

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію **ФРАСИНЮКА Михайла Сергійовича**
«Хімічний дизайн біологічно активних сполук на основі ізофлавоноїдів, ауронів
та кумаринів», представлена на здобуття наукового ступеня доктора хімічних
наук

за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія

Актуальність теми.

Серед джерел для пошуку і дизайну нових лікарських засобів провідні позиції займають гетероцикли та природні речовини. Тому не дивно, що гетероциклічні сполуки, які мають розповсюдженість у природі, наприклад гетероциклічні вторинні метаболіти, відносяться до одного найважливіших об'єктів біоорганічної хімії. Вони ефективно взаємодіють з біологічними мішенями, і, тому, є перспективними для пошуку нових лікарських препаратів, що було продемонстровано багатьма прикладами лікарських засобів, які застосовуються в клінічній практиці, наприклад, як протипухлинні препарати.

Але вторинні метаболіти часто є структурно складними молекулами, що мають обмежену кількість замісників, тому виникає актуальне завдання збільшення молекулярного різноманіття похідних природних сполук даного типу та одержання їх міметиків шляхом структурних модифікацій, що приводять до змін молекулярного остова, або введення й заміни функціональних груп.

Таким чином, обраний автором напрям, що пов'язаний зі створенням нових типів біологічно активних сполук на основі ізофлавоноїдів, кумаринів та ауронів, є наразі актуальним і відповідає сучасній концепції органічної та біоорганічної хімії застосування «привілейованих скефолдів» для дизайну новітніх лікарських засобів.

Дисертаційна робота виконувалась в рамках держбюджетних тем відділу хімії біоактивних азотовмісних гетероцикліческих основ Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України та однієї держбюджетної наукової теми Національного університету харчових технологій.

Наукова новизна одержаних результатів не викликає сумнівів та полягає, зокрема, у наступному: розроблено методики одержання 6- та 7-гідрокси-3-арилкумаринів і показано, що дані сполуки є ефективними інгібіторами вільнорадикального окиснення ліпідів *in vitro*. Запропоновано шляхи введення карбоксильної групи в молекули ауронів, що дозволило виявити сполуки з інгібуючою здатністю щодо ксантиноксидази. Створено стратегію синтезу 8-амінометильних похідних 7-гідрокси-5-метоксизофлавонів і досліджено особливості амінометиливання регіоізомерних 5-гідрокси-7-метоксизофлавонів.

Запропоновано новий підхід до функціоналізації флавоноїдів, актуальність якої для пошуку нових біологічно активних молекул доведена результатами біологічних досліджень, зокрема впливом одержаних сполук на канцерогенез раку простати – виявлено сполуки, які ефективно впливають на проліферацію при концентрації 10 μ M.

Розроблено ефективний однореакторний метод синтезу 2- ω -карбоксиалкілхромонів, які можуть бути використані для встановлення механізмів біологічної дії природних ізофлавонів. Запропоновано метод синтезу 2-(3,3,3-трифлуорацетоніл)хромонів та ізофлавонів, який є зручним для безпосереднього введення флуоровмісних фрагментів у молекули 2-алкілзаміщених похідних хромону.

Вперше основи Манніха та синтезовані з них 8-заміщені похідні ізофлавонів, кумаринів та ауронів використано як прекурсори гетеродієнів у реакції Дільса–Альдера, досліджено їх взаємодію з пуш-пульними діенофілами в умовах реакції Дільса–Альдера з оберненими електронними вимогами. Вивчено особливості взаємодії 7-гідроксиізофлавонів, 6-гідроксиауронів та алкалоїду гармолу з лінійними аміноспиртами в умовах реакції Манніха. Показано, що для продуктів амінометилювання характерна кільчасто-кільчаста таутомерія. Показано, що при взаємодії 3-(2-гідроксифеніл)енамінокетонів з основами Манніха фенолів в умовах оберненої за електронними вимогами реакції Дільса–Альдера протікає доміно-реакція з утворенням гомоізофлавонів. Досліджено особливості протікання реакції та запропоновано механізм цієї взаємодії.

Запропонована методика препаративного одержання похідних 4,5-діарилпіrimідинів, 4,5-діарилізоксазолів, 3,4-діарилпіразолів взаємодією природних ізофлавонів та їх похідних з амідинами, гідроксиламіном, гідразином. З використанням рециклізації хромонового ядра ізофлавонів синтезовано бібліотеку сполук для біологічного скринінгу. Виконані SAR-дослідження, які у поєднанні з комп’ютерним моделюванням показали, що 3,4-діарилпіразоли є перспективними скаfoldами для хімічного дизайну агентів, спрямованих на активність глікогенсінтази.

Розроблено простий метод синтезу α -(3(5)-трифлуорметилпіразол-5(3)-іл)-2-гідроксидезоксибензоїнів, що відкриває можливість цілеспрямованого конструкування біологічно перспективних 3-(трифлуорметил)піразол-дезоксибензоїнів. Одержано бібліотеку цитизин-ізофлавонових кон’югатів з потенційною протипухлинною активністю і знайдено ефективні інгібітори проліферації клітин лінії PC-3 раку простати.

Вперше застосовано анабазин та цитизин як амінні компоненти в реакції Манніха з пропаргіловими етерами 6- і 7-гідрокси-3-арилкумаринів, що відкриває новий синтетичний підхід до диверсифікації похідних цих алкалоїдів.

Ступінь обґрутованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність. Дослідження, що представлені у дисертаційній роботі, виконані на високому науковому рівні з використанням сучасних підходів органічного синтезу, фізико-хімічних, хроматографічних та спектральних методів дослідження, включаючи ЯМР ^1H , ^{13}C спектроскопію, з використанням двовимірних методик (HSQC, HMBC, NOESY), ІЧ спектроскопію, рентгеноструктурний аналіз, елементний аналіз та інші методи. Для виявлення фізіологічно активних сполук використаний біологічний скринінг. Усі наукові положення і висновки, сформульовані в дисертації, є науково обґрутованими та базуються на експериментальних дослідженнях і логічно витікають з отриманих результатів. Вважаю, що достовірність результатів роботи та її висновків не викликає сумніву.

Структура дисертації. Дисертаційна робота складається із анотації, вступу, чотирьох розділів, висновків і додатку.

Перший розділ дисертації присвячено створенню нових методів синтезу ряду біологічно активних сполук на основі кумаринів та флавоноїдів шляхом введення нових та заміни існуючих функціональних груп. Зокрема, автором запропоновано підхід до синтезу різноманітних 6- та 7-гідрокси-3-арилкумаринів та *in vitro* досліджено інгібування вільнорадикального окиснення ліпідів речовинами, що одержано. Для пошуку нових сполук, що мають здатність інгібувати ксантиноксидази розроблено методику введення карбоксильної групи в молекули ауронів. Виявлено похідні ізофлавонів та ауронів, що здатні впливати на канцерогенез раку простати. Для синтезу відповідних сполук, в роботі створено новий метод, який дозволяє проводити функціоналізацію флавоноїдів, що базується на введенні амінометильної групи та її трансформації в ацетоксиметильну, гідроксиметильну чи алкоксиметильну групу. Також розроблено доволі простий але ефективний однореакторний метод одержання біологічно активних 2- ω -карбоксиалкілхромонів і запропоновано метод прямого введення флуоровмісних замісників у структуру 2-алкілзаміщених хромону, що включає реакції з трифлуороцтовим ангідридом у присутності трифлуороцтової кислоти.

У другому розділі дисертації розглядаються гетеро-реакції Дільса-Альдера з оберненими електронними вимогами як шляху до одержання конденсованих гетероциклічних систем на основі ізофлавонів, кумаринів та ауронів, а також введення гетарилметильних фрагментів та заміна карбоциклічних фрагментів на гетероциклічні у природних сполуках. Зокрема, автором роботи як прекурсори гетеродієнів в реакції Дільса-Альдера з оберненими електронними вимогами вперше використано основи Манніха та з них отримані 8-заміщені похідні ізофлавонів, кумаринів та ауронів. Вивчено деякі особливості взаємодії

7-гідроксизофлавонів, 6-гідроксиауронів та алкалоїду гармолу з лінійними аміноспиртами в умовах реакції Манніха і знайдено, що для продуктів амінометиливання характерна кільчата-кільчата таутомерія. Одержані поліконденсовані гетероцикли показали суттєвий вплив на проліферацію клітин раку простати PC-3, які характеризуються високою здатністю до метастазування в кістки та резистентністю до гормонів.

У третьому розділі наведені результати, що стосуються синтезу похідних 3,4-діарилпіразолів, 4,5-діарилізоксазолів, 4,5-діарилпіримідинів та розробки методу синтезу гомоізофлавонів, які є важливими біологічно активними сполуками та виявляють широкий спектр фізіологічної дії. Для цього автор використовував стратегію структурних модифікацій, які супроводжуються топологічними змінами остату природної молекули. В роботі розроблено умови препаративного синтезу зазначених сполук шляхом введення до взаємодії природних ізофлавонів з амідинами, гідроксиламіном, гідразином. Серед одержаних похідних знайдено ряд ефективних інгібіторів глікогенсінтази. Окрім того, запропоновано підхід до одержання α -(3-трифлуорметилпіразол-5-іл)-2-гідроксидезоксибензоїнів, який надає можливість цілеспрямованого конструювання такого типу структур. Автор вперше продемонстрував, що при взаємодії 3-(2-гідроксифеніл)енамінокетонів з основами Манніха фенолів в умовах оберненої за електронними вимогами реакції Дільса–Альдера протікає доміно-реакція з утворенням гомоізофлавоноїдів. Це дозволило запропонувати однореакторний метод синтезу гідроксильзованих по В-кільцу гомоізофлавоноїдів, який не потребує захисту фенольних груп.

У четвертому розділі дисертаційної роботи наведена інформація стосовно результатів розробки методів поєднання в одній молекулі фрагментів флавоноїдів та алкалоїдів цитизину й анабазину, а також досліджень їх біологічної дії. З використанням даної стратегії було сформовано фокусовану бібліотеку цитизин-ізофлавонових кон'югатів, що мають протипухлинну активність. Проведений біологічний скринінг дозволив знайти ефективні інгібітори проліферації клітин раку простати. Показано, що механізм впливу полягає в інгібуванні поліфункціонального ензиму HSD17B4. Запропоновано метод регіоселективного амінолізу епоксидів за участю цитизину та одержано цитизин-ізофлавонові і цитизин-кумаринові кон'югати. Анабазин та цитизин вперше застосовано як амінні компоненти в реакції Манніха з пропаргіловими етерами 6- і 7-гідрокси-3-арилкумаринів.

Повнота викладу основних результатів. Основні результати дисертації повністю викладено у 25 статтях у фахових наукових виданнях, зокрема 13

публікацій у виданнях рівня Q1 та Q2, 15 тезах доповідей на конференціях, 2 заявках WIPO, 3 заявках на патенти США.

Висновки дисертації сформульовано чітко, основні положення, що було винесено автором на захист, добре обґрунтовані, актуальність та наукова новизна безперечні. Автореферат за основним змістом повною мірою відображає суть роботи.

Зауваження щодо змісту й оформлення. В цілому загальне враження від дисертаційної роботи є цілком позитивним – автором зроблено об’ємне експериментальне дослідження, що безумовно має високу фундаментальну та практичну цінність. Але ознайомлення з дисертацією викликало деякі питання та несуттєві зауваження:

1. Схема 1 на стор. 40 дисертації містить сполуку із замісником R, якого немає у підпису до схеми.

2. З чим пов’язано те, що синтез сполук **6a,b** та **6c,e-h** (стор. 46 дисертації) був здійснений двома різними шляхами, які відрізняються стадією алкіловання?

3. Чи були якісь докази, що в сполуках **3a-e** (стор. 54 дисертації) існує саме внутрішньомолекулярний водневий зв’язок, а не утворюються міжмолекулярні асоціати?

4. Для сполук **7-9** (стор. 101 - 102 дисертації) відсутні структури на схемах, а також розшифровка їх замісників, що деякою мірою ускладнює розуміння матеріалу.

5. У статті на стор. 170 - 184 дисертації мова йде про таутомерію ізофлавонів, що містять гетероциклічні напів-аміналі. Але з самого початку обговорення використовується дивне поєднання двох різних термінів - таутомерні ізомери (стор. 171, початок правого стовпчику і далі по тексту), трохи нижче мова взагалі вже йде про ізомери, але далі знов про таутомери. Окрім того, в результатах, наведених у статті (табл. 1, стор. 172) показано, що на співвідношення таутомерів впливає спосіб отримання, зокрема тип розчиннику, в якому проводили реакцію. Але положення таутомерної рівноваги чистої сполуки не має залежати від способу її одержання. Таким чином виникають питання:

- a) все ж такі в даному випадку наявна ізомерія чи таутомерія?
- b) чи контролювались при вимірюванні ЯМР спектрів температура зйомки, вміст соляної кислоти та води в дейтерохлороформі? Чи контролювався в сполуках, що досліджувались, вміст розчиннику, в якому виконувався синтез, а також наявність інших домішок?
- c) Впродовж якого часу і в яких умовах витримувались зразки сполук в ЯМР ампулах для встановлення таутомерної рівноваги і яким чином контролювалось те, що рівновага встановилася? Чи відрізнялась температура зйомки ЯМР спектрів і температура, при який встановлювалась рівновага?

6. На стор. 15 автореферату вказано, що *цис*-поєднання тетагідрофуранового/піранового та бензопіранового фрагментів було

підтверджено, у тому числі, з використанням оптично-активної нерухомої фази у ВЕРХ експериментах. Звісно ж, ВЕРХ сам по собі не може надати інформацію про стереохімію поєднання циклів. До речі, в дисертації використання ВЕРХ описано більш коректно (стор. 142).

7. Автореферат і дисертація містять деякі описки, помилки та невдалі вирази.

Але зазначені вище зауваження не є суттєвими, не впливають на загальне позитивне враження від дисертаційної роботи та не знижують її цінність та достовірність.

На основі наведеного вище вважаю, що дисертаційна робота «Хімічний дизайн біологічно активних сполук на основі ізофлавоноїдів, ауронів та кумаринів» за актуальністю, обґрунтованістю висновків, науковою новизною, теоретичною та практичною значущістю результатів є суттєвим внеском у сучасну органічну і біоорганічну хімію. Робота відповідає вимогам щодо докторських дисертацій, а її автор, **Фрасинюк Михайло Сергійович**, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора хімічних наук за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія.

Перший заступник генерального директора
з наукової роботи ДНУ НТК “Інститут
монокристалів” НАН України,
завідувач лабораторії фізико-хімічних процесів,
д.х.н., проф., чл.-кор. НАН України

Валентин ЧЕБАНОВ

Підпись чл.-кор. НАН України В.А. Чебанова завіряю,
учений секретар ДНУ НТК “Інститут
монокристалів” НАН України,
к.х.н.



Микола Ілліч ШЕРБАКОВ