похідні 2-ариламіно-, 2-ариліденгідразино- та N-ацетил/бензоїлгідразино-6-метилпіримідин-4(3H)-ону з використанням як вихідного інтермедіату 6-метил-2-метилтіопіримідин-4(3*H*)-ону, одержаного конденсацією етил-3-оксобутаноату з тіосечовиною з подальшим метилюванням диметилсульфатом або метилйодидом.

Висновок про утворення цільових продуктів та виділення їх в чистому та індивідуальному вигляді здійснено на основі аналізу спектрів ^{1}H, ^{13}C ЯМР та NOESY-спектроскопії, індивідуальність сполук доведена LC/MS-аналізом. Здійснено фармакологічний скринінг великої кількості синтезованих речовин на моделі судом, індукованих пентилентетразолом та проведено SAR-аналіз.

Четвертий розділ присвячений синтезу тіопохідних піримідину, а саме: 6-метил-2-тіоксопіримідин-4(1*H*)-он, 6-аміно-2-тіоксопіримідин-4(1*H*)-он, 4,6-диметилпіримідин-2(1*H*)-тіону та піримідин-4(3*H*)-ону та дослідженню реакції їх алкілування хлорацетамідами та заміщеними фенацилбромидами у різних умовах. Виявлено, що за взаємодії 6-метил-2-тіоксопіримідин-4(1*H*)-ону з заміщеними фенацилбромідами в середовищі ДМФА/K_2CO_3 як за нагрівання, так і за кімнатної температури утворюється суміш 2-(2-арил-2-оксоетил)тіо-6-метилпіримідин-4(3H)-ону та 3-гідрокси-3-арил-7-метил-2,3-дигідро-5*H*-тіазоло[3,2-a]пірімідін-5-ону; подальше витримування в кислоті

сульфатній призводить до циклізації та утворення похідних 3-арил-7-метил-5Н-тіазоло[3,2-а]піримідин-5-ону. Індивідуальні S-алкіловані похідні – 2-(2-арил-2-оксоетил)тіо-6-метилпіримідин-4(3*H*)-они одержано під час проведення реакції в метанолі в присутності натрій метилату.

Здійснено фармакологічний скринінг великої кластеру синтезованих речовин на моделі судом, індукованих пентилентетразолом та проведено SAR-аналіз. Виявлено ряд структурних особливостей кореляції «структура – протисудомна дія». Відібрано сім «сполук-хітів» для поглиблених досліджень.

П'ятий розділ ілюструє поглиблені фармакологічні дослідження сполук-хітів з поетапною селекцією сполуки-лідера за широтою спектру протисудомної активності, рівнем токсичністі, зокрнема і нейротоксичноті та профілем супутнього впливу на ЦНС. Доцільність кожного етапу *in vivo* проведення експериментів теоретично обґрунтована та доведена *in silico* методом молекулярного докінгу. За результатами експериментальних даних сформовано уніфікований алгоритм раціонального пошуку ПЕП, що складається з поетапного використання докінгових досліджень та скринінгових *in vivo* моделей і ґрунтується на взаємозв'язку «біомішень – референс-ліганд – конформаційне розміщення ліганду – скринінгова модель – механізм реалізації активності».

Визначено сполуку-лідер – 1-(4-метоксифеніл)-5-(2-(4-(4-метоксифеніл)-піперазин-1-іл)-2-оксо-етил)піразол[3,4-d]піримідин-4-ону («Епімідин») з мультифакторним механізмом протисудомної активності на семи моделях судом, серед яких і модель хронічної епілепсії. Виявлена його потужна ноотропна дія, слабкий седативний і анксіолітичний ефекти, відсутність депресогенної активності та потенціювання дії депримувальних речовин (етанолу), потужна анальгетична активність на моделях соматичного і вісцерального болю, відсутність адиктивного потенціалу та опіоїдергічного механізму в реалізації антиконвульсивної дії епімідину.

Шостий розділ присвячений модифікації та імплементації методики синтезу субстанції «Епімідин» у промислових умовах. Методику синтезу субстанції епімідину модифіковано відповідно до промислових умов та принципів «зеленої хімії», розроблено технологічну схему виробництва. Розроблено методики контролю якості субстанції епімідину, зокрема . визначення супровідних домішок методом ВЕРХ та досліджено стабільність субстанції епімідину в стресових умовах.

Загальна оцінка роботи є однозначно позитивною. Слід відзначити чітку вертикаль від ідеї до практичної реалізації, якої дотримується авторка. Виклад матеріалу логічний, конструктивний, обґрунтований та науковою грамотною мовою. Проте все ж необхідно відзначити ряд недоліків та рекомендацій щодо дисертаційної роботи.

1. У зв'язку з масштабними фармакологічними дослідженнями великого кластеру сполук (150 речовин) на одній скринінговій моделі на ряду з визначиними якісними закономірностями «структура-протисудомна активність», доцільно було б встановити і кількісні характеристики цієї

залежності, що ще б підвищило рівень практичної значимості одержаних результатів;

2. в таблицях додатку А пропущені характеристики декількох речовин, афінність та параметри АДМЕТ, зокрема похідні 3.131-3.134.
3. на схемі 3.4 суміш сполук пронумерована 3.29-3.30, не зрозуміло співставлення який номер до якої речовини;
4. на схемі 3.5 помилки в радикалі: вказаний етиловий ефір, а потрібно метиловий ефір хлорацетатної кислоти
5. В дисертації зустрічаються друкарські та стилістичні помилки, а також невідповідності міжнародній класифікації при назві сполук.

8.Відповідність дисертації вимогам п. 10 «Порядку присудження наукових ступенів». На підставі вищевикладеного вважаю, що дисертаційна робота Северіної Ганни Іванівни на тему: «Синтез та фізико-хімічні характеристики ЦНС-агентів серед похідних піримідин-4-ону та піримідин-2(4)-тіону» є самостійним завершеним науковим дослідженням, яке за актуальністю, новизною, достовірністю одержаних результатів і висновків, теоретичним і практичним значенням, повнотою публікацій, за рівнем виконання і впровадженням відповідає вимогам п. 10 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567 (зі змінами), а її авторка Северіна Ганна Іванівна заслуговує присвоєння наукового ступеня доктора фармацевтичних наук зі спеціальності 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія.

Офіційний опонент:

завідувач кафедри фізколоїдної хімії

Запорізького державного медичного університету

доктор фармацевтичних наук, професор **А. Г. КАПЛАУШЕНКО**

Міністерство охорони здоров'я України Запорізький державний медичний університет Код ЕДРПОУ 02010741

Власний підпис

ПІДТВЕРДЖУЮ

Начальник відділу кадрів Запорізького державного медичного університету

20 р. Підпис Володченко В.Б.