

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Анастасии Владимировны Конышевой** «Синтез и превращения алкилированных 1-циано-2,3-секотритерпеноидов», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3 – Органическая химия

Актуальность диссертационной работы

Синтез новых биологически активных веществ и создание на их основе новых лекарственных средств с комплексом ценных для медицины свойств для лечения и профилактики социально значимых заболеваний является одной из важнейших задач современной органической и медицинской химии. Одним из перспективных путей при разработке новых терапевтических агентов является поиск биологически активных веществ на основе метаболитов, выделяемых из воспроизводимых природных источников различного происхождения. Среди них обращают на себя внимание пентациклические тритерпеноиды - бетулин, а также бетулиновая, олеаноловая, урсоловая и глицирретовая кислоты. Их химической модификации посвящены сотни статей и патентов. Десятки новых полусинтетических тритерпеноидов, обладающих высокой биологической активностью, уже одобрены в качестве лекарственных средств или находятся на стадии доклинических и клинических испытаний. В последние десять лет активно развивается такое направление модификации пентациклических тритерпеноидов как расширение, сужение или разрыв кольца А с последующей функционализацией полученных продуктов. Интерес к этому направлению органической и медицинской химии обусловлен высокой биологической активностью (в первую очередь противовирусной и цитотоксической) нативных А-секотритерпеноидов и их ничтожно малым содержанием в природных источниках. Значительные успехи в области синтеза 2,3-секопроизводных тритерпеноидов и изучения их биологической активности достигнуты лабораторией биологически активных соединений Института технической химии УрО РАН, возглавляемой В.В.Гришко (научный руководитель диссертантки). Анастасия Владимировна Конышева развивает достигнутые успехи, синтезируя и изучая новые 2,3-секопроизводные тритерпеноидов, в том числе используя их для получения А-пентациклических производных тритерпеноидов, обладающих согласно литературным данным противовирусной и цитотоксической активностями.

Принимая во внимание вышеизложенное, диссертационная работа А.В.Конышевой, посвященная синтезу и превращениям алкилированных 1-циано-2,3-секотритерпеноидов, является актуальной.

Цель диссертационной работы

Разработка методов синтеза и исследование реакционной активности С3 алкилированных 1-циано-2,3-секотритерпеноидов в процессах внутримолекулярной циклизации, оценка противовирусных и цитотоксических свойств продуктов синтеза.

Задачи диссертационной работы

- разработать методы синтеза 1-циано-2,3-секотритерпеновых С3 метилзамещенных производных на основе 3-оксобетулина, метилового эфира бетулоновой кислоты и аллобетулона;
- исследовать процесс внутримолекулярной циклизации 1-циано-2,3-секотритерпеноидных метилкетонов и их производных;

- изучить подходы к введению атома брома в А-2,3-секокольцо тритерпеноидных метилкетонов и возможность последующей функционализации и внутримолекулярной циклизации бромзамещенных тритерпеноидов;
- разработать методы получения 2,3-секо-18 α H-олеананового и 2,3-секолупанового тритерпеноидов с фрагментом этилкетона, их дальнейшей трансформации и циклизации;
- оценить противовирусные и цитотоксические свойства полученных соединений

Структура диссертационной работы и её содержание

Диссертационная работа изложена на 183 страницах машинописного текста, включает 6 таблиц, 18 рисунков, 49 схем и состоит из введения, четырех глав (литературный обзор, обсуждение результатов, биологическая активность синтезированных соединений, экспериментальная часть), заключения и списка цитируемой литературы из 181 наименования.

Первая глава представляет собой обзор литературы, который состоит из трех разделов. Первый раздел содержит информацию о биосинтезе тритерпеноидов с пятичленным циклом А, их распространению в природе и биологической активности. Второй раздел посвящен функционализации природных тритерпеноидов цеанотанового типа. В третьем разделе перечислены направления синтеза А-пентациклических тритерпеноидов.

На основании анализа литературных данных делается вывод о перспективности синтеза А-пентациклических тритерпеноидов как платформы для получения новых биологически активных соединений и плодотворности использования для этого внутримолекулярной циклизации функционализированных 2,3-секотритерпеноидов.

Вторая глава посвящена обсуждению собственных результатов и состоит из четырех разделов.

В первом разделе описано два альтернативных метода синтеза 1-циано-2,3-секо-3-алкил-3-кетонов на каркасе метилового эфира бетулиновой кислоты и аллобетулиновом каркасе. Безусловно приоритетным является трехстадийный подход, основанный на алкилировании в условиях реакции Гриньяра гидроксиминокетонов (α -кетоксимов) **320**, **321** с последующей фрагментацией по Бекману получаемых гидроксиминоспиртов **365-368**. Здесь следует отметить, что из-за стерической загруженности реакционного центра аксиально ориентированными С4 и С10 метильными группами, атака реагентом Гриньяра возможна только в α -положение, что в итоге и приводит к аксиально-ориентированной С3 алкильной группе оксимов **365-368**.

Во втором разделе описана внутримолекулярная оксонитрильная циклизация полученных 1-циано-2,3-секо-3-алкил-3-кетонов, протекающая с образованием А-пентациклических α,β -алкеннитрилов на каркасе бетулина, аллобетулина и эфиров бетулиновой кислоты. Здесь следует отметить, что более высокая электрофильность карбонильной группы по сравнению с нитрильной обеспечивает хемоселективность реакции. Далее диссертантка описывает как она получала А-пентациклические α,β -алкеннитрильные производные метилового эфира бетулиновой кислоты с С20 кетонной и С30 альдегидной группами в две стадии, сначала окислив изопропилиденный фрагмент цикла Е 1-циано-2,3-секо-3-алкилкетонов **361**, **369** озоном или селенистой кислотой, а затем проведя оксо-нитрильную циклизацию. На возникший у оппонента вопрос – а зачем такие сложности, ведь можно всё провести напрямую? – на стр. 81 диссертантка тут же отвечает – да, да, да, конечно же можно! И дальше описывает как она напрямую окисляла этими же реагентами изопропилиденный фрагмент готовых А-пентациклических α,β -алкеннитрилов **378-380**.

В третьем разделе описан синтез и внутримолекулярная циклизация 1-циано-2,3-секо-3-бромметил-3-кетон. Бромирование 1-циано-2,3-секо-3-алкил-3-кетон, проведенное эквимолярным количеством пиридиния пербромидом при комнатной температуре привело селективно к α -монобромпроизводным. Здесь всё штатно. А вот внутримолекулярная циклизация полученных бромзамещенных 3-алкил-3-кетон в тех же самых условиях, что и в случае их не бромированных аналогов **361**, **362**, **369**, **370**, **378**, то есть при использовании системы *t*-BuOK/*t*-BuOH, привела к неожиданному результату. Вместо А-пентациклических алкеннитрилов образовались А-циклогекс-1-ен-3-кетон **402** и **403**. В тоже время, использование системы KOH/EtOH привело к ожидаемым А-пентациклическим γ -гидроксиалкеннитрилам.

В этом же разделе описывается двухстадийное получение из 1-циано-2,3-секо-3-бромметил-3-кетон **396** интересного для последующей модификации А-пентациклического 1β -циано- 3β -гидрокси- 3α -гидроксиметильного производного аллобетулина **408**.

В четвертом разделе описаны химические превращения 3-гидрокси-3-метил-1-циано-19 β ,28-эпокси-2,3-секо-2-нор-18 α H-олеанана **360a**, полученного восстановлением борогидридом натрия 2,3-секо-аллобетулинового метилкетон **362**. Кстати, в первом разделе уже был описан его синтез магниорганикой из 2,3-секо-3-альдо-1-нитрилов **326**, **327**, который сложнее в смысле многостадийности (если считать от стартовых α -оксокетоксимов **320**, **321**) и приводил к смеси диастереомеров, тогда как сейчас был получен индивидуальный 3(*R*) диастереомер **360a**. Среди полученной в этом разделе серии интересных продуктов превращений **360a** обращает на себя внимание его внутримолекулярная циклизация, проходившая с замыканием шести- или семичленного кольца А. Так, в индивидуальном виде с выходами 13-78% были получены 2-оксо-3,3-диметил-4-метиленициклогексановое **416** и 2-оксо-3,3,4-триметил-циклогекс-4-еновое производные аллобетулина **417**, а также диастереомерные А-семичленные лактоны **418** и **419**. Один из вероятных механизмов образования смеси перечисленных продуктов, представленный на схеме 49, принципиальных возражений не вызывает.

Подводя итог рассмотрения синтетической части диссертационной работы, оппонент отмечает высокую квалификацию диссертантки, проявившуюся в тщательном планировании и проведении синтезов, о сложности которых свидетельствуют объемные реакционные схемы; в умелой оптимизации условий ряда известных реакций и кропотливом хроматографировании реакционных смесей. Успешно выполнена большая экспериментальная работа – не считая получения уже описанных соединений, всего А.В.Коньшевой было синтезировано 64 ранее не известных терпеноида. Структура всех их была строго установлена комплексом корреляционных методов спектроскопии ЯМР, ИК спектроскопией и монокристалльным методом РСА. Работа написана грамотным химическим языком с минимумом описок и погрешностей в терминах. Очень помогает в знакомстве с материалом диссертации указание в каждом из её подразделов ссылок на свои статьи, в которых написанный материал был опубликован. Кстати о ссылках на собственные работы. Оппонент с улыбкой отмечает, что если обычно сначала пишется глава литературного обзора, а потом она публикуется в каком-либо обзорном журнале, то в данном случае значительная часть литературного обзора диссертации представляет собой обзорную статью диссертантки и её руководителя, опубликованную 8 лет назад в журнале Chem. Nat. Comp. **2015**, 51 (1), 1-21.

Третья глава посвящена изучению противовирусной и цитотоксической активности синтезированных соединений. Проведенный *in vitro* скрининг определил единственное соединение-лидер **362** (1-циано-2,3-секо-3-метил-3-кетон аллобетулина), показавший

более-менее приличную (EC_{50} 15.4 мкМ) противовирусную активность в отношении ВИЧ-1 и умеренную (EC_{50} 45.1 мкМ) противовирусную активность в отношении вируса герпеса простого I типа. Что касается цитотоксической активности в отношении выбранных линий раковых клеток человека, то здесь «урожай» был существенно богаче. Наиболее активными соединениями оказались **393** (IC_{50} 1.4-6.4 мкМ), **397** (IC_{50} 0.8-3.0 мкМ), **401** (IC_{50} 2.9-7.3 мкМ). В качестве соединения-лидера было выбрано соединение **397**, показавшее высокую цитотоксичность в отношении раковых клеток с множественной лекарственной устойчивостью. Было установлено, что соединение-лидер **397** вызывает апоптоз, индуцируя действие каспаз 8, 3/7 не вызывая нарушение проницаемости митохондриальной мембраны.

Подводя итог рассмотрения биологической части диссертационной работы, оппонент особо отмечает тщательно проведенный диссертанткой анализ структура-активность огромного массива полученных данных, который позволил ей сделать следующий глобальный вывод: ключевую роль в проявлении тритерпеноидами активности оказывает фрагмент метилкетона в положении C3 2,3-секокольца A или фрагмент алкеннитрила в пятичленном цикле A; при этом реализация противовирусных свойств обеспечивается в большей степени в случае 18 α H-олеанановых структур, в то время как лупановый тип тритерпеноидного каркаса с альдегидной группой в положении C30 способствует проявлению цитотоксических свойств.

Четвертая глава (экспериментальная часть) содержит сведения о методиках синтеза и свойствах полученных соединений. В главе приведено также подробное описание биологических экспериментов. Оппонент особо отмечает тщательность написания синтетической части главы и, в первую очередь, приписание в спектрах ЯМР хим. сдвигов всех ядер. Очень помогает рассмотрению данных спектров ЯМР наличие в экспериментальной главе структурных формул описываемых соединений с нумерацией всех атомов.

Выводы диссертации базируются на большом экспериментальном материале и являются обоснованными и достоверными

Научная новизна и практическая значимость диссертационной работы

Синтезированы 64 новых тритерпеноида бетулинового и аллобетулинового рядов со структурно модифицированным циклом A.

Разработаны новые способы получения 1-циано-2,3-секо-3-оксопроизводных пентациклических тритерпеноидов лупанового и олеананового рядов. Впервые проведена их внутримолекулярная оксонитрильная циклизация, позволившая получить неизвестные ранее A-пентациклические α,β -алкеннитрилы лупанового и олеананового рядов. Впервые проведена внутримолекулярная циклизация 1-циано-2,3-секо-3-гидроксипроизводного аллобетулина, позволившая получить его неизвестные ранее производные с 2-оксо-3,3-диметил-4-метиленциклогексановым, 2-оксо-3,3-диметилциклогек-4-еновым и гепталактонным циклом A.

Разработаны методы синтеза и селективной внутримолекулярной нитрил-анионной циклизации 2,3-секо-18 α H-олеанановых этилкетона и его α -бромзамещенного производного. Экспериментально показано, что C1-C3 циклизация этилкетона протекает по оксонитрильному пути с образованием фрагмента 3-этилзамещенного α,β -алкеннитрила в пятичленном цикле A, тогда как его бромпроизводное подвергается нитрил-анионной C1-C31 циклизации с отщеплением циано-группы и образованием фрагмента 2-метилзамещенного алкенкетона в шестициленном цикле A.

Скрининг *in vitro* противовирусной активности и цитотоксичности в отношении линий раковых клеток человека синтезированной библиотеки неизвестных ранее тритерпеноидов лупанового и олеананового рядов и последующий SAR-анализ полученных результатов позволил сформулировать необходимые для дальнейших исследований основные закономерности влияния структурной модификации цикла А лупанового и олеананового каркасов на противовирусную и цитотоксическую активности. Выявлено соединение-лидер **397**, продемонстрировавшее высокую (IC_{50} 0.8-3.0 мкМ) цитотоксичность в отношении раковых клеток с множественной лекарственной устойчивостью, что показывает перспективность функционализации 1-циано-2,3-секо-А и изопропилиденового фрагментов эфиров бетулиновой кислоты для поиска более эффективных противораковых агентов в ряду тритерпеноидов.

Соответствие диссертационной работы заявленной специальности

Тема и содержание диссертационной работы соответствует заявляемой специальности 1.4.3. - Органическая химия. В ходе выполнения диссертационной работы А.В.Коньшева разработала новые методы синтеза, синтезировала и охарактеризовала неизвестные ранее соединения, определила их биологическую активность, что соответствует пункту 1 «Выделение и очистка новых соединений», пункту 2 «Открытие новых реакций органических соединений и методов их исследования», пункту 3 «Развитие рациональных путей синтеза сложных молекул», пункту 7 «Выявление закономерностей типа «структура – свойство» Паспорта специальности 1.4.3. - Органическая химия ВАК Министерства образования и науки РФ. Отрасль науки – Химические науки.

Замечания по диссертационной работе

- 1) Механизм, предлагаемый диссертанткой на схеме 45 для объяснения необычного течения циклизации при использовании смеси *t*-BuOK/*t*-BuOH представляется оппоненту надуманным и уж тем более не объясняющим почему далеко не драматичная замена одной щелочи на другую привела к наблюдаемым серьёзным последствиям. Не проясняет эту ситуацию и обзор Ф.Флеминга и Ж.Жанга (*Tetrahedron* **2005**, 4 (61), 747-789) в части обсуждаемой в нем на стр. 774-776 стереоселективной циклизации алканнитрилов, который диссертантка привлекла для обоснования предложенного на схеме 45 механизма образования А-циклогекс-1-ен-3-кетонов **402** и **403**.
- 2) Как понимает оппонент, вирулицидное действие – это инактивация вируса не в организме человека, а вне его, то есть на всяких поверхностях. Существует масса разнообразных и, что самое важное, дешевых дезинфектантов и антисептиков, в первую очередь всяких спиртосодержащих жидкостей, которые прекрасно дезактивируют вирусы, в которых капсид окружен липидной оболочкой. А это, между прочим, смертельно опасные для человека ВИЧ, коронавирусы и просто неприятные вирусы гриппа, герпеса и многие другие РНК-вирусы. Спрашивается в задаче – зачем тратить время и деньги на поиск дезинфектантов среди веществ, получение которых не технологично и самое главное дорого? Это оппонент про некоторые из синтезированных соединений, например, **372**, **375**, **381** и др.
- 3) В разделе обсуждения противовирусной активности для порядка следовало бы привести данные для референсных соединений.
- 4) Вызывает удивление, что для 43-х из 64-х впервые синтезированных соединений отсутствуют данные масс-спектрометрии, которая является единственным инструментальным методом, напрямую свидетельствующим об индивидуальности

полученного соединения. Кроме того, в тех случаях, когда экспериментальные значения m/z приведены, отсутствуют брутто формула и теоретическое значение m/z .

5) На стр. 73 кетоксимамам **320**, **321** приписаны номера **365-368**.

6) Правильное название бромирующего реагента и его формула на стр 83 – это пиридиний пербромид $C_5H_6N^{+}Br_3^{-}$.

7) На стр. 93 для лактона **419** вместо странного термина «оппозитный» следовало написать диастереомерный.

Сделанные замечания не затрагивают сущности диссертационной работы, достоверности полученных результатов, обоснованности выводов и никоим образом не влияют на высокую оценку рецензируемой работы оппонентом.

Достоверность полученных результатов

Достоверность полученных результатов и обоснованность сделанных на их основе выводов не вызывает сомнений. Строение и структура всех синтезированных соединений установлены методами спектроскопии ЯМР и ИК спектроскопией, а в ряде принципиальных случаев монокристалльным методом РСА и хромато-масс-спектрометрией.

Апробация полученных результатов, публикации и автореферат диссертации

Результаты исследований доложены на IX Всероссийской конференции «Химия и медицина» (Уфа, 2013); X и XII International symposium on the chemistry of natural compounds (Bukhara, 2013; Tashkent, 2017); Уральском научном форуме «Современные проблемы органической химии», XVII Молодежной школе-конференции по органической химии (Екатеринбург, 2014); V Международной конференции «Техническая химия. От теории к практике» (Пермь, 2016); Кластере конференций по органической химии «ОргХим-2016» (Санкт-Петербург, 2016); X Всероссийской научной конференции и школы молодых ученых «Химия и технология растительных веществ» (Казань, 2017); V Всероссийской конференции с международным участием «Енамины в органическом синтезе» (Пермь, 2017); II Международной научной конференции «Высокие технологии, определяющие качество жизни» (Пермь, 2018); XI Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия 2019» (Пермь, 2019).

Материалы диссертационной работы **Анастасии Владимировны Конышевой** полностью представлены в одной монографии, 11 статьях, рекомендованных ВАК РФ и входящих в базы данных Web of Science и Scopus, в двух патентах РФ, а также в тезисах 10 докладов на всероссийских и международных конференциях.

Автореферат и публикации полно и правильно отражают содержание диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа **Анастасии Владимировны Конышевой** является актуальной, цельной, законченной научно-квалификационной работой, направленной на решение важнейшей задачи органической химии – разработка методов синтеза и синтез новых биологически активных соединений. Работа выполнена на высоком профессиональном уровне. Цель работы достигнута, а соответствующие ей задачи полностью выполнены. Результаты работы изложены чётко и ясно. Сделанные выводы

обоснованы и подтверждаются полученными экспериментальными данными. Диссертация написана хорошим научным языком и красиво оформлена.

По актуальности поставленных задач, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов диссертационная работа, представленная **Анастасией Владимировной Конышевой**, полностью соответствует требованиям п. 9 Положения о присуждении ученых степеней в УрФУ, а её автор **Анастасия Владимировна Конышева** заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3 – Органическая химия.

Официальный оппонент:

11 мая 2023 г.

Катаев Владимир Евгеньевич,

доктор химических наук (специальность 1.4.3. – Органическая химия), профессор (специальность 1.4.3. – Органическая химия), главный научный сотрудник лаборатории фосфорсодержащих аналогов природных соединений Института органической и физической химии им. А. Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук».

E-mail: kataev57@yandex.ru

тел. (843) 273-93-65

Почтовый адрес:

420088, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Академика Арбузова, 8, ИОФХ им. А.Е.Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН

Факс: (843) 273-18-72

Телефон: +7(843) 273-93-65

E-mail: arbuzov@iopc.ru

<http://www.iopc.ru>

Подпись Катаев В.Е.
ЗАБЕРЯЮ

В.Е.