

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», представлена 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 фармакогнозії

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 присвячена важливому напрямку сучасної медичної хімії – цілеспрямованому пошуку біологічно активних сполук, зокрема ЦНС-агентів серед гетероциклічних сполук. Дизайн дослідження полягає у реалізації сучасної концепції структурної модифікації піримідинового скафандру з урахуванням принципів фармакофорної моделі пошуку інноваційних ПЕП, концепції «лікоподібності» та задовільних таксиметричних параметрів нових «малих молекул» як прототипів потенційних лікарських засобів, що здійснювалась з метою досягнення необхідного фармакологічного профілю. Робота є логічним продовженням наукових досліджень кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету, яка за останні роки внесла суттєвий внесок в розробку потенційних антиконвульсантів різноманітних хімічних груп. Враховуючи накопичені знання в цьому напрямку авторка мала суттєву теоретичну платформу для реалізації наукового пошуку. Вважаю за необхідне відзначити вдалий вибір об'єктів дисертаційної роботи, оскільки похідні піримідину мають значну перспективу для раціонального дизайну структури потенційних лікарських засобів. Це обумовлено, по-перше, їх синтетичною доступністю та можливістю модифікації, по-друге, високим афінітетом на рівні «привілейованих структур» (“privileged scaffolds”) до відомих біомішеней ЦНС та значним потенціалом застосування в фармакотерапії епілепсії. Все це зумовлює актуальність рецензованого дослідження, яке, окрім цінності для фармацевтичної науки, має суттєве соціальне значення, оскільки епілепсія – одна з найбільш поширених, складних та багатофакторних хвороб ЦНС, а проблема її фармакокорекції до кінця не вирішена і потребує розробки нових напрямків реалізації. Тому опрацювання раціональних підходів до дизайну потенційних антиконвульсантів з використанням інноваційних методів сучасних синтетичної, медичної та фармацевтичної хімії є безперечно важливим і актуальним

науковим підходом. Враховуючи наведене новизна та сучасність рецензованого дослідження не викликають жодного сумніву.

Дисертаційна робота виконана у відповідності 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 Загальні дані про структуру дисертації та аналіз її змісту.

Дисертаційна робота складається із вступу, огляду літератури, п'яти експериментальних розділів, загальних висновків, списку літератури та 8 додатків. Загальний обсяг основного тексту дисертації становить 310 сторінок. Робота ілюстрована 15 схемами, 135 рисунками та 78 таблицями. Перелік використаної літератури складає 448 найменувань, 381 посилання – англомовна література.

В огляді літератури представлено дані щодо епідеміології епілепсії та її зв'язку з іншими розладами ЦНС та коморбідними станами; наведено огляд сучасних аспектів класифікації та фармакотерапії епілептичних нападів; розглянуті усі відомі напрямки впливу на епілептогенез; описано існуючі інноваційні біомішені для протиепілептичних агентів, деталізована їх структура та активні сайти, варіанти конформаційного розміщення протиепілептичних лігандів в біомішені; проведено аналіз існуючих досягнень щодо впливу похідних піримідину на ЦНС та обґрунтовано доцільність та актуальність подальших досліджень даного класу сполук у цьому напрямку.

У другому розділі складено загальний дизайн дослідження, деталізовано підхід до конструювання сполук у відповідності з принципами фармахофорної моделі протисудомної дії. З урахуванням механізму конвульсивної дії PTZ для прогнозування активності досліджуваних лігандів здійснено ранжування віртуальної бібліотеки сполук за показником афінності до ГАМК-ергічних біомішеней після докінгу в активні сайти ПАМ бензамідину та діазепаму ГАМК_A рецептора та сайт інгібітора ГАМК_{AT} вігабатрину для раціоналізації скринінгу на пентілентетразоловій моделі судом. Для всіх структур з використанням онлайн-ресурсу SwissADME додатково оцінено фізико-хімічні та фармакокінетичні властивості, параметри лікоподібності.

У третьому розділі наведено експериментальні результати розробки методів синтезу різноманітних похідних піримідин-4(3H)-ону та його конденсованих піразоло[3,4-*d*]піримідинових похідних, проведено детальне вивчення особливостей регіоселективності реакції алкіловання зазначених сполук, що дозволило визначити оптимальні умови реакцій та одержати серії нових похідних для фармакологічного скринінгу. 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/бензойлгідразино-6-метилпіримідин-4(3H)-ону з використанням як вихідного інтермедиату 6-метил-2-метилтіопіримідин-4(3H)-ону. Також в розділі представлені результати фармакологічного скринінгу синтезованих речовин на моделі судом, індукованих пентілентетразолом та результати SAR аналізу.

Четвертий розділ присвячено синтезу піримідин-2(4)-тіонів та вивченю умов та особливостей реакції алкілювання хлорацетамідами та фенацилбромідами. Досліджено реакцію взаємодії 6-метил-2-тіоксопіримідин-4(1H)-ону з заміщеними фенацилбромідами та визначено, що в середовищі ДМФА в присутності калій карбонату 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-5H-тіазоло[3,2-a]піримідин-5-ону. Подальше витримування в кислоті сульфатній дозволило автору перейти до похідних 3-арил-7-метил-5H-тіазоло[3,2-a]піримідин-5-ону. Індивідуальні S-алкіловані похідні – 2-(2-арил-2-оксоетил)тіо-6-метилпіримідин-4(3H)-они виділені під час проведення реакції в метанолі в присутності натрій метилату.

В розділі узагальнено результати системного вивчення антиконвульсантної активності 150 синтезованих похідних піримідин-4-ону та -2(4)-тіону на моделі PTZ-судом у порівнянні з фенобарбіталом та вальпроатом натрію та виявлено ряд структурних особливостей кореляції «структура – проти судомна дія». Відібрано сім «сполук-хітів» для поглиблених досліджень.

П'ятий розділ містить результати поглиблених фармакологічних досліджень групи сполук-хітів, які виявили ефективність на PTZ-моделі судом, з поетапним видокремленням сполуки-лідера. Запропоновано використання молекулярного докінгу в активні сайти інгібіторів метаботропних mGlu5 та іонотропних AMPA-рецепторів глутамату (перампанель) для прогнозування активності сполук в експерименті *in vivo* у тесті МЕШ-індукованих судом. Визначено гостру та нейротоксичність сполук-хітів. Кожному етапу фармакологічного експерименту передує теоретичне та *in silico* експериментальне обґрунтування доцільності дослідження на тваринах з чіткими параметрами для докінгових досліджень у відповідні мішені. Також представлений уніфікований алгоритм пошуку інноваційних ПЕП з постадійним використанням докінгових та фармакологічних досліджень, що може значно спростити та раціоналізувати пошук біологічно активних речовин в даному напрямку. Проведені дослідження дозволили визначити сполуку-лідер – 1-(4-метоксифеніл)-5-(2-(4-(4-метоксифеніл)-піперазин-1-іл)-2-оксоетил)піразол[3,4-d]піримідин-4-он (Епімідин) з широким спектром проти судомної активності та мультифакторним механізмом її реалізації. Для епімідину було проведено ряд фармакологічних досліджень щодо виявлення супутніх фармакологічних властивостей.

Шостий розділ дисертаційної роботи присвячено модифікації та масштабуванню методики синтезу субстанції «Епімідину» відповідно до промис-

лових умов та принципів «зеленої хімії», вивченю впливу біофармацевтичних аспектів на прояв протисудомної активності та визначенню оптимальної дисперсності епімідину, розробці методик МКЯ, в тому числі визначеню супровідних домішок, а також дослідженням стабільності субстанції у стресових умовах.

Вважаю, що рецензована робота достатньо повно відображає зміст дисертаційної роботи

2 Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертациї. Достовірність одержаних результатів не викликає сумнівів, оскільки для їх інтерпретації автором використано сучасний пакет фізико-хімічних методів аналізу, застосовано загальноприйнятні підходи до встановлення біологічних і фармакологічних властивостей синтезованих сполук.

Логіка, стратегія та планування експерименту базуються на ретельному аналізі літературних даних з досліджуваної проблеми, та на результатах *in silico* таргет-орієнтованого віртуального скринінгу. Такий підхід дозволив адекватно оцінити потенціал об'єктів дослідження та обґрунтувати дизайн фармакологічного скринінгу. Структуру, склад і чистоту синтезованих сполук надійно підтверджено елементним аналізом, методами УФ-, ІЧ- та ¹H та ¹³C ЯМР-спектроскопії, включаючи кореляційні дослідження NOESY, рентгеноструктурним аналізом. Цілком обґрунтовано окремі синтетичні результати підверджені методом хромато-мас-спектрометрії.

Масштабні фармакологічні дослідження проведено з використанням загальноприйнятих методик та у відповідності до міжнародних програмам пошуку нових ПЕП Anticonvulsant Drug Development (ADD) Program та Epilepsy therapy screening program (ETSP).

Основні положення, представлені автором, його пояснення і висновки базуються на достатньому масиві експериментальних даних, є достовірними і науково обґрунтованими.

Зміст автoreферату ідентичний основним положенням дисертації.

3 Новизна дисертаційних досліджень. Наукова новизна роботи безсумнівна. Слід виокремити декілька принципових моментів новизни рецензованого дослідження.

У загальному дисерантка запропонувала системний та уніфікований підхід до пошуку потенційних ПЕП піримідинової структури та сформулювала чіткий алгоритм, який складається з поетапного використання *in silico* та *in vivo* досліджень та дозволяє свідомо через точкові зміни в структурі молекули впливати на прояв протиепілептичної активності. Уперше систематизовано та обґрунтовано вибір біомішеней для молекулярного докінгу щодо механізмів реалізації конвульсивної дії у скринінгових моделей та експериментально доведено можливість їх застосування при розробці ПЕП.

Доведено вплив стеричних факторів, а саме характеру субститuentів в положенні 2 базового гетероциклу та умов проведення реакції, на регіоселективність реакції алкілювання піримідин-4(3*H*)-онів, що дозволило автору вперше одержати серії *N*- та *O*-заміщених похідних. Встановлено, що алкілювання 1-арилпіразоло[3,4-*d*]піримідин-4-онів хлорацетамідами та хлор-1-(4-арилпіперазиніл)етаноном відбувається за атомом нітрогену в 5 положенні піразолопіримідинового циклу, що достовірно доведено методом РСА.

Доведено, що результатом алкілювання ряду тіопіримідинів, а саме: 6-метил- та 6-аміно-2-тіоксопіримідин-4(1*H*)-онів, 4,6-диметил-2-тіопіримідину, 2-метил/арил-6-R-піримідин-4-тіонів хлорацетамідами в середовищі ДМФА в присутності калій карбонату або триетиламіну є індивідуальні *S*-ацетамідні похідні.

Показано, що взаємодія 6-метил-2-тіопіримідин-4-ону з заміщеними фенацилбромідами в середовищі ДМФА в присутності калій карбонату не зупиняється на стадії утворення *S*-алкільованих похідних, а відбувається подальша внутрішньомолекулярна циклізація з утворенням суміші 2-(2-арил-2-оксоетил)тіо-6-метилпіримідин-4-ону і 3-гідрокси-3-арил-7-метил-2,3-дигідро-5*H*-тіазоло[3,2-*a*]піримідин-5-ону. Встановлено, що витримування одержаної реакційної суміші в сульфатній кислоті приводить до утворення продуктів циклізації та ароматизації тіазольного циклу.

Визначено елементи залежності «структурна – протисудомна активність» на основі SAR аналізу результатів скринінгу 150 сполук на моделі судом, індукованих пентиленететразолом.

На основі реалізації запропонованого алгоритму пошуку ПЕП визначено «сполуку-лідер» з мультифакторним механізмом протисудомної активності та сприятливим супутнім фармакологічним профілем – 1-(4-метоксифеніл)-5-(2-(4-(4-метоксифеніл)-піперазин-1-іл)-2-оксо-етил)піразоло[3,4-*d*]піримідин-4-ону (Епімідин).

Новизна та пріоритет рецензованого дослідження захищено 2 патентами України на винахід: патент України № 105242 «*N*-(3,4-диметоксифеніл)-2-{[2-метил-6-(піридін-2-іл)піримідин-4-іл]тіо}ацетамід, що проявляє протисудомну активність» і патент України № 116226 «5-R-1-Арил-1,5-дигідро-4*H*-піразоло[3,4-*d*]піримідин-4-они, що виявляють протисудомну активність».

4 Теоретичне значення результатів дослідження. Автор опрацювала ряд оригінальних підходів до спрямованого синтезу ЦНС-агентів, що важливо для теорії тонкого органічного синтезу і сучасної фармацевтичної хімії. Вважаю за необхідне виділити наступні теоретично важливі аспекти роботи:

- коректне та глибоке теоретичне обґрунтування вибору біомішеней для молекулярного докінгу у відповідності до механізмів реалізації епілептогенезу у скринінгових моделях;
- коректне обґрунтування регіоселективності реакцій алкілювання піримідин-4(3*H*)-онів та відповідних -4(2)-тіонів;

- запропонований дисертантом зручний та ефективний метод синтезу фармакологічно привабливих і важкодоступних 4-аміно- та 4-гідрозинопохідних піrimідину на основі реакції амінування 2,6-дизаміщених 4-хлоропіrimідинів;
- сформульовано сучасний уніфікований алгоритм спрямованого дизайну ЦНС-агентів в ряду похідних піrimідину, який полягає у поетапному застосування *in silico* віртуального скринінгу, традиційного хімічного синтезу та фармакологічного скринінгу.
- Визначені закономірності «структура – протисудомна активність» значно збагатили арсенал теоретичних знань щодо раціонального конструювання ЦНС-агентів, і можуть стати підґрунтям активізації розробки нових ПЕП.

5 Практичне значення результатів дослідження. У роботі наведено системне дослідження щодо синтезу та визначення фізичних-хімічних властивостей похідних піrimіdin-4(3H)-онів та -2(4)-тіонів, що може бути використано для з'ясування будови їх нових структурних аналогів. Загалом дисертантка одержала близько 200 оригінальних сполук, які є новими та перспективними для сучасної фармацевтичної науки.

Проведений скринінг 150 сполук на моделі пентилнентетразолових судом та детальний аналіз кореляції «структура-активність» дозволив встановити та сформулювати положення для дизайну структури ПЕП з групи похідних піrimідину. Виявлено ряд нових високоактивних та малотоксичних субстанцій з перспективною протисудомною активністю.

Сформовано уніфікований алгоритм пошуку інноваційних ПЕП з використанням доступної програми AutoDockVina, прописано методології процесу докінгу з фіксацією координат активних сайтів та значущих для прояву активності амінокислотних залишків, що відкриває можливість практичного застосування алгоритму іншими науковцями й може стати інструментом оптимізації фармакологічного експерименту.

Одержані в ході роботи результати 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.

Роботи щодо розробки лікарського засобу на основі субстанції під умовою назвою «Епімідин» включено до плану наукових розробок АТ «Фармак» на 2019-2022 рр .

6 Повнота викладу основних результатів дисертації в наукових фахових виданнях. За матеріалами дисертації опубліковано 19 статей у наукових фахових виданнях України та інших країн, серед них 8 статей, що індексуються базами даних Scopus та Web of Science. Окремі фрагменти дисертаційної роботи обговорювалися на наукових форумах різного рівня в

тому числі закордонних; за результатами опубліковано тези 21 доповіді. Одержано 2 патенти на винахід та один інформаційний лист про нововведення в сфері охорони здоров'я.

7 Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження в практиці. Запропоновані дисертантом підходи до синтезу цільових сполук, проведення фармакологічного скринінгу та цільової розробки лікарського засобу направленої дії становлять практичну цінність зокрема для фахівців галузі медичної та фармацевтичної хімії, а також спеціалістів з розробки лікарських засобів. Доцільним та цілком логічним є впровадження окремих результатів дослідження у навчальний процес закладів вищої освіти фармацевтичного профілю на магістерських програмах та в аспірантурі.

8 Зауваження щодо змісту і оформлення дисертації та автореферату, завершеності дисертації в цілому. В цілому дисертаційна робота Северіної Ганни Іванівни є завершеним практичним дослідженням, яке позбавлене принципових хиб та недоліків. Загальна оцінка роботи є **позитивною**.

Робота написана доброю українською мовою, хоча зустрічаються орфографічні помилки, некоректні вирази та стилістичні неузгодження. В ході детального ознайомлення з текстом дисертації виникли деякі більш конкретні зауваження та запитання.

1. З яких міркувань було обрано фармакологічні моделі та препарати порівняння для вивчення протисудомної активності?
2. Чи плануються дослідження з вивчення взаємодії Епімідину з лікарськими засобами інших фармакологічних груп, оскільки терапія епілептичних станів у більшості випадків є довготривалою і комплексною?
3. Чи є запропонований Вами алгоритм пошуку ПЕП універсальним, адже кореляції «структура – активність», наведені в роботі, стосуються певного класу сполук.
4. В чому полягає принципова перевага запропонованих Вами речовин протиепілептичної дії перед відомими антиконвульсантами, зокрема перед фенобарбіталом і вальпроєвою кислотою?
5. Як Ви бачите подальший розвиток представленого Вами наукового напрямку?

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 автор **Северіна Ганна Іванівна** заслуговує присвоєння наукового ступеня доктора фармацевтичних наук зі спеціальності 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія.

Офіційний опонент

завідувач кафедри клінічної біохімії,

судово-медичної токсикології та фармакії

Харківської медичної академії

післядипломної освіти

доктор хімічних наук, професор

I. O. Журавель

