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

Актуальність теми дисертації та її зв'язок з державними чи галузевими програмами, пріоритетними напрямками розвитку науки і техніки. До числа пріоритетних напрямків розвитку лікарської допомоги населенню належить розробка та впровадження нових високоефективних та малотоксичних лікарських засобів. Протисудомні препарати, що на разі представлені на фармацевтичному ринку України, випускають переважно закордонні фірми-виробники. Препарати, що випускаються вітчизняними виробниками майже всі є генериками відомих традиційних ліків. Реалії сьогодення вимагають від сфери охорони здоров'я України поряд з виробництвом лікарських препаратів-генериків розвивати та впроваджувати оригінальні вітчизняні антиконвульсанти. Підвищення ефективності пошуку нових біологічно активних речовин, зменшення термінів їх впровадження можливе лише за умови проведення ефективних доекспериментальних досліджень. Тому на разі увага дослідників спрямована на використання нових підходів до створення лікарських препаратів, а саме, дослідження можливостей використання цілеспрямованого синтезу нових речовин з потенційними фармакологічними властивостями на основі результатів новітніх технологій *in silico*. На разі критеріям актуальності відповідають наукові дослідження, які поєднують стратегію синтезу певного типу потенційних біологічно активних сполук, аналіз результатів фармакологічних досліджень та виявлення закономірностей між хімічною будовою та біологічною активністю. З огляду на це, теоретичне обгрунтування та експериментальне опрацювання методологічного підходу до створення нових протисудомних засобів з використанням технологій *in silico* має економічну та соціальну доцільність та є вельми актуальним для фармацевтичної науки. Дослідженню властивостей похідних піримідин-4-ону та піримідин-2(4)-тіону присвячено ряд робіт вітчизняних та іноземних авторів. Незважаючи на це, пошук біологічно активних сполук серед похідних піримідин-4-ону та піримідин-2(4)-тіону залишається актуальною проблемою фармації. Завдяки різноплановим хімічним властивостям похідні піримідину є зручними

об'єктами для досліджень, що підводить до логічного висновку про доцільність їх застосовування для спрямованого конструювання антиконвульсантів. Тому авторка мала суттєву теоретичну платформу для проведення досліджень в цьому напрямку.

Дослідження проводилось у відповідності до плану науково-дослідних робіт МОЗ та НАМН України, воно 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

Ступінь обгрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертаційне дослідження є добре спланованим, мета роботи і постановка завдання для вирішення цієї мети чітко сформульовані та аргументовані. Обсяг наукового матеріалу, наведений в дисертації, цілком достатній для обгрунтування основних положень і висновків, які враховують всі результати теоретичних та експериментальних досліджень, сформульовані чітко, коректно і лаконічно, є науково обґрунтованими та відповідають змісту наведеного матеріалу. Достовірність одержаних автором результатів не викликає сумніву, враховуючи, що для інтерпретації одержаних експериментальних результатів використано комплекс фізико-хімічних методів аналізу (УФ-, ІЧ-, ^{1}H, ^{13}C, NOESY ЯМР-спектроскопію, РСА, ВЕРХ-МС) та загальноприйняті і коректні підходи до встановлення фармакологічних властивостей синтезованих сполук. Результати *in silico* досліджень є достовірними та надійними, враховуючи, що в роботі були використані сучасні загально відомі комп'ютерні програми AutoDock Vina та AutoDockTools1.5.6, BIOVIADraw 2017R2, Chem3D, HyperChem 7.5, Discovery Studio Visualizer 2017/R2, SwissADME. Вважаю, що поставлені в роботі завдання реалізовані повною мірою і на високому науковому рівні.

Наукова новизна отриманих результатів. Наукова новизна досліджень представлених у дисертаційній роботі Северіної Ганни Іванівни зумовлена розробкою сучасної методології таргет-орієнтованого пошуку ЦНС-агентів у ряду похідних піримідин-4-ону та піримідин-2(4)-тіону. На основі системного опрацювання даних *in silico* та *in vivo* експериментів сформовано уніфікований алгоритм пошуку інноваційних ПЕП, що складається з поетапного застосування докінгових досліджень та скринінгових моделей. За результатами комплексного використання молекулярного моделювання, синтезу та досліджень протисудомної активності вперше

обґрунтовано вибір біомішеней для проведення молекулярного докінгу, а також наявністю кореляції між *in silico* та *in vivo* даними доведена ефективність запропонованої методології пошуку ЦНС-агентів у ряду похідних піримідину. Вперше з використанням класичних та удосконалених методів синтезовано 230 не описаних в літературі сполук. Розроблено методики одержання та запропоновано умови для регіоселективного алкілування похідних піримідин-4-ону, піримідин-2(4)-тіону та 1-арилпіразоло[3,4-*d*]піримідин-4-ону. Розроблено методики структурної функціоналізації похідних 4-хлоро-2-метил/арил-6-R-піримідину та одержано серії нових 4-гідразино-, 4-арилпіперазино-2-метил/арил-6-R-піримідинів, а також 2-(6-метил-2-(4-трифлуорометил)-піримідин-4-іл)аміноацетатну та аміно-пропіонову кислоти. Встановлено основні фізичні, фізико-хімічні характеристики нових одержаних речовин. Для 150 нових сполук проведено системне дослідження протисудомної активності на семи моделях судом з різним патогенезом. Встановлені закономірності зв'язку «хімічна будова – протисудомна активність» в ряду синтезованих похідних та доведено кореляцію між *in silico* та *in vivo* експериментальними даними. На основі аналізу кореляції "структура – дія" запропоновано рекомендації до раціонального дизайну потенційних антиконвульсантів. Виявлено потенційний інноваційний АФІ – епімідин, шо має мультитаргетний механізм реалізації протисудомної дії та низький рівень токсичності. Модифіковано методику синтезу субстанції епімідину відповідно до промислових умов та принципів «зеленої хімії», розроблено технологічну схему виробництва та методики контролю якості субстанції. Всі отримані дисертанткою результати відповідають критеріям новизни в галузі органічної, фармацевтичної та медичної хімії серед похідних піримідин-4-ону та піримідин-2(4)-тіону і засвідчують високий науковий рівень рецензованої роботи.

Теоретичне значення результатів дослідження. Дисертаційна робота Северіної Ганни Іванівни є теоретичним підґрунтям подальших наукових досліджень в ряду похідних піримідин-4-ону, піримідин-2(4)-тіону та 1-арилпіразоло[3,4-*d*]піримідин-4-ону. Одержані авторкою результати синтетичних досліджень мають теоретичне значення в галузях медичної, органічної та фармацевтичної хімії. В роботі наведено теоретичне узагальнення експериментального синтетичного матеріалу і даних біологічного скринінгу, в результаті чого запропонована бібліотека біологічно активних сполук для поглиблених досліджень, що проявляють протисудомну активність. На основі аналізу кореляції «структура-активність» сформульовано ряд положень для дизайну структури біологічно активних

сполук з групи похідних піримідину, що є ефективним підґрунтям для розробки нових антиконвульсантів

Практичне значення результатів дослідження В ході виконання експериментальної частини роботи розроблено препаративні методики, 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. Розроблено методики структурної функціоналізації похідних 4-хлоро-2-метил/арил-6-R-піримідину та одержано серії нових 4-гідразино-, 4-арилпіперазино-2-метил/арил-6-R-піримідину, що можуть бути використані для синтезу їх структурних аналогів та мають практичне значення для проведення наукових досліджень та навчального процесу вищих навчальних закладів хімічного та фармацевтичного профілю. Поповнена бібліотека фізичних та спектральних характеристик раніше невідомих органічних біологічно активних сполук похідних піримідин-4-ону, піримідин-2(4)-тіону та 1-арилпіразоло[3,4-*d*]піримідин-4-ону, що може бути використана для встановлення будови їх нових структурних аналогів. Ідентифіковано 7 «сполук-хітів» з високою активністю, які рекомендовані для подальших поглиблених досліджень. Результати фізико-хімічних досліджень, фармакологічного скринінгу та допінгових досліджень можуть бути використані науковцями для подальшого пошуку нових антиконвульсантів. Спосіб синтезу та МКЯ потенційного АФІ «Епімідин» апробовано в умовах промислового підприємства та внесено до плану наукових розробок АТ «Фармак» на 2019-2022 рр.

Повнота викладу основних результатів дисертації в наукових фахових виданнях

Наукові праці, що висвітлюють зміст роботи, опубліковано у міжнародних та провідних фахових виданнях України. Матеріали дисертаційної роботи опубліковано в 43 наукових роботах, серед яких 19 статей у наукових фахових виданнях України та інших країн (7 індексовано БД *Scopus*, 1 – БД Web of Science), 2 патенти України на винахід, 1 інформаційний лист про нововведення у сфері охорони здоров’я. Матеріали фрагментів дисертаційної роботи також опубліковані в 21 тезах доповідей і доповідалися та обговорювались на з'їздах та конференціях різних рівнів. Опубліковані роботи достатньо повно відображають зміст дисертаційної роботи.

Зауваження щодо оформлення дисертації та автореферату, завершеності дисертації в цілому. Обсяг основного тексту дисертаційної роботи становить 310 сторінок. Роботу проілюстровано 15 схемами, 135

рисунками та 78 таблицями. Вона складається з анотації, вступу, огляду літератури, 5 експериментальних розділів, загальних висновків, списку використаних літературних джерел, який налічує 448 найменувань, з них 381 латиницею та 67 кирилицею, 8 додатків. Обсяг наукового матеріалу достатній для обгрунтування основних положень і висновків дисертації. Автореферат оформлений відповідно до вимог та відображає основні положення та висновки дисертації. Дисертаційна робота починається з анотації, яка оформлена згідно вимог наказу № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» українською та російською мовами.

У вступі чітко сформульовані мета та завдання дослідження, а також окреслені основні здобутки щодо новизни та практичного значення роботи.

Розділ 1. Біомішені для пошуку ЦНС-агентів та їх піримідинвмісні ліганди (Огляд літератури) присвячений системному аналізу сучасних досягнень стосовно структури та активних сайтів протисудомних біомішеней, розглянуто можливі варіанти розміщення лігандів у біомішенях з відповідною фармакологічною відповіддю рецептора/фермента. В розділі також обґрунтовано актуальність і перспективи подальших досліджень похідних піримідину. Всі наведені в огляді дані піддані авторкою аналізу, що і дозволило їй, аргументувати мету, визначити напрямки подальших досліджень та раціонально спланувати експеримент.

Розділ 2. Дизайн таргет-орієнтованого дослідження та обґрунтування вибору цільових структур. В розділі описуються дизайн дослідження, критерії обрання ключових скафолдів та фармакофорних фрагментів для конструювання віртуальної бази ЦНС-агентів.

Пояснюється обрання піримідину як базового скафолду для конструювання віртуальної бази ЦНС-агентів серед похідних піримідин-4(3*H*)-ону та піримідин-2(4)-тіону. За результатами ранжування віртуальної бібліотеки сполук за показником афінності до ГАМКергічних біомішеней після докінгу в активні сайти ПАМ бензамідину та діазепаму $ГАМК_A$ рецептора та сайт інгібітора $ГАМК_{AT}$ вігабатрину було сформовано 14 груп структур-кандидатів для синтезу з потенційним впливом на ГАМКергічні біомішені. 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.

Розділ 3. Синтез, фізико-хімічні властивості та результати скринінгу протисудомної активності похідних піримідин-4(3Н)-ону.

В розділі описуються розроблені методики регіоселективного алкілування похідних піримідин-4-ону, піримідин-2(4)-тіону. В цій частині роботи викликають інтерес експериментальні дані щодо впливу замісника у 2 положенні та умов проведення реакції на перебіг реакції алкілування піримідин-4(3*H*)-онів 2-хлорацетамідами. З'ясовано, що 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. 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. Розширюючи коло досліджень, авторкою було вперше розроблено методики одержання та структурної функціоналізації похідних 4-хлоро-2-метил/арил-6-R-піримідину, що дозволило отримати серії нових 4-гідразиніл-, 4-арилпіперазиніл-2-метил/арил-6-R-піримідинів, а також 2-(6-метил-2-(4-трифлуорометил)-піримідин-4-іл)аміноацетатну та -амінопропіонову кислоти. Синтезовано похідні 2-ариламіно-, 2-ариліденгідразино- та N-ацетил/бензоїлгідразино-6-метилпіримідин-4(3*H*)-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.

Як основні синтетичні здобутки автора можна назвати підбір умов та розробку ефективних методів синтезу 1-арилпіразоло[3,4-*d*]піримідин-4-онів взаємодією відповідних фенілгідразинів гідрохлориду та етилетоксиметилен-ціаноцетату з подальшою конденсацією одержаного етил 5-аміно-1-арилпіразол-4-карбоксилату з формамідом. Методами ^{1}H ЯМР-спектроскопії та РСА доведено, що алкілування 2-хлорацетамідами в середовищі ДМФА/$NaHCO_3$ відбувається за атомом нітрогену у 5 положенні циклу піразолопіримідинового циклу.

Привертають увагу досить об´ємні біологічні дослідження Северіної Г.І., що наведені в цьому розділі. За результатами системного вивчення антиконвульсантної активності синтезованих похідних піримідин-4-ону на моделі PTZ-судом у порівнянні з фенобарбіталом та вальпроатом натрію виявлено ряд структурних особливостей кореляції «структура – протисудомна дія».

Розділ 4. Синтез, фізико-хімічні властивості та скринінг на протисудомну активність похідних піримідин-2(4)-тіону.

Четвертий розділ присвячений синтезу похідних піримідин-2(4)-тіону та їх функціоналізації шляхом введення ацетамідного фрагменту. В цьому розділі також описана взаємодія 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, в результаті якої утворюється суміш 2-(2-арил-2-оксоетил)тіо-6-метилпіримідин-4(3*H*)-ону та 3-гідрокси-3-арил-7-метил-2,3-дигідро-5*H*-тіазоло[3,2-*a*]пірімідін-5-ону. Також в цьому розділі переконливо доведено, що подальше витримування в кислоті сульфатній призводить до циклізації та утворення похідних 3-арил-7-метил-5*H*-тіазоло[3,2-*a*]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 натрію метилату.

Конденсацією тіосечовини з етилціаноацетатом у середовищі етилового спирту в присутності натрію етилату одержано 6-аміно-2-тіоксопіримідин-4(3*H*)-он, а конденсацією з ацетилацетоном у присутності соляної кислоти – 4,6-диметил-2-тіопіримідин; 2-метил/арил-6-R-піримідин-4-тіони одержано взаємодією відповідних 4-оксопіримідинів з пентасульфідом фосфору в піридині. S-ацетамідні похідні одержано в умовах алкілування 2-хлорацет-амідами у ДМФА в присутності калію карбонату або триетиламіну. Авторкою обгрунтовано напрямки протікання цих реакцій, підібрані умови їх проведення та проведено всебічне вивчення структури синтезованих сполук із залученням сучасних найбільш інформативних методів інструментального аналізу.

За результатами системного вивчення антиконвульсантної активності синтезованих похідних піримідин-4-ону та -2(4)-тіону на моделі PTZ-судом у порівнянні з фенобарбіталом та вальпроатом натрію виявлено ряд структурних особливостей кореляції «структура – протисудомна дія». Загалом похідні піримідин-2(4)-тіону проти їх оксопіримідинових аналогів продемонстрували більш високі та стабільні показники протисудомної активності.

Розділ 5. Обґрунтування та реалізація поглиблених фармакологічних досліджень сполук-хітів.

За результатами *in silico* таргет-орієнтованого та *in vivo* скринінгу на PTZ-моделі судом для подальших поглиблених досліджень було відібрано сім «сполук-хітів», які повністю запобігали летальності піддослідних тварин, достовірно подовжували тривалість латентного періоду, достовірно зменшували тривалість та тяжкість судом на рівні референс-препарату вальпроату натрію або повністю запобігали прояву судом на рівні

фенобарбіталу. В п'ятому розділі описано виявлений авторкою чіткий взаємозв'язок «біомішень – референс-ліганд – фармакологічна відповідь – скринінгова модель». Доведено співмірність результатів докінгових досліджень та *in vivo* експериментальних даних у тесті МЕШ-індукованих судом. Для трьох сполук, які виявили ефективність на моделі МЕШ, було визначено гостру токсичність.

Для двох сполук з нижчою токсичністю досліджено дозозалежність протисудомного ефекту та вплив на локомоторну активність і психоемоційний стан. За показниками фармакологічного профілю обрано «сполуку-лідер» – 1-(4-метоксифеніл)-5-(2-[4-(4-метоксифеніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил)-піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону (Епімідин).

Показано широкий спектр протисудомної дії епімідину та мультифакторний механізм його реалізації. Визначено сприятливий профіль супутніх властивостей епімідину, а саме потужну ноотропну дію, слабкий седативний і анксіолітичний ефекти, відсутність депресогенної активності та потенціювання дії депримувальних речовин (етанолу), потужну анальгетичну активність на моделях соматичного і вісцерального болю, відсутність адиктивного потенціалу та опіоїдергічного механізму в реалізації антиконвульсивної дії.

Безсумнівним здобутком авторки є сформований та описаний в цьому розділі 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».

Розділ 6. Масштабування методики синтезу потенційного АФІ епімідину і розробка методик контролю якості. Слід відмітити завершену логічну послідовність всіх проведених дисертанткою досліджень. Авторкою модифіковано методику синтезу «сполуки-лідера» епімідину відповідно до промислових умов та принципів «зеленої хімії», розроблено технологічну схему виробництва, вивчено вплив біофармацевтичних аспектів на прояв протисудомної активності.

Розроблено методики ідентифікації субстанції епімідину хімічними та фізико-хімічними методами. Розроблено методику визначення супровідних домішок методом ВЕРХ та досліджено стабільність субстанції епімідину в стресових умовах. Виявлено стійкість до температурного розкладання, що дозволяє зберігати субстанцію епімідину за кімнатної температури. Розроблено методики кількісного визначення методом виявлення азоту в органічних сполуках та методом ВЕРХ.

Загальна оцінка роботи є беззаперечно позитивною. При розгляді дисертаційної роботи виникли деякі зауваження та рекомендації:

1. Авторкою запропоновано методику кількісного визначення епімідину методом визначення азоту в органічних сполуках після мінералізації сірчаною кислотою відповідно до загальної монографії ДФУ 2.5.9. Однак не проведено процедуру валідації методики кількісного визначення, що, на мою думку, було б доцільно.
2. В проєкті МКЯ на субстанцію епімідину запропоновано визначення залишкових кількостей розчинників (ДМФА, ізопропанол) визначати методом газової хроматографії, однак відсутній детальний опис методики.
3. Рекомендаційною є пропозиція щодо продовження досліджень неспецифікованих домішок методом ВЕРХ-МС/МС та домішок, які утворюються у стресових умовах.
4. У тексті дисертації зустрічаються друкарські помилки та неточності, а також чимало запозиченої англомовної термінології.

Наведені недоліки не впливають на позитивну оцінку роботи, а також на теоретичну та практичну значимість одержаних результатів.

У порядку проведення наукової дискусії вважаю за доцільне, щоб дисертант відповіла на наступне запитання:

Чи проводили Ви експериментальне визначення параметрів ADME (ліпофільність log D, зв'язування сполук з білками плазми крові миші)?

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження на практиці. Запропоновані дисертанткою підходи до синтезу нових біологічно активних сполук можуть бути з успіхом використані у наукових лабораторіях, що працюють за спорідненими тематиками. Для всіх високоактивних сполук необхідно провести поглиблені дослідження, а результати вивчення взаємозв'язку «структура-дія» використати для оптимізації «сполук-хітів». Більш широко впроваджувати результати власних досліджень у навчальний процес при викладанні професійно-орієнтованих дисциплін для студентів ВНЗ хімічного та фармацевтичного профілю.

Відповідність дисертації вимогам п. 10 «Порядку присудження наукових ступенів». На підставі викладеного вище 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 завершеним науковим дослідженням, яке за актуальністю, новизною, достовірністю результатів і висновків, теоретичним і практичним значенням, публікаціям у фахових виданнях, 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:

завідувачка кафедри фармацевтичної хімії

Тернопільського національного

медичного університету імені І. Я. Горбачевського,

доктор фармацевтичних наук, професор **Л. С. ЛОГОЙДА**

Особиситй підпис _____ Логойда Л.С.
завіряю
Заступник ректора з кадрових питань
Тернопільського національного
медичного університету