

Отзыв

официального оппонента Мамедова Вахида Абдулла оглы
на диссертацию Дрокина Романа Александровича
«4-Гидроксидигидроазоло[5,1-с][1,2,4]триазины: синтез и биологическая активность»,
представленной на соискание учёной степени кандидата химических наук
по специальности 1.4.3. Органическая химия

Азотсодержащие гетероциклические соединения, разнообразные и неоднородные по своей природе, широко распространены в природе и находят свое значение в различных областях синтетической и прикладной органической химии. Однако азолы и азины (в качестве самостоятельных соединений с полифункциональным потенциалом) и их комбинации – конденсированные бигетероциклические системы – занимают особое место в этом комплексе соединений. Возможность объединения нескольких актуальных гетероциклических фрагментов в одной молекуле позволяет создавать структурное разнообразие сочетаний важных систем, необходимых для поиска фактических полезных свойств малых молекул. В этом плане перспективным представляется создание структур на основе гетероциклов, зарекомендовавших себя в качестве молекул с полезными свойствами, например, азолоаннелированных [1,2,4]триазинов как модифицированных структурных аналогов пуриновых оснований. Актуальность такого подхода заключается в возможности объединения свойств отдельных частей молекулы, их преобразования для выявления новых свойств, в том числе практического значения. Благодаря широкой и глубоко укоренившейся биологической активности азоло[5,1-с][1,2,4]триазины вызывают растущий интерес исследователей, работающих в области медицинской химии и фармакологии. Они сходны по структуре с нуклеиновыми основаниями, могут выступать в качестве метаболитов и могут использоваться в качестве противовирусных и противоопухолевых средств. Известно, что пиразолотриазины обладают цитотоксичностью в отношении раковых клеток. Согласно патентным данным, некоторые полизамещенные азоло[5,1-с][1,2,4]триазины избирательно ингибируют активность киназы B-Raf и полезны для лечения заболеваний, опосредованных киназой B-Raf. Кроме того, особый интерес представляют соединения, содержащие нитрогруппу в [1,2,4]триазиновом фрагменте молекулы и обладающие широким спектром противовирусного действия. Представителем этого класса соединений является препарат Триазавирин (натриевая соль дигидрата 6-метилсульфанил-3-нитро[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-4-она), разрешенный к медицинскому применению и используемый для лечения гриппа, ОРВИ, клещевого энцефалита. Поэтому разработка новых методов и синтез новых конденсированных производных 1,2,4-триазина с нитрогруппой и различными электроноакцепторными заместителями в [1,2,4]триазиновом фрагменте молекулы имеет большое значение для медицинской химии.

Работа Р.А. Дрокина посвящена разработке доступных методов синтеза новых азоло[5,1-с][1,2,4]триазинов – класса молекул, представляющих интерес для медицинской химии, изучению возможностей их структурной функционализации, а также исследованию биологической активности полученных соединений.

Таким образом, можно утверждать, что диссертационное исследование Р.А. Дрокина выполнено *на актуальную тему*, отвечает паспорту заявленной специальности (1.4.3. Органическая химия), а положения, выносимые на защиту, соответствуют сформулированной цели и поставленным задачам.

Полученные результаты представляют *научную значимость* не только для химии гетероциклических соединений, но и для фундаментальной органической химии в целом, расширяют наши знания о диазосогетероароматических системах и о реакциях аннелирования, которые занимают особое место среди методов конструирования конденсированных гетероциклических систем, о реакциях нуклеофильного замещения в

ряду гетероциклических систем, которые играют важную роль в функционализации последних.

В результате систематических исследований поведения аминопиразолов и, в большей степени, аминотриазолов в условиях каскадных процессов диазотирования, азосочетания и триазиноаннелирования, а также в результате функционализации с использованием нуклеофилов различной природы, были получены соответствующие продукты азолотриазинового ряда – аналоги *Триазавирина* и 4-арил- и гетарилпроизводных азолотриазинов – и **впервые** для большинства из них была исследована биологическая активность (противовирусная, антигликирующая и антигликоксидационная), что, безусловно, является **значимым вкладом** в развитие знаний не только о механизмах протекания каскадных процессов и о механизме протекания реакции замещения, но и о методах поиска соединений с полезной биологической активностью.

На синтетическую арену выведен целый ряд **новых перспективных ключевых соединений** – различных типов поставщиков двууглеродных фрагментов с электроноакцепторными нитро-, циано- и этоксикарбонильными группами – и с использованием этих соединений разработаны **новые подходы** к синтезу разнообразных конденсированных триазиновых систем, основанные на диазосочетании аминоксолов с различными электронодонорными и электронакцепторными заместителями. В этом состоит основная суть рецензируемой работы и ее ценность.

Диссертация изложена на 144 страницах, состоит из введения, литературного обзора (глава 1, 55 стр.), обсуждения результатов (глава 2, 32 стр.), экспериментальной части (глава 3, 28 стр.), заключения и списка литературы (177 наименований), содержит 118 схем, 10 таблиц, 18 рисунков.

В литературном обзоре (глава 1) обобщены и проанализированы данные по способам синтеза и применению пирроло[2,1-с][1,2,4]триазинов, пиразоло[5,1-с][1,2,4]триазинов, имидазо[5,1-с][1,2,4]триазинов, имидазо[2,1-с][1,2,4]триазинов, 1,2,3-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов, 1,2,4-триазоло[3,4-с][1,2,4]триазинов, 1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов и тетразоло[5,1-с][1,2,4]триазинов, что даёт цельное представление об опубликованных работах в течение последнего десятилетия.

Наиболее лаконичный подход к синтезу азоло[1,2,4]триазиновых каркасов основан на азосочетании солей азолодиазония, генерируемых по реакции Грисса (Griess) или её модификации (с участием *трет*-бутил нитрита), с активными метилен/метановыми соединениями с последующей внутримолекулярной циклизацией промежуточных гидразонов, образующихся по реакции типа Яппа-Клингемана (Japp-Klingemann). [1,2,4]Триазиноаннелирование происходит также через конденсацию соответствующих гидразинопроводных азолов с поставщиками двууглеродного фрагмента (в случаях синтеза пирроло[2,1-с][1,2,4]триазинов, имидазо[2,1-с][1,2,4]триазинов, пиразоло[5,1-с][1,2,4]триазинов и 1,2,4-триазоло[3,4-с][1,2,4]триазинов), внутримолекулярную C–H/N–H функционализацию с образованием связи C–N (в случаях синтеза пиразоло[5,1-с][1,2,4]бензотриазинола и 1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинола), внутримолекулярную циклизацию с участием терминальной NH гидразиновой группы и C≡C связи фенилацетиленового фрагмента (в случае синтеза имидазо[2,1-с][1,2,4]триазинов) и внутримолекулярную циклизацию с участием NH₂ и NO₂ групп с образованием связи N–N (в случае синтеза пиразоло[5,1-с][1,2,4]триазинов). Конструирование азоло[1,2,4]триазинов осуществляется и азолоаннелированием производных [1,2,4]триазинов, что хорошо отработано в случае синтеза разнообразных производных пиразоло[5,1-с][1,2,4]триазинов с варьированием используемого [1,2,4]триазина и аннелирующего реагента. В целом литературный обзор производит благоприятное впечатление, а его выводы обоснованы и подчёркивает целесообразность проведённого автором исследования. Он был бы более ярким, если бы в некоторых случаях приводились бы механизмы протекания реакций. Как раз в связи с этим хотелось бы знать, как протекает экструзии серы с образованием соединений **1.111a,j** из **1.114** и **1.115a,j**? Приведённый в оригинале статьи [ссылка 115]

механизм вызывает сомнение! В ссылке [75] я не нашёл реакцию, приведённую на схеме 1.20.

Во второй главе приводится обсуждение полученных результатов, которые состоит из пяти подразделов, первый из них (раздел 2.1.) посвящён виртуальному скринингу *in silico* 1,4-дигидразоло[5,1-с][1,2,4]триазинов в белки энтеровирусов, ретровирусов, вирусов гриппа, вируса SARS-COV-2. В результате в ходе молекулярного моделирования противовирусной активности соединений дигидразоло[5,1-с]-1,2,4-триазинового ряда диссертантом были выявлены перспективные противовирусные агенты среди 1,4-дигидротриазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов, потенциально активные в отношении вирусов Коксаки В3 и гриппа Р1N1.

Второй раздел (раздел 2.2.) посвящен разработке методов синтеза из нитрометана, соответствующего ортоэфира и морфолина стабильных форм нитрокарбонильных соединений, а именно 1-нитро-2-морфолиноэтилена, 1-нитро-2-морфолинопропил-1-ена и 1-нитро-2-морфолинобутил-1-ена в качестве *in-situ* генерируемых источников натриевых или калиевых солей нитроуксусного альдегида, нитроацетона и 1-нитробутан-2-она. Для демонстрации синтетического потенциала соли нитроацетона использовались в реакции Биджинелли с образованием замещенных дигидропиримидинов с выходами 80-89%, а соли 1-нитробутан-2-она в синтезе 1-(2-фенилгидразоно)-1-нитрокарбониллов. В синтетическом плане важным аспектом работы является оптимизация условий синтеза 4-гидрокси-1,4-дигидразоло[5,1-с][1,2,4]триазинов с использованием солей нитрокарбонильных соединений и пушпульных енаминов. В результате варьирования условий проведения реакции было установлено, что наибольший выход целевых 3-нитро-4-гидрокси-1,4-дигидразоло[5,1-с][1,2,4]триазинов **2.15a-к** достигается при взаимодействии эквимольных количеств 1-нитро-2-морфолиноэтилена (а не соли нитроуксусного альдегида) в ацетонитриле и соли азолилдиазония в избытке соляной кислоты. В зависимости от исходного аминоксолола в данных условиях выход 3-нитро-4-гидрокси-1,4-дигидразоло[5,1-с][1,2,4]триазинов составляет 60-80%. Таким образом, разработан новый метод синтеза 3-нитро-(4-алкил)-4-гидрокси-1,4-дигидразоло[5,1-с][1,2,4]триазинов с использованием солей нитрокарбонильных соединений. Эффективными оказалось азосочетание натриевых солей 1-нитро-2-пропанона и 1-нитро-2-бутанона с 5-диазоксололами в присутствии избытка соляной кислоты в синтезе 4-метил(и этил)-3-нитро-4-гидрокси-1,4-дигидразоло[5,1-с][1,2,4]триазинов **2.16a-l**, полученных с выходами 25-53%. Однако при использовании непосредственно 1-нитро-2-морфолинопропил-1-ена и 1-нитро-2-морфолинобутил-1-ена в качестве синтетических эквивалентов 1-нитро-2-пропанона и 1-нитро-2-бутанона получить целевые структуры не удалось. Не сомневаясь в достоверности полученных данных по синтезу соединений **2.15** и **2.16** (схема 2.5), хотелось бы знать мнение диссертанта о том, например, чем объясняется значительное увеличение выходов для соединений **2.16d**, **2.16e** с метильными группами в положении 4 по сравнению с выходами для соединений **2.15d** и **2.15f** (схема 2.4, метод 1) с атомами водорода в этом положении в реакциях с использованием натриевых солей 1-нитро-2-пропанона и 2-нитроацетальдегида? Как показано на схеме 2.5 азосочетание натриевых солей 1-нитро-2-пропанона **2.5b** и 1-нитро-2-бутанона **2.5c** с 5-диазоксололами **2.14a-h** (0.01 моль) в присутствии избытка соляной кислоты (0.072 моль) приводит к новым 4-метил(и этил)-3-нитро-4-гидрокси-1,4-дигидразоло[5,1-с][1,2,4]триазинов **2.16a-l** с выходом 25-53%. Что из себя представляет оставшиеся в реакционной смеси 47-75%?

Исходя из данных, приведённых в литературном обзоре, и виртуального скрининга диссертантом выявлено, что в поиске биологически активных соединений интерес представляют не только производные азоло[5,1-с][1,2,4]триазинов с нитрогруппой в положении 3, но и соединения, имеющие в качестве заместителя в триазиновом фрагменте другие акцепторные группы, что и явилось объектами синтеза (раздел 2.3) для исследования биологической активности. На основе уже имеющихся данных диссертантом разработан метод синтеза систем, содержащих в положении 3 триазинового цикла нитрильную и

этоксикарбонильную группы с использованием 1-морфолино-2-цианоэтилена и 1-морфолино-2-этоксикарбонилэтилена в качестве поставщиков двууглеродного фрагмента, при этом наибольшие выходы были достигнуты при проведении реакции диазосочетания при $\text{pH} = 0$ в десятикратном избытке соляной кислоты.

На странице 82 (схема 2.10) диссертант рассуждает о механизме реакции замыкания гидразона **2.25**, которая может протекать по двум направлениям с участием того или другого электрофильного реакционного центра (атомы углерода альдегидной группы и нитрильной группы), приводя при этом к соответствующим азолотриазинам **2.20** и **2.24**. Из приведённых на схеме 2.10 стрелок на структуре **2.25** видно, что электрофильные атомы углерода альдегидной и нитрильной группы атакуют атом азота пиррольного типа, что трудно представить. Аналогичное рассуждение повторяется и на странице 14 автореферата (схема 10) и текста к нему. Представление механизма процессов было бы правильным, если бы было изменено направление стрелок и нарисованы другие таутомерные структуры для триазольного кольца в этом промежуточном соединении, так, чтобы в атаке участвовал атом азота пиридинового типа, а не пиррольного, который неспособен не только атаковать, но и подвергаться атаке.

Успешным направлением эксплуатации синтетических возможностей исследуемого класса соединений является, в частности, разработка метода функционализации 3-нитро-4-гидрокси-1,4-дигидроазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов с использованием нуклеофилов π -избыточной ароматической и гетероароматической природы. При этом экспериментально, с использованием специально синтезированного *N*-метилпроизводного – 1-метил-3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-1,4-дигидро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4] триазина (**2.29**), неспособного в исследуемых условиях образовывать 7-(метилтио)-3-нитро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин отщеплением метанола, подтвержден механизм исследуемого превращения $\text{S}_{\text{N}}(\text{E}, \text{A})$ (раздел 2.4.).

Несомненно, представляют определенный интерес изученные в работе реакции восстановления σ^{H} -аддуктов – производных 3-нитро-1,4-дигидро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов **2.26a-f** и 3-нитро-1,4-дигидропиразоло[5,1-с][1,2,4]триазинов **2.27a-f**, которые происходили при использовании шестикратного количества дитионита натрия в присутствии эквимольного количества гидроксида калия в воде в течение 15-20 мин в первом случае и при действии водорода в присутствии 10%-го (по массе) Pd/C (5 мол.%) в метаноле в автоклаве при комнатной температуре и давлении водорода 5–8 бар в течение 4 ч во втором случае. Видимо, такое резкое изменение условий восстановления при переходе от триазолопроизводных **2.26a-f** к пиразолопроизводным **2.27a-f** связано с наличием этоксикарбонильных групп в составе последних. Интересно, как протекает процесс, то есть интересен механизм восстановления дитионитом натрия в присутствии гидроксида калия? Какова роль гидроксида калия в этом процесс? Разве нельзя было провести восстановление дитионитом натрия в органических растворителях?

Другим успешным и очень важным направлением, безусловно и достоинством данной диссертационной работы, является применение виртуального скрининга для направленного поиска новых органических соединений, обладающих биологической активностью (раздел 2.5.). Данный подход позволил выявить в ряду синтезированных соединений несколько потенциальных противовирусных агентов. Однако применение определенных молекулярных мишеней в рамках докинговых исследований зачастую не позволяет обнаружить значительное количество перспективных агентов, которые могут связываться с другими сайтами белка мишени.

В диссертационной работе данные молекулярного докинга были подтверждены в лабораторных экспериментах *in vitro*. Соединения-лидеры проявили высокую противовирусную активность и селективность в отношении вирусных культур, низкую токсичность для культур клеток и умеренную токсичность на млекопитающих. Данные показатели, безусловно, свидетельствуют о перспективности применения этих соединений в качестве новых потенциальных противовирусных агентов. Однако значительно бы

украшили работу исследования фармакокинетики соединений-лидеров в организме млекопитающих.

Таким образом, можно констатировать, что рассматриваемый в диссертации Р.А. Дрокина подход к синтезу азоло[5,1-с][1,2,4]триазин, включающий в себя азосочетание солей азолодиазония, генерируемых по реакции Грисса (Griess), с поставщиками двууглеродных фрагментов, а именно солями нитроуксусного альдегида, α -нитрокетонов, 1-морфолино-2-цианоэтилена и 1-морфолино-2-этоксикарбонилэтилена с последующей внутримолекулярной циклизацией промежуточных гидразонов, образующихся по реакцию типа Яппа-Клингемана (Japp-Klingemann), является простым и удобным синтетическим подходом для получения большого ряда производных азоло[5,1-с][1,2,4]триазинов. В зависимости от применяемого 5-диазоазола каскадный процесс идёт с образованием 1,4-дигидропиразоло-[5,1-с][1,2,4]триазинов или 1,4-дигидро-1,2,4-триазолоазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов.

При изучении *значимых для практики аспектов синтезированных* 4-гидрокси-1,4-дигидроазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов, а именно 3-нитро-4-гидрокси-1,4-дигидро-7-пропаргилтио-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазина **2.15k**, 3-нитро-4-гидрокси-1,4-дигидро-7-этилтио-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазина **2.15i** и 3-циано-4-гидрокси-1,4-дигидро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазина **2.20a** выявлено, что первые два из них обладают выраженным противовирусным действием в отношении энтеровируса Коксаки группы В3, размножающегося в клетках миокарда и вызывающего миокардиты у человека, а третье проявляет высокую антигликирующую и антигликоксидационную активность, превосходя аминогуанидин и эпросартан.

Полученные соискателем экспериментальные данные *достоверны*. Достоверность полученных данных подтверждена применением комплекса современных физико-химических методов исследования, в том числе ИК- и ^1H , ^{13}C и ^{19}F ЯМР-спектральных методов и в ряде случаев рентгеноструктурного анализа, а также публикацией результатов исследования в рецензируемых научных изданиях. Указанные в экспериментальной части методики синтезов составлены грамотно, в соответствии с требованиями, предъявляемыми международными научными изданиями. Контроль чистоты соединений осуществляли при помощи ТСХ на пластинках Silufol UV-254. Эксперимент описан в объеме, достаточном для воспроизведения грамотным синтетиком. Обсуждение результатов проведено квалифицированно, что гарантирует *надежность* как полученных результатов, так и выводов, сделанных на их основе. Вероятность плагиата полностью исключена. Заключение носит обобщающий характер.

Небольшие замечания по описанию ЯМР спектров:

Относительно описания спектров ЯМР ^1H и ^{13}C : практически все синтезированные целевые соединения (кроме исходных соединений для них) – производные 3,4-дигидропиримидин-2(1H)-она, 1,4-дигидро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазина и 1,4-дигидропиразоло[5,1-с][1,2,4]триазина – содержат в своём составе асимметрический атом углерода в положении 4, что делает неэквивалентными протоны метиленовых фрагментов в этильных (в соединениях **2.8c,f**, **2.16g-l**), этоксикарбонильных (в соединениях **2.15d,h**, **2.16f,j,l**, **2.20d,h**, **2.21a-g**, **2.27a,b**, **2.27e,f**, **2.31b,c,f**, **2.33b,c,f**), этилтионильных (в соединениях **2.15i**, **2.20i**, **2.21f**) группах, поэтому протоны метильной группы желательно охарактеризовать как “дд” с очень близкими константами, а не “т” с одинаковыми константами, протоны же метиленовой группы в данном случае желательно охарактеризовать как “м”, а не “кв”. В этих случаях протоны CH_2CH_3 составляют АВХ₃ систему, а не А₂В₃.

Для всех азоло[5,1-с][1,2,4]триазинов (до окисления) присутствуют два характеристичных сигнала протонов фрагмента $\text{C}^4\text{H}-\text{OH}$ триазинового кольца в областях 6.0–6.8 и 7.5–8.8 м.д. от СН и ОН группы соответственно в виде дублетов с константой в большинстве случаев $J = 8.0$ Гц, а для соединения **2.20g** $J = 4.0$ Гц. Чем объясняется это разница в константах? В спектрах ЯМР ^{13}C соединения **2.20g** не хватает сигнала для одного

углерода, по-видимому, для CN группы. Чем объясняется идентичность данных спектров ЯМР ^{13}C соединений **2.15g** и **2.20g**?

Для однотипных соединений 3-нитро-4-(замещённых)-7-метилтио-1,4-дигидро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов (**2.26a,b**, **2.34b**, **2.35b**, **2.36b**, **2.37b**) сигналы протонов метилтиогруппы для первых четырёх соединений резонируют в области 2.44 ± 2 м.д., а для соединения **2.37b** в области 3.20 м.д. Чем вызвана такое большое отличие химического сдвига протонов метилтиогруппы в последнем случае?

Данные замечания и приведённые по тексту *не носят* принципиального характера, хотя и могут служить предметом конструктивной дискуссии. Замечания *не отражаются* на оценке диссертации в целом.

Представленная на отзыв диссертационная работа удовлетворяет критериям *актуальности, научной новизны и практической* значимости.

Основные результаты работы изложены в семи статьях в рецензируемых научных журналах, определенных ВАК РФ и Аттестационным советом УрФУ и входящих в международные базы Scopus и Web of Science, а также в восьми тезисов и материалов докладов на всероссийских и международных конференциях, в 2-х патентах РФ на изобретения.

Автореферат и рукопись диссертации оформлены *в соответствии* с требованиями и стандартами, указанными в Положении о присуждении ученых степеней, утверждённом постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842. Автореферат *отражает* содержание рукописи.

Резюме: диссертационная работа Дрокина Романа Александровича «4-Гидроксид-1,4-дигидроазоло[5,1-с][1,2,4]триазины: синтез и биологическая активность», полностью соответствует требованиям п. 9 Положения о присуждении ученых степеней в УрФУ, предъявляем к кандидатским диссертациям, а ее автор – Роман Александрович Дрокин, безусловно, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3 – органическая химия.

Официальный оппонент:

Доктор химических наук (специальность 02.00.03 – Органическая химия),
Профессор, заведующий лабораторией Химии гетероциклических соединений Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения ФГБУН ФИЦ КазНЦ РАН

Мамедов Вахид Абдулла оглы

E-mail: mamedov@iopc.ru

Тел. +7 843 2727304

420088, г. Казань, ул. Арбузова, 8

«03» ноября 2022 г.

