

**ОТЗЫВ**  
**официального оппонента Яровой Ольги Ивановны на диссертацию**  
**Агафоновой Натальи Анатольевны на тему**  
**«Синтез биоактивных полифторалкилсодержащих пиразолов»,**  
**представленную на соискание ученой степени кандидата**  
**химических наук**  
**по специальности 1.4.3. Органическая химия**

**Актуальность работы**

Важной и актуальной задачей современной органической и медицинской химии является направленный синтез соединений с полезными фармакологическими свойствами, а также установление взаимосвязи между этими свойствами и структурой полученных веществ. В частности, разработка новых анальгетиков и противовоспалительных агентов представляет собой актуальную прикладную задачу, учитывая растущую медицинскую проблему инфекционных заболеваний. Диссертационная работа Агафоновой Натальи Анатольевны, посвященная разработке методов региоселективного синтеза полифторалкилсодержащих пиразолов и изучению их биологической активности, несомненно обладает высокой важностью и актуальностью.

**Целью** представленной диссертационной работы являлась разработка методов синтеза и модификации полифторалкилсодержащих пиразолов для получения новых производных с различными типами биологического действия. Следует сразу отметить, что поставленные автором задачи, а именно: разработка методов региоселективного *N*- и *O*-алкилирования 3-полифторалкилпиразол-5-олов для синтеза аналогов антипирина и целекоксиба как потенциальных анальгезирующих агентов; разработка на основе полифторалкилсодержащих 4-гидроксиимино-, 4-нитрозо- и 4-нитропиразолов подходов к получению 4-аминопиразолов и изучение биологического действия синтезированных соединений с выявлением закономерностей структура-активность синтезированных производных были успешно реализованы.

Рецензируемая работа изложена на 193 страницах, она включает 15 таблиц, 78 рисунков и 164 схемы. Список цитируемых трудов содержит 214 литературных источников. Работа построена традиционным образом, последовательно включая введение, аналитический обзор литературных данных, результаты синтетических исследований и их обсуждение, экспериментальную часть, заключение и список литературы.

Во «**Введении**» автор определяет актуальность и цели поставленного исследования, а также кратко охарактеризовывает полученные результаты, составляющие научную новизну и практическую значимость работы. **Литературный обзор** логично построен, написан хорошим языком, дает достаточно полное представление об изучаемой проблеме за последние двадцать лет. Целью обзора являлось обобщение современных сведений о синтезе полифторалкилсодержащих пиразолов, их химических трансформациях по *N*- и *O*-центрам, получении 4-аминопиразолов и биологической активности производных. Приведенный в работе Н.А. Агафоновой обзор литературы позволил убедиться в том, что автор прекрасно ориентируется в методиках синтеза и химической модификации фторсодержащих пиразолов. В большинстве случаев автор указывает особенности проведения изученных ранее реакций и отмечает выходы описанных превращений.

**Научная новизна**

Диссертационная работа Агафоновой Н.А. содержит все элементы научной новизны. В работе предложены удобные подходы к *N*- и *O*-модификации полифторалкилпиразолов, а также способы введения различных азотсодержащих

группировок по их положению С4. В результате исследования новых синтезированных соединений обнаружены ряды физиологически активных веществ.

**Обсуждение собственных результатов** приводится автором в основной части диссертационного исследования и данный раздел разделен на несколько глав. Формально всю работу можно разделить на значительную синтетическую работу и на анализ данных, полученных при изучении биологических свойств описанных соединений. Так, в первой части обсуждения результатов, автор описывает синтез 3-полифторалкилпиразол-5-олов и исследование их строения. Синтетические трансформации сгруппированы в общие схемы и за лаконичностью текста видна большая синтетическая работа исследователя. Значительное внимание в работе уделяется квантово-химическому исследованию, позволяющему оценить соотношение таутомерных форм 1-арил-3-полифторалкилпиразол-5-олов и анализу физико-химических характеристик указанных соединений. Изучена региоселективность алкилирования и аминометилидирования 1-арил-3-полифторалкилпиразол-5-олов и 3-трифторметилпиразол-5-ола.

Следующий значительный раздел, обобщающий собственные результаты, посвящен синтезу фторированных аналогов *антитирина* и *целебрекса* на основе 3-полифторалкилпиразол-5-олов. Проведен поиск оптимальных условий для хемоселективного *N*- и *O*-метилирования 3-трифторметил-1-фенилпиразол-5-ола как модельной реакции. Использование современных методов квантово-химических расчетов позволило объяснить зависимость направления реакций *N*- и *O*-метилирования. Важно отметить, что Наталье Анатольевне во время работы над диссертационным исследованием, удалось получить значительное количество соединений в форме, пригодной для проведения рентгеноструктурного исследования. Представленные в работе данные РСА значительно украшают манускрипт и добавляют научную достоверность результатов.

Для синтеза 4-нитрозо-3-трифторметилпиразолов диссертантом предложены альтернативные подходы. В качестве оптимальных были выбраны однореакторные методики синтеза: циклизация соответствующих 3-оксоэфиров с гидразинами и нитрозирование – для 4-гидроксииминопиразол-3-онов, последовательное нитрозирование 1,3-дикетонов или их литиевых солей и конденсация с гидразинами – для 4-нитрозопиразолов. Далее для полученных производных описаны способы восстановления их гидроксиимино- и нитрозогрупп до аминофункций. Следует отметить, что 4-аминопиразолы получены как в виде оснований, так и гидрохлоридов. Для последних реализованы реакции с альдегидами с получением азометиновых производных пиразолов. С помощью реакции с фенилизоцианатом введен фрагмент тиомочевины. Показано, что при метилировании диметилсульфатом образуется диметиламинопроизводное пиразола. Полученные структуры имеют большой потенциал для дальнейших биологических испытаний.

Следующий большой раздел обсуждения результатов посвящен анализу биологической активности синтезированных в работе новых веществ. Поскольку синтезированные в работе производные пиразола во многих случаях представляют собой аналоги анальгетиков, усилия Агафоновой Н.А. в соавторстве с фармакологами были сосредоточены на исследовании их анальгетической и противовоспалительной активности. В первую очередь, что очень логично, авторы изучили острую токсичность исследуемых соединений; в работе проводится изучение связи строения фторированных пиразолов с проявляемыми токсическими свойствами *in vivo*. Было показано, что MeN- и AlkO-производные пиразолов обладают умеренной токсичностью и пригодны для дальнейших исследований. Проведенные масштабные исследования в teste «горячая платина» и оценка противовоспалительного действия на модели каррагенинового отека лапки крыс линии SD позволили выбрать агент 2.4а в качестве соединения-лидера. Для указанного вещества было проведено более глубокое исследование биологической активности. Далее автор приводит данные об антибактериальной и антимикотической

активности синтезированных соединений. Установлено, что протестированные пиразолы проявляют от умеренной до высокой туберкулостатической активности. Проведена оценка противогрибковой активности соединений, выявлены перспективные агенты. Изучена цитотоксическая активность 4-нитрозопиразолов в отношении опухолевых клеток HeLa по сравнению с активностью в отношении нормальных фибробластов человека.

В экспериментальной части диссертационного исследования приведены спектральные характеристики более 120 новых соединений, что подтверждает большой объем синтетической работы соискателя по поиску новых агентов. Строение выделенных автором веществ подтверждено методами  $H^1$  и  $F^{19}$  ЯМР, ИК и элементным анализом. Полученные соискателем экспериментальные данные достоверны.

**Достоверность полученных результатов** гарантирована применением современных методов физико-химического исследования структур органических соединений, включающих ЯМР и ИК-спектроскопию, масс-спектрометрию, газово-жидкостную хроматографию, рентгеноструктурный анализ, элементный анализ, квантово-химические расчетные методы, а также широко используемые методы биологического тестирования.

**Практическая значимость** заключается в разработке методов синтеза новых N-метил- и O-алкилпроизводных, среди которых найдены соединения с высокой анальгетической активностью при умеренной острой токсичностью. Предложены доступные методы получения 4-гидроксиимино-, 4-нитрозо-, 4-нитро- и 4-аминопиразолов и их производных, среди которых обнаружены соединения, обладающие различными типами биологической активности в зависимости от природы заместителей пиразольного цикла.

### **Замечания**

В работе отсутствуют ошибки, которые могли бы сказать на обоснованности выводов и заключений, сделанных диссертантом. В то же время некоторые замечания, касающиеся оформления работы, необходимо отметить.

1. На стр. 24 написано «Под действием цинка в кислых условиях осуществлено регоселективное бензилирование 5-метил-4-нитро-3-(трифторметил)пиразола **1.132** с получением продукта **1.133** (схема 1.39). В тоже время на схеме изображены условия в виде добавления в систему карбоната цезия в ацетонитриле. Указанные условия не могут дать кислые условия.
2. Часть литературного обзора, посвященная биологическим свойствам, написана в общем виде, в большинстве случаев без приведения конкретных биологических данных. В некоторых случаях, приведенные данные вызывают вопросы, так на стр. 44 написано, что «N-Карбониламинотиазольные производные 5-метил-3-трифторметилпиразолов **1.252** показали хорошую фунгицидную активность в концентрации 50 мг/мл». В то время как в оригинальной работе авторы приводят данные в мкг/мл (в работе  $\mu$ g/ml).
3. Неудачная фраза на стр. 49 «N-Гликозид-производные 4-арилгидразоно-5-трифторметилпиразолонов **1.269** оказались активными **против размножения** раковых клеток человека HL60 и мышей EL4»
4. На стр. 54 автор приводит английские выражения без перевода на русский язык, что не корректно: «Ингибирующая активность non-substrate-like соединений **1.289** в отношении  $\alpha$ -1,4-галактозилтрансферазы LgtC сопоставима с наиболее мощными substrate-based ингибиторами этого фермента». У этих терминов есть русские аналоги.
5. В обсуждении собственных результатов значительная часть посвящена квантово-химическим расчетам, например, данным по свободной энергии Гиббса в газовой фазе или в растворителях и индексам Фукуи. В экспериментальной части описаны методы, которые использовались для проведения этих расчетов, что очень важно. В

то же время, автор во введении указывает благодарность сотрудникам Уфимский институт химии РАН д.х.н. Хурсану С.Л., к.х.н. Борисевич С.С. за выполнение квантово-химических расчетов. Остается не понятным, эти результаты были получены автором работы самостоятельно или сделаны совместно? Возможно, в тексте диссертационного исследования стоило уточнить этот момент.

6. Не удачная фраза на стр. 77 «Существует **большое число программ дизайна** лекарств, которые используют аминопиразолы в качестве универсальной основы, поэтому в работе уделено большое внимание разработке способов введения этой фармакофорной группы в полифторалкилсодержащие пиразолы различного типа». Что подразумевает автор под фразой *программа дизайна*?
7. В примечании к таблице 2.5 написано «\*\* выход гидроксииминов **2.19** при синтезе в безводной лимонной кислоте», в то время как по методике, приведенной автором понятно, что реакция идет при охлаждении в присутствии лимонной кислоты.
8. Ряд вопросов возникает к части, посвященной описанию биологических свойств новых веществ. Так, в экспериментальной части не приведены описания условий проведения экспериментов *in vivo*, в связи с чем не понятно, сколько животных использовалось в teste «горячая пластина» для каждого вещества. При этом проценты латентного периода увеличения времени приведены с точностью до 1 знака после запятой. Уверены ли исследователи в такой точности эксперимента?
9. Не очень понятен термин «Ожидаемые значения ЛД<sub>50</sub>». Существуют известные протоколы для определения ЛД<sub>50</sub>, возможно, авторам следовало бы воспользоваться именно ими.
10. Данные по оценке противовоспалительной активности соединений, приведенные в табл. 2.7, содержат результаты с точностью до 2 знака после запятой и не имеют доверительного интервала. В то время как для препарата сравнения данные до 1 знака и с интервалом. Если это предварительные данные, не стоило указывать такую точность.
11. На стр. 110 автор пишет фразу «Данные о более значительном анальгетическом эффекте соединения **2.41** были получены непосредственно перед написанием диссертационной работы», не подтверждая ее результатами. Возможно, эту фразу в текст работы не стоило добавлять.
12. Значительная путаница в разделе, посвященном изучению противомикробных свойств, связанная с размерностью. Так, в таблице 2.10 приведены данные в мг/мл, а далее по тексту обсуждаются данные, как в мкг/мл так и в мг/мл. Аналогичная ситуация на стр. 119, размерности в табл. 2.11 не совпадают с тем, что обсуждается в тексте. По-видимому, это опечатки, автору следовало бы более внимательно относиться к размерностям в биологических данных.
13. Результаты по исследованию цитотоксических свойств приведены в мкМ концентрациях, что общепринято. Также в автореферате к диссертации указаны результаты в микромолях, в то время как в тексте автореферата автор пишет «При оценке цитотоксического действия ряда пиразолов *in vitro* обнаружено, что 4-гидроксииминопиразолон **2.15a** имеет IC<sub>50</sub> = 1.26·10<sup>-5</sup> μM в отношении клеток линии HeLa, что на порядок ниже, чем в отношении фибробластов человека (ФБЧ) (IC<sub>50</sub> = 1.21·10<sup>-4</sup> μM)». Кроме того, данные для агента **2.22b** не совпадают в тексте и в таблице.

Сделанные замечания не носят принципиального характера и никак не влияют на общую весьма положительную оценку работы Агафоновой Н.А. Результаты и выводы, сделанные на основании большого и тщательно выполненного эксперимента, не вызывают сомнений и возражений.

Внимательное прочтение диссертационной работы позволяет заключить успешное решение поставленных задач и достижение цели, обозначенной соискателем.

Сформулированные научные положения и выводы являются обоснованными, автореферат диссертации изложен логично и отражает содержание исследования.

### **Заключение**

Диссертационная работа Агафоновой Натальи Анатольевны является тщательно спланированным, цельным исследованием и представляет законченную научно-квалификационную работу. Диссертация и автореферат грамотно написаны и аккуратно оформлены.

По теме диссертации опубликовано 7 статей в международных журналах Изв. РАН. Сер. хим (Russ. Chem. Bull.), Eur. J. Med. Chem., Med. Chem., J. Fluor. Comp., Chem. Heterocycl. Compd., рекомендованных ВАК и Аттестационным советом УрФУ. Работа апробирована на 10 российских и международных конференциях.

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационного исследования, могут быть рекомендованы для применения в научных организациях, работающих в области синтеза и исследования биологически активных веществ: Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, ИНЭОС им. А.Н. Несмеянова РАН, Химический факультет ННГУ им. Н.И. Лобачевского, ИОХ им. Н.Д. Зелинского, ИМХ им. Г.А. Разуваева РАН, ИФАВ РАН, ИБХ РАН, РХТУ им. Д.И. Менделеева, НИОХ СО РАН, УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина и др.

Диссертационная работа Агафоновой Натальи Анатольевны «Синтез биоактивных полифторалкилсодержащих пиразолов» удовлетворяет всем требованиям, установленным п. 9 Положения о присуждении ученых степеней в УрФУ. Представляемая работа соответствует специальности 1.4.3. Органическая химия.

Автор диссертационного исследования «Синтез биоактивных полифторалкилсодержащих пиразолов», Агафонова Наталья Анатольевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3. Органическая химия.

Официальный оппонент:

Доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологически активных веществ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН)

Яровая Ольга Ивановна

Телефон: +7 (383) 330-88-50, e-mail: ooo@nioch.nsc.ru

630090 г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, д. 9

«29 » октября 2021 г.

Подпись д.х.н. О.И. Яровой удостоверяю:

к.х.н., ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук



Бредихин Р.А.  
29.10.2021