

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Белозеровой Ольги Александровны «Синтез и биологическая активность природного лигнана севанола и его аналогов», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности *1.4.9 – биоорганическая химия*.

### **Актуальность темы исследования**

Разработка эффективных лекарственных средств является одной из важнейшей задачей химической науки, которая решается только в рамках тесного сотрудничества специалистов из смежных наук (химии, физики, биологии и др.). Согласно статистическим данным, природные соединения и их производные составляют группу наиболее перспективных, с точки зрения конечной клинической эффективности, молекул. Среди различных природных веществ, большое семейство широко распространенных лигнанов привлекает химиков и биологов уже длительное время, благодаря уникальному спектру биологической активности и, в частности, противовирусным и противораковым свойствам.

С другой стороны, в патофизиологии многих заболеваний большое значение играют процессы воспаления, поэтому противовоспалительные средства, занимают отдельную нишу фармацевтического рынка. Простые синтетические молекулы нестероидных противовоспалительных средств, подавляя синтез простагландинов, обладают высокой эффективностью, однако, провоцируют ряд побочных эффектов: желудочно-кишечные кровотечения, гепатотоксичность и др. Поэтому разработка новых противовоспалительных и анальгетических средств селективного действия является актуальной проблемой. pH-Чувствительные катионные каналы ASIC, экспрессируемые нейронами центральной и периферической нервной системы, отвечающие за ощущение острой и хронической боли являются относительно новой мишенью для лекарственных средств и, в этой связи, новые ингибиторы этих каналов можно считать перспективными анальгетическими средствами. Таким образом, тема представленного диссертационного исследования является актуальной.

### **Научная новизна и практическая значимость исследования**

В работе реализован новый полный синтез лигнана севанола в энантиомерно чистой форме, включая ряд его аналогов (всего 9 конечных соединений), что подтверждается сравнением спектров ЯМР и значения удельного оптического вращения природного и синтетического севанола. Такой успешный результат явился следствием

достаточно эффективной методики сборки дигидронафталинового каркаса и синтеза кислотных фрагментов. Были существенно оптимизированы стадии этерификации яблочной кислоты (за две стадии на 28%). Значительно сокращена синтетическая цепочка получения эфира изоцитрата с 5-ти до одной стадии, с практически неизменным общим химическим выходом (~53-60%). Проведено исследование различных путей синтеза изоцитратного эфира кофейной кислоты, включая варьирование условий синтеза и типов защитных групп. Найдены оптимальные условия окислительной димеризации полученных эфиров в присутствии хлорида железа(III). Следует подчеркнуть, что первоначальная методика обеспечивала 1-2% выход севанола, а оптимизированная позволила получить 41% (в виде смеси диастереомеров 3:1)! Подобранные условия разделения этой смеси обеспечили граммовые количества чистого природного севанола, вместе с его изомером, а общий выход полного синтеза составил 8%. Разработанная методика была успешно расширена на синтез 9 различно замещенных аналогов севанола даже с более высокой эффективностью. Полученные соединения исследовались методом электрофизиологии на ингибиторную активность в отношении проводимости каналов ASIC3 человека и ASIC1a крысы экспрессированных в ооцитах лягушки *X. laevis*. Результаты экспериментов продемонстрировали высокую эффективность севанола и изосеванола при 0.2 мМ (90% и 70% ингибирования), а их диастереомерная смесь, образующаяся в ходе синтеза незначительно уступала чистому севанолу на ASIC1a канале. Необходимо отметить, что активность всех других синтезированных соединений с редуцированными функциональными группами была либо значительно ниже, либо отсутствовала совсем, как у перметилированного аналога севанола **s788**, что указывает на критическую важность свободных карбоксильных групп в молекуле. Кроме того, эффект ингибирования был обратим и активность каналов полностью восстанавливалась после отмывки препаратов. На основе экспериментов по конкурентному ингибированию проводимости ASIC1a канала известным FRRF-пептидом и севанолом и методов молекулярного докинга, были сделаны выводы, что сайты связывания обоих соединений находятся в области центрального вестибуля, могут быть не идентичными и частично перекрываются. Расчетные данные говорят об участии ионных мостиков между двумя карбоксильными группами каждого из фрагментов изоцитрата и остатков аргинина Arg369. Дальнейшие исследования *in vivo* по стимулированию болевых ощущений у мышей (уксусные корчи и тесты с горячей пластинкой) также демонстрируют высокую эффективность севанола в дозах до 1 мг/кг. Важным результатом, подтверждающим удобство и перспективность потенциального лекарственного использования севанола, является его более высокая эффективность именно при пероральном введении в организм животного.

## Оценка содержания и структуры диссертации

Представленная Белозеровой О.А. диссертация оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ. Структура и объем диссертации соответствуют требованиям, предъявляемым к научно-квалификационным работам. Автореферат диссертации полностью отражает содержание диссертации. Работа соответствует паспорту заявленной специальности 1.4.9 – биоорганическая химия в областях исследований: 1. Структурно-функциональные и синтетические исследования биологически значимых высокомолекулярных соединений (белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов и смешанных биополимеров любых типов); 5. Низкомолекулярные биорегуляторы; пептиды, нуклеотиды, пептидные и стероидные гормоны, витамины, липиды, простагландины, лейкотриены и другие метаболиты арахидоновой кислоты, алкалоиды и другие химические соединения из микроорганизмов, грибов, водорослей, растений и животных, их синтетические аналоги, а также синтетические биологически активные вещества (лекарства, пестициды).

Структура диссертации является классической. Диссертация изложена на 152 страницах машинописного текста и состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка авторских работ по теме диссертации и списка цитируемой литературы, насчитывающего 216 наименований. Материал включает 7 таблиц и 51 схему.

Во **введении** обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цели и задачи работы, научная новизна, положения выносимые на защиту.

**Конкретной целью диссертационного исследования** было структурно-функциональное изучение севанола и его модифицированных аналогов. Для достижения поставленной цели автором решался **ряд задач**: 1. Методом полного синтеза подтвердить структуру природного лигнана севанола; 2. Оптимизировать разработанный метод синтеза севанола для проведения дальнейших биологических тестов *in vitro*, *in vivo* и доклинические испытания; 3. Синтезировать модифицированные аналоги севанола и изучить характеристики их взаимодействия с ASIC-каналами; 4. Исследовать влияние структуры севанола и его аналогов на эффективность ингибирования ASIC-токов с помощью электрофизиологических методов.

В **Литературном обзоре** систематизированы данные по структурным типам лигнанов, путям синтеза этих соединений в природных системах и через методы органической химии. Приведены данные по характеристикам ASIC-каналов и их роли в патофизиологических процессах, путях регуляции и ингибирования низкомолекулярными соединениями. Выбранная тематика обзора позволяет легко перейти к следующей главе

работы. В **Обсуждении результатов** изложены результаты диссертационного исследования. Вначале описана разработка и оптимизация синтеза севанола и его аналогов, методы их очистки и выделения, изучение спектральных характеристик. Далее описываются результаты по изучению ингибиторной активности на ASIC-каналах и путей связывания с их белковой структурой. **Четвёртая глава** представляет собой **Экспериментальную часть**, в которой приведены методики синтеза соединений, их физико-химические характеристики и другие экспериментальные данные. Результаты диссертационного исследования обобщены **Выводами**, которые **обоснованы**, убедительно подтверждены соответствующим экспериментальным материалом и **не вызывают сомнений**.

**Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научных изданиях.** Основное содержание работы отражено в авторских публикациях. По материалам диссертации опубликовано 3 работы в рецензируемых научных журналах (одна в журнале 1-го квартиля), включенных в перечень ВАК Министерства образования и науки РФ, практически важные результаты защищены патентом РФ. Данные диссертационного исследования были представлены в виде 3-х тезисов на российских и международных конференциях.

Поскольку диссертация интересная, выполнена на хорошем профессиональном уровне возник целый ряд вопросов и не критических замечаний, ответы на которые должны способствовать улучшению представленного материала:

1. В ходе оптимизации и разработки синтеза три-*трет*-бутилизоцитрата **3**, при аллилировании и алкилировании *трет*-бутилбромацетатом происходит формирование нового хирального центра. В диссертации не приведено значение диастереоселективности этой реакции (в методе Кало соотношение диастереомеров ~90%) и, соответственно, не рассматривается стереохимическая модель процесса.
2. В отличие от синтеза севанола, при получении его аналога **s590** не указано соотношение диастереомеров на стадии окислительной димеризации.
3. Очень любопытным является результат неудачного десилилирования эфира **16a** ТВАФ в THF. Что, в результате, могло помешать этой реакции в среде безводного THF?
4. FeCl<sub>3</sub>-катализируемая реакция димеризации изоцитрата кофейной кислоты **4** является одной из ключевых стадий синтеза севанола и его аналогов. В диссертационной работе отмечены факторы (растворитель, температура, количество окислителя, свет), влияющие на выход продукта. На основании литературных данных сделано предположение о

радикальной природе промежуточных частиц, однако литературная схема не учитывает эффект комплексообразования соли железа с катехольными фрагментами. Каков возможный(е) механизм(ы) реакции димеризации? Это гомогенная или гетерогенная реакция?

5. Как следует ли литературных данных, содержание севанола в тимьяне около 1.5%, насколько трудоемким является выделение из природного возобновляемого сырья по сравнению с разработанным химическим синтезом?

6. Являются ли ASIC-каналы единственной мишенью севанола и родственных соединений в организме, проводилась ли оценка цитотоксичности севанола?

7. Из результатов докинга севанола в центральном вестибюле канала ASIC1a, показано, что изоцитратные фрагменты образуют две водородные связи с остатками Arg369. Как согласуются эти данные с уменьшением активности аналога севанола **s590**, построенного из остатков яблочной кислоты, имеющей две карбоксильные группы? Проводился ли докинг с производным **s590**?

8. В разделе аналгетическая активность севанола с одной стороны указывается, что терапевтическое действие севанола *per os* статистически значимо, начиная с 0.1 мг/кг (уксусная кислота), тогда как из графика можно сделать вывод, что дозировка 0.01 мг/кг, также значима.

#### *Экспериментальная часть*

9. В изображении соединений **15b**, **15d**, **16b** вместо аллильных групп нарисованы винильные, соответственно в названиях тоже винильные заместители.

10. В названии **s788** пропущены значения абсолютных конфигураций хиральных центров.

11. В методике синтеза эпифиловой кислоты, по-видимому, пропущена вода, требуемая для гидролиза.

#### Обнаруженные опечатки и неудачные выражения в тексте:

Стр. 21 и 28, «реакция Фриделя-Кравтца», должно быть Кравтса.

Стр. 61, «...гидролизу трикарбоновых кислот...»

Стр. 66, «подробное использование...»

Стр. 83, «изучение вклада стереомеризации в биологическую активность»

Повсеместно в тексте не разделяются дефисом *трет* и *бутил*

Стр. 104, «колонка для аналитики реакций синтеза интермедиатов», должно быть: *колонка для аналитического разделения продуктов реакции*.

В основном тексте и экспериментальной части обозначения конфигурации по D,L-номенклатуре указаны в скобках, хотя такое обозначение принято только для R,S-номенклатуры IUPAC.

Хочу подчеркнуть, что указанные вопросы и замечания не снижают общей положительной оценки и значимости диссертационного исследования. В результате анализа текста диссертации, автореферата и публикаций Белозеровой О.А. можно заявить, что **цель диссертационной работы достигнута, а задачи решены.**

### **Заключение**

Диссертационная работа Белозеровой О.А. «Синтез и биологическая активность природного лигнана севанола и его аналогов» по объему, научной новизне, практической значимости, достоверности полученных результатов, научной обоснованности химических и технологических решений в области разработки методов синтеза фармацевтически значимых лигнанов соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ: от 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. №748; от 29.05.2017 г. №650; от 20.03.2021 г. № 426), предъявляемым ВАК Российской Федерации к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата химических наук, а ее автор Белозерова Ольга Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия.

Доктор химических наук, старший научный сотрудник лаборатории стереохимии металлоорганических соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (ИНЭОС РАН)

Кузнецов Николай Юрьевич

«06» декабря 2021 г.

Подпись доктора химических наук, старшего научного сотрудника лаборатории стереохимии металлоорганических соединений заверяю,  
Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук,  
к.х.н.

Е.Н. Гулакова

Адрес: 119991, ГСП-1, Москва, 119334, ул. Вавилова 28, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук.  
(499) 783-32-74 доб. 1260; e-mail: nkuznff@ineos.ac.ru