

РЕЦЕНЗІЯ

доцента закладу вищої освіти кафедри загальної хімії Національного фармацевтичного університету, кандидата фармацевтичних наук, доцента

Леги Дмитра Олександровича на дисертаційну роботу

Ель Кайал Вассім Мохамеда «Синтез, фізико-хімічні та фармакологічні властивості арил-(алкіл)амідів(2,4-діоксо-/2-тіо-4-оксо)-хіназолін-3-іл)оцтових кислот», подану до спеціалізованої вченої ради ДФ 64.605.060 при Національному фармацевтичному університеті, що утворена для розгляду та проведення разового захисту дисертації на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань «Охорона здоров'я» за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація»

Актуальність теми

На цей час на фармацевтичному ринку присутні препарати з активними інгредієнтами двох основних груп – низькомолекулярні сполуки (більша частина з яких є продуктами тонкого органічного синтезу) та високомолекулярні субстанції біологічного/біотехнологічного походження. Не зважаючи на суттєві досягнення в царині біохімії, переважна кількість досліджень з медичної хімії фокусується на першій групі сполук. Так, у 2020 році на сегмент низькомолекулярних ліків припадала найвища частка доходу – понад 65%. У 2019 року, на фармацевтичному ринку низькомолекулярні препарати склали до 90% від загального обсягу продажів ліків у світі. Це свідчить про домінування низькомолекулярних субстанцій на світовому фармацевтичному ринку. Крім того, на це вказують останні схвалення лікарських засобів регуляторними органами по всьому світу. Наприклад, у 2018 році 59 нових препаратів отримали регуляторний дозвіл від FDA, з яких 71% ліків були препаратами з низькомолекулярним активним інгредієнтом, подібна ситуація прослідковувалася і у наступні роки: 2019 – 48 (67%), 2020 – 53 (66%), 2021 – 50 (62%). Звертає на себе увагу те, що статистично більше 85% усіх низькомолекулярних біологічно активних субстанцій, що присутні у FDA Orange Book, містять гетероциклічний фрагмент, причому у більше 70% сполук із цього

переліку цей фрагмент є аза-гетероциклом. Наявність гетероциклічної платформи з певною геометрією та шаблоном розташування гетероатомів сприяє більш ефективному та селективному зв'язуванню з біомішенню. Саме тому, у процесі планування досліджень певної спрямованості дослідники звертають увагу на базові структури, які історично зарекомендували себе ефективною платформою для створення фармакологічних аналогів. Так, ядро хіназоліну є визнаним базисом для створення сполук, які впливають на різні ланки діяльності нервової системи. На цей час на ринку присутні як мінімум 10 АФІ, які містять фрагмент хіназоліну, а саме ядро знаходиться в топі циклічних систем, які входять до складу «малих» молекул. З огляду на вищесказане, представлена дисертаційна робота Ель Кайал Вассім Мохамада, яка спрямована на пошук та побудову нових низькомолекулярних біоактивних сполук на базі хіназолінової платформи, виглядає досить перспективним та сучасним хіміко-фармацевтичним дослідженням. Хочеться додатково зазначити, що часто спроби створити нейротропні хіназолінові похідні стикалися з проблемою високої ефективності знайдених гетероциклічних агентів, які на жаль володіли такими ж суттєвими недоліками, як то побічний вплив на організм, звикання, неселективність дії, що яскраво ілюструється прикладом метаквалону. Таким чином, аналізована дисертаційна робота має шанс пролити світло на цю проблему, знайти закономірності та створити рекомендації для цілеспрямованого синтезу субстанцій з ядром хіназоліну.

Іншим аспектом роботи, який підкреслює її актуальність є недосконалість існуючих протисудомних засобів та все зростаюча кількість випадків захворювань, які супроводжуються судомним симптомом. Зокрема, не зважаючи на наявність близько 40 протиепілептичних препаратів на фармацевтичному ринку, близько 30% пацієнтів страждають від неконтрольованих судом як результат фармакорезистентності до існуючої терапії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами

Дисертаційну роботу виконано відповідно до планів МОЗ та НАМН України, вона 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.

Наукова новизна отриманих результатів

Враховуючи специфіку дисертаційної роботи, що знаходиться на перетині синтетичної органічної хімії та фармакологічної спеціальностей, вона робить комплексний вклад у масив наукових даних. Зокрема, дисертантом та співавторами було розроблено ефективний та легко масштабований підхід до синтезу 2-тіоксо-4-оксохіназоліну, який містить модулятор нейротропної дії у положенні 3 хіназолінового ядра – вбудований залишок гліцину. Структурні особливості одержаної сполуки роблять її чудовим об'єктом для застосування у паралельному синтезі для одержання бібліотек нових похідних. Ці особливості карбоксильного прекурсорю було використано автором для ефективного синтезу ряду відповідних ацетамідів. Важливо, що на цей час у літературі є лише один приклад незаміщеного ацетаміду, який було одержано з відповідного нітрилу, що суттєво лімітує цей підхід для синтезу широкого ряду амідних похідних, які є відомими біогенними сполуками та робить результати дисертаційної роботи корисним інструментом в руках спеціалістів з медичної хімії.

Базуючись на методиці одержання (2-тіоксо-4-оксохіназолін-3-іл)оцтової кислоти було розроблено новий мультиграмовий підхід до відповідної 2,4-діоксохіназолін-3-оцтової кислоти, як ключового білдинг-блоку дослідження, шляхом окисного десульфурування за допомогою гідроген пероксиду. Згадану кислоту було застосовано для одержання ряду неописаних раніше амідів.

Завдяки великому масиву синтезованих сполук було визначено практично важливі закономірності залежності протисудомної активності від будови синтезованих речовин. Однією із закономірностей був ідентифікований ключовий вплив **NHCON** фрагменту хіназоліну, довжини дистальної зони та арильного кільця в ній на прояв протисудомного ефекту, а також суттєве потенціювання протисудомного впливу у випадку заміни 2-тіоксогрупи на 2-оксо фрагмент. Крім того показано недоцільність модифікацій положення 1 2,4-діоксохіназолінового ядра з огляду на просторові обмеження сайтів позитивних

алостеричних модуляторів ГАМК_A рецептора, що ускладнюють зв'язування стерично утрудненого хіназолінового ліганду.

Логічним результатом проведених досліджень є виявлення нової сполуки-лідера, що є цікавою платформою для подальшої модифікації. Для цієї сполуки передбачено механізм реалізації активності та визначено кореляцію *in vivo* та *in silico* результатів.

Новизна та пріоритет дослідження підтверджено патентом України на корисну модель №137806 «Похідні 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідро-2*H*-хіназолін-3-іл)-ацетаміду, що мають протисудомну дію» (від 11.11.2019, бюлетень №21).

Практичне значення отриманих результатів

Враховуючи те, що робота є практично орієнтованим дослідженням, її основним та вельми важливим практичним досягненням є розроблення алгоритму пошуку нових антиконвульсантів та експериментальне доведення його ефективності з можливою подальшою імплементацією у науково-дослідну роботу фармацевтичних підприємств. Основна ідея алгоритму полягає у поетапному застосуванні *in silico* визначення афінності до біомішені та *in vivo* експериментів. Доказом ефективності цієї методології є виявлення у роботі ряду «сполук-хітів» і найперспективнішої похідної 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетаміду.

Практичне значення для медичної та прикладної синтетичної органічної хімії мають знайдені підходи до побудови 4-оксо-2-тіоксо- та 2,4-діоксохіназолінової платформи, які дозволяють однореакторно одержувати відповідні 3-заміщені похідні з високим виходом та чистотою. Як приклад, розроблено препаративний легко масштабований спосіб синтезу (2,4-діоксо/2-тіо-4-оксо)-хіназолін-3-іл)оцтових кислот, який є дієвим інструментом, що дозволить використовувати його в подальших дослідженнях для спрямованого пошуку біологічно активних речовин в ряду похідних хіназолін-4(3*H*)-ону, зокрема з використанням методології паралельного синтезу у створенні бібліотек амідних похідних.

Визначені закономірності залежності протисудомної активності від структури синтезованих похідних хіназоліну доповнюють наявні емпіричні

спостереження щодо пошуку антиконвульсантів у рядах нітрогеновмісних гетероциклів та в подальшому можуть стати вагомим інструментом раціоналізації фармакологічних досліджень.

Одержані результати дисертаційного дослідження впроваджено у науково-дослідну роботу кафедр закладів вищої освіти, а саме Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова (акт впровадження від 02.09.2023 р.), Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (акт впровадження від 06.03.2023 р.), Тернопільського національного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського (акт впровадження від 26.03.2023 р.).

Аналіз основного змісту роботи, ступінь обґрунтованості наукових досліджень і висновків

Дисертаційна робота Ель Кайал Вассім Мохамеда виконана на 190 сторінках друкованого тексту (обсяг основного тексту 161 сторінка), включає анотацію, вступ, 5 розділів, загальні висновки, список використаних джерел (159 найменувань) та 2 додатки. Робота ілюстрована 26 схемами, 50 рисунками та 11 таблицями.

У *першому розділі* дисертант наводить аналіз сучасного стану синтетичних досліджень, спрямованих на побудову молекулярної платформи хіназолін-4(3*H*)-ону. Також у цьому розділі міститься огляд відомих біологічно активних хіназолін-4(3*H*)-онів. Слід зазначити, що на цьому етапі автором проведено доволі детальний аналіз залежності між структурою похідних хіназолону та їх нейротропною активністю, що було встановлено у попередніх дослідженнях.

Другий розділ містить розробку та опис загальної методології дослідження. У цій частині автор наводить та обґрунтовує «дорожню карту» дисертаційної роботи, яка включає чіткий алгоритм пошуку протисудномних субстанцій. Відповідно до алгоритму у розділі обрано базову платформу (хіназолін-3-іл)оцтової кислоти та аргументовано структурні особливості досліджуваних лігандів і на основі цих рекомендацій було сконструйовано фокусовану віртуальну бібліотеку. Також автор у цій частині окреслює біомішені,

відповідальні за реалізацію протисудомної активності та проти яких будуть тестуватися сконструйовані у роботі сполуки. Базуючись на одержаних значення афінності лігандів до протисудомних біомішеней було ранжовано елементи бібліотеки сполук та обрано 50 найбільш перспективних сполук для синтезу.

У *третьому розділі* розроблено препаративну методику синтезу проміжного продукту – 4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти, та на його основі синтезовано 18 цільових не описаних у літературі амідів. Також у частині наводяться дані фармакологічних досліджень одержаних тіоксоамідів на аспект наявності у них протисудомної активності на моделі хемотоксичних судом, викликаних введенням пентилентетразолу. Одержані дані використані у SAR-аналізі та формуванні рекомендацій з пошуку протисудомних засобів серед хіназолінових похідних.

Четвертий розділ починається з розробки ефективного способу синтезу іншого ключового білдинг-блоку дисертаційної роботи – 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти, який би дозволив одержати цю похідну з високим виходом та достатнім рівнем чистоти для здійснення подальших синтетичних кроків. Як найоптимальніший підхід було обрано окиснення відповідної 2-тіоксо похідної гідроген пероксидом, що дозволило отримати цільову кислоту з чистотою 99% та 90+% виходом. Для 10 з 15 синтезованих похідних проведено скринінг протисудомної активності на моделі PTZ-індукованих судом. За його результатами сформульовано певні висновки стосовно SAR та визначено, що сполуки з 2-оксо групою є в загальному випадку більш перспективною молекулярною платформою для пошуку нових антиконвульсантів, ніж їх структурні аналоги з 2-тіоксогрупою. За показниками захисту від судом на PTZ-моделі та нейротоксичності виокремлено сполуку-хіт 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетамід, який мав низький рівень гострої токсичності. Показано також валідність методології роботи для прогнозування активності сполук на моделі судом, індукованих максимальним електрошоком.

П'ятий розділ дисертаційної роботи присвячено модифікації структури сполуки-хіта та вивчення впливу таких структурних змін на протисудомну

активність дериватів. У розділі окреслено та аргументовано напрямки структурної модифікації 2,4-дихлорофенільного хіта. Показано, що така оптимізація деактивує протисудомні властивості сполуки-хіта. Для останньої було проведено ряд експериментів та показано її активність на моделях судом, викликаних хемотоксинами. З використанням інструментів молекулярного докінгу запропоновано ймовірні механізми протисудомної активності цієї сполуки. На основі одержаних даних з фармакологічного профілю сполуки-хіта автором було зроблено висновок про перспективність подальшого поглибленого дослідження «сполуки-лідера» з визначенням її детальних нейрохімічних механізмів та супутніх видів фармакологічної активності.

Висновки дисертаційної роботи узагальнюють результати проведених досліджень і повністю відповідають поставленій меті і завданням. Слід ще раз наголосити, що тематика дисертаційної роботи актуальна для сучасних фармацевтичної та медичної галузей.

Повнота викладення матеріалів дослідження в опублікованих роботах

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 15 наукових праць, зокрема 3 статті у наукових фахових виданнях (усі реферуються наукометричними базами даних Scopus та Web of Science, 1 журнал має квартал Q1, 2 журнали – Q3), 1 патент України на корисну модель та 11 тез доповідей на різного рівня Всеукраїнських та міжнародних науково-практичних конференціях.

Варто зазначити, що публікації повністю відображають основний зміст дисертаційної роботи.

Аналіз дисертаційної роботи показав, що вона ґрунтується на достатній кількості експериментальних досліджень, виконаних на високому науковому рівні. Одержані результати логічно викладені автором у роботі, що забезпечує легкість сприйняття матеріалу. Достовірність даних, одержаних протягом досліджень, рекомендацій та висновків, які сформульовано дисертантом, не викликають сумнівів.

Дисертаційна робота оформлена згідно з вимогами та не виявляє ознак академічного плагіату.

У процесі рецензування дисертаційної роботи виникли деякі зауваження і пропозиції:

1. За текстом роботи зустрічаються не дуже вдалі та некоректні фрази, як то: «реакція амінування» (с. 96, 160), «хіназолін є бензанельованим аналогом піримідину» (с. 22, 58), « $R^1=Ben, But$ » (с. 32), «t-But» (с. 38), «1-нафталенметанолу» (с. 33), «молекулярні маси одержаних похідних **3.7-3.24** підтверджено» (с. 77), «метилового ефіру» замість естеру (с. 109), « $89,0 \pm 90,0^\circ C$ » (с. 109), «1-ацетамідні похідні» та «1-метилбензенові похідні» (с. 120).
2. У дисертації зустрічаються деякі описки та неточності: «GAA – концентрована оцтова кислота» замість крижаної оцтової кислоти (с. 19); на схемі 1.19 помилкова структура продукту **1.46** та назва для сполуки **1.43** у описі за текстом; ЯМР-спектрометр Varian Mercury-400 має робочу частоту 400 МГц, хоча в експериментальній частині скрізь наведено 500 МГц (с. 85); некоректний зсув «1176,7 (C=S)» для сполуки **3.9**; для сполук **4.16** та **4.18** наведено помилкові значення елементного аналізу.
3. Було б доцільно у додатках (або основному тексті) навести 298 сполук із віртуальної бібліотеки з даними енергій зв'язування на основі проведеного молекулярного докінгу. Цікаво також було б включити до обговорення структурні особливості тих сполук за масиву 298, які мали низький рівень зв'язування з мішенню згідно з докінговими дослідженнями.
4. Речення «Серед 2-тіоксопохідних хіназоліну спрогнозовано високі значення скорингової функції до ГАМК_A рецептору ($>-7,7$ ккал/моль), що виявилось дещо неочікуваним через літературні дані щодо їх можливого ГАМКергічного впливу (табл. 2.1)» (с. 69), «Розрахунок RMSD – онлайн ресурс ProFit Results» (с. 72) потребують посилання на літературне джерело.
5. Не зовсім виправдана фраза на сторінці 100 «За показником летальності прослідковується кореляція між збільшенням карбонового ланцюга в

ацетамідному залишку та зменшенням летальності в ряду NHCH_2Ph $>$ $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ $>$ $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ », оскільки для бензильної та фенетильної похідної ці значення однакові.

6. Фраза «наявність тіоксо-групи є небажаною в структурі антиконвульсантів та призводить до втрати активності» є дуже категоричною, оскільки ця закономірність виявляється лише у випадку досліджуваних хіназолінів.

Вказані зауваження та пропозиції не мають принципового значення не знижують позитивної оцінки роботи.

У порядку дискусії вважаю доцільним, щоб дисертант відповів на наступні запитання:

1. Чи не розглядали Ви віртуальний скринінг та модифікацію досліджуваних сполук/хітів шляхом заміни анельованого бензенового ядра на його гетероаналог? Тим паче, що синтетичні підходи, які було окреслено у цій статті будуть чудовим інструментом для реалізації цієї стратегії.
2. Чи не було спроб масштабувати синтез кислоти **3.3**, для застосування методології паралельного синтезу амідів **3.7-3.24**? (с. 85)
3. Як Ви вважаєте, чи чистота 94+% достатня для проведення біологічних досліджень та надійних висновків із залежності «структура-активність» (на прикладі таблиці 4.1)?
4. На с. 120 «Вибір радикалів в арильному фрагменті базувався на літературних даних та власних результатах досліджень щодо впливу замісників на протисудомну активність». Чому у цьому розділі Ви перейшли до емпіричного підходу, якщо у попередніх розділах було показано ефективність методології «докінг→синтез→*in vivo* дослідження»? Тим паче, що у розділі 2 було проведено докінг для подібних сполук (групи III та IV).

Висновок


За результатами аналізу дисертаційної роботи Ель Кайал Вассім Мохамада на тему «Синтез, фізико-хімічні та фармакологічні властивості арил-

(алкіл)амідів(2,4-діоксо-/2-тіо-4-оксо)-хіназолін-3-іл)оцтових кислот”, наукових публікацій, в яких висвітлені основні її положення, можна зробити висновок, що за обсягом проведених досліджень, актуальністю, науковою новизною, практичною значимістю, ступенем обґрунтованості наукових положень та висновків вона відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 р. № 44, а її автор, Ель Кайал Вассім Мохамад, заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 “Фармація, промислова фармація” галузі знань 22 “Охорона здоров’я”.

Доцент ЗВО кафедри загальної хімії
Національного фармацевтичного університету,
кандидат фармацевтичних наук, доцент

Підпис к.ф.н., доцента Леги Дмитра засвідчую:
Начальник відділу кадрів НФаУ




Дмитро ЛЕГА

Орина ПРИСІЧ