

ОТЗЫВ



Ведущей организации на диссертационную работу АГАРКОВА АРТЕМА СЕРГЕЕВИЧА «2-ЗАМЕЩЕННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ТИАЗОЛО[3,2-*a*]ПИРИМИДИНА: СИНТЕЗ, СТРУКТУРА, ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3 – Органическая химия.

Диссертационная работа Агаркова Артема Сергеевича посвящена разработке методов получения 2-замещенных тиазоло[3,2-*a*]пиримидинов, которые помимо огромного синтетического потенциала, являются перспективными лекарственными кандидатами, в том числе для получения противораковых препаратов, вследствие структурного подобия к такому основанию нуклеиновых кислот, как пурин. При этом направленная структурная модификация тиазоло[3,2-*a*]пиримидинов может быть эффективно использована для моделирования биологической активности, влияния на процесс связывания данного лиганда с активным центром биомишени. В этой связи особый интерес представляют оптически-активные, в идеале полученные в виде индивидуального стереоизомера, производные тиазоло[3,2-*a*]пиримидинов. Если говорить о взаимодействии природных и синтетических биоактивных соединений/лекарственных кандидатов с биомишенями *in vivo*, то определяющую роль в такого рода процессах играют нековалентные взаимодействия. Также нековалентные взаимодействия могут влиять на эффективность процессов обогащения рацемических смесей, процессов кристаллизации и т.д. В связи с вышеизложенным, синтез новых производных тиазоло[3,2-*a*]пиримидина, включая получение энантиочистых стереоизомеров путем разделения рацемических смесей, а также изучение строения и биологической активности полученных соединений является весьма актуальным. В свою очередь это отвечает основным направлениям стратегии НТР РФ, в частности разделам: а) (переход к передовым цифровым, интеллектуальным производственным технологиям, роботизированным системам, новым материалам...), в) (переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения ...), а также разделу з) (исследования в области понимания процессов, происходящих в обществе и природе, развития природоподобных технологий....).

Структура диссертации

Построение диссертационной работы традиционное: диссертация изложена на 174 листах, содержит 29 таблиц, 53 схемы, 86 рисунков, и состоит из введения, литературного обзора, обсуждения полученных диссертантом результатов, включая исследование биологической активности полученных соединений, экспериментальной части, содержащей описания методов синтеза и анализа строения полученных соединений, заключения, списка литературы, который состоит из 186 ссылок на российские и зарубежные источники.

Литературный обзор к диссертации цитирует 117 источников и содержит данные по синтезу тиазоло[3,2-*a*]пиримидина и 2-замещенных производных тиазоло[3,2-*a*]пиримидина, химическим свойствам 2-арилметиленовых производных тиазоло[3,2-*a*]пиримидина и биологической активности производных тиазоло[3,2-*a*]пиримидина, среди которых найдены производные, обладающие противоопухолевой антибактериальной и противовоспалительной активностями. При этом диссертантом подчеркивается, что в подавляющем числе случаев полученные тиазоло[3,2-*a*]пиримидины, содержащие асимметрические атомы углерода, были изучены в виде рацемической смеси в растворе и в кристаллической фазе, за исключением одного (!) примера получения энантиоцистых производных. На основании данных литературного обзора диссертантом сделано обоснование актуальности работы, а также сформулированы основные направления развития диссертационного исследования.

Вторая глава диссертации посвящена собственным результатам диссертанта и посвящена синтезу исходных 1,2,3,4-тетрагидропиримидин-2-тионов, тиазоло[3,2-*a*]пиримидинов на их основе, изучению химических трансформаций последних, исследованию структуры 2-арилметиленовых производных тиазоло[3,2-*a*]пиримидина в кристаллической фазе, и, наконец, оценке биоактивности синтезированных соединений. Для синтеза исходных 1,2,3,4-тетрагидропиримидин-2-тионов диссертантом был эффективно использован наиболее простой и эффективный путь синтеза, а именно конденсация Биджинелли, с использованием в качестве 1,3-дикарбонильной компоненты бензоилацетона, ацетилацетона или ацетоуксусного эфира, в качестве карбонильной компоненты - ароматических альдегидов (бензальдегид, анисовый альдегид, 2-метоксибензальдегид, *пара*-толуиловый альдегид, *пара*- и *мета*-бромбензальдегиды, *пара*-трифторметилбензальдегид и *мета*-нитробензальдегид), и тиомочевины в качестве «N-C-N» компоненты. В зависимости от природы реагентов диссертантом были успешно использованы три метода синтеза. Далее путем реакции 1,2,3,4-тетрагидропиримидин-2-тионов с этилхлорацетатом были эффективно получены тиазоло[3,2-*a*]пиримидины в виде гидрохлоридов, и структура *пара*-бромфенил-замещенного продукта была доказана методом РСА, причем диссертантом наблюдалось образование в кристаллической фазе зигзагообразных гомохиральных цепей, состоящих из индивидуального *S*-изомера. Далее, исходя из наличия активной метиленовой группы тиазолидинового фрагмента в молекуле тиазоло[3,2-*a*]пиримидина, на следующем этапе диссертант предложил удобный метод модификации данного фрагмента путем C-N сочетания с арилдиазоний хлоридами с

образованием 2-арилгидразоновых производных тиазоло[3,2-*a*]пиримидина, структура одного из ключевых продуктов была доказана методом РСА, причем для кристалла соединения 4.7, полученного из водно-этанольного раствора, диссертантом наблюдалось образование системы водородных связей, которые образует молекула воды, что приводит к поочередному связыванию с *R*- и *S*-изомерами соединения 4.7, тем самым образуя гетерохиральные цепочки. В данных системах имеет место существование двух таутомеров (азо-гидразонная таутомерия) и двух геометрических изомеров (*Z*- и *E*-) относительно C=N или N=N связей. Для исследования таутомерии данных соединений диссертантом был проведен комплекс ЯМР экспериментов. Согласно данным ЯМР ¹H наличие одного набора сигналов свидетельствует в пользу наличия только 1 таутомера, тогда как отсутствие положительного сигнала метинового атома углерода в спектре ЯМР ¹³C DEPT, свидетельствует о существовании продуктов в виде гидразонов. Однозначное определение структуры полученных соединений было сделано на основании данных РСА, согласно которым длина 1.279(2) Å связи между атомами тиазольного углерода 3 и азота 4, составляет соответствует таковой для двойной связи C=N, что подтверждает наличие одного таутомера – гидразонной формы. Существование же продуктов в виде термодинамически менее выгодного *Z*-изомера диссертантом было обосновано на примере данных РСА, согласно которым N-H фрагмент участвует во внутримолекулярном водородном связывании с менее мягким акцептором водородной связи, атомом серы, а не более жестким кислородом, а также присутствует водородная связь N-H фрагмента с сольватной молекулой этанола.

Далее при попытке восстановления полученных гидразонов (до гидразинов) диссертантом была обнаружена ранее неописанная внутримолекулярная гетероциклизация *in situ* образующихся гидразинов с образованием 1,5-дигидро[1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиримидинов, при этом диссертантом были подобраны оптимальные условия для данной трансформации, заключающиеся в использовании боргидрида натрия совместно с оксидом ванадия(V), что приводит к образованию *in situ* солей ванадия(III), которые являются сильными восстановителями. Структуры двух их полученных соединений были подтверждены методом РСА. Диссертантом был предложен и обоснован механизм наблюдаемой трансформации.

На следующем этапе работы диссертантом был синтезирован ряд 2-арилметилиденовых производных тиазоло[3,2-*a*]пиримидина путем конденсации Кневенагеля с ароматическими альдегидами в присутствии основания. Полученные продукты теоретически могут существовать в виде смеси геометрических *E*- и *Z*-изомеров, и на основании анализа спектров ¹H ЯМР диссертантом было сделано отнесение полученных продуктов исключительно как *Z*-изомеров. Дополнительно, для получения окончательных доказательств структуры соединений, диссертантом были получены данные РСА для 4 продуктов.

Для выявления структурных факторов, определяющих кристаллическую упаковку, а также влияние водородного и галогенного связывания на супрамолекулярный мотив организации в кристаллической фазе диссертантом были получены данные для 21 новых

кристаллических структур 2-арилметиленовых производных тиазоло[3,2-*a*]пиримидина. Было показано влияние структуры 2-арилметиленового производного на организацию молекул в кристаллической фазе. Так, для производных **6.22**, **6.24** и **6.36**, содержащих 2-гидрокси- и 2-гидрокси-3-метоксибензилиденовые путем кристаллизации из этилового спирта диссертантом наблюдалось образование *R,S*-рацематных димеров за счет наличия двух водородных связей О-Н...О типа между гидроксильной группы одного изомера и карбонильной группой тиазолидинового фрагмента другого изомера. При кристаллизации из ДМСО для 2-гидроксибензилиден-содержащего тиазоло[3,2-*a*]пиримидина **6.22** диссертантом наблюдалось формирование кристаллосольватов с OD-системой водородных связей гидрогруппы с молекулой растворителя, тогда как для 2-гидрокси-3-метоксибензилиден-содержащего производного **6.24** образования кристаллосольвата не происходило, что, по мнению диссертанта свидетельствует в пользу энергетически выгодного образования димерных структур.

Для фенилзамещенного тиазоло[3,2-*a*]пиримидина **6.2** при кристаллизации из этанола диссертантом наблюдалось образование нецентросимметричных кристаллосольватов с асимметрической частью образованной двумя молекулами (*R*- и *S*-изомерами) соединения и двумя молекулами этанола. Согласно диссертанту, в кристалле реализуется нецентросимметричная система водородных связей и образуются две зигзагообразные гомохиральные цепочки водородно-связанных молекул, состоящих исключительно из *R*- и *S*-изомера, соответственно. Аналогично, для продукта **6.29** при кристаллизации из метанола диссертантом наблюдалась схожая супрамолекулярная организация с образованием водородно-связанных гомохиральных цепочек, но имеющих более четкий лестничный характер. Для оценки влияния положения гидроксильной группы в арилметиленовом фрагменте диссертантом была изучена кристаллизация 4-гидроксибензилиден-содержащих тиазоло[3,2-*a*]пиримидинов **6.3** и **6.23**. Для соединения **6.3** диссертантом было обнаружено образование зигзагообразных гомохиральных цепочек за счет межмолекулярных водородных связей О-Н...N, причем две гомохиральные цепочки разных энантиомеров переплетались друг с другом. Подобная супрамолекулярная организация фиксировалась диссертантом и для *C5-пара*-бромфенилзамещенного продукта **6.23**. Диссертантом фиксировалось образование параллельных (без переплетения) индивидуальных гомохиральных зигзагообразных цепочек, соединенных межмолекулярной водородной связью О-Н...N. Отсутствие переплетения цепочек диссертант объясняет наличием объемного атома брома. Интересный результата наблюдался диссертантом при кристаллизации соединения **6.13**. Полученные кристаллы не содержали сольватных молекул, при этом в каждом конкретном кристалле содержались молекулы только одного энантиомера, организованных системой водородных связей О-Н...N типа в виде одномерной зигзагообразной цепочки, а в массе кристаллы представляли конгломерат энантиомерных кристаллов. Аналогичный результат, с различием только в пространственной группе наблюдался диссертантом при кристаллизации соединения **6.4**. Для галогенсодержащих производных **6.25** и **6.34**, содержащих бромфенильные заместители, в кристаллах, диссертантом обнаружено

наличие галогенного связывания, при этом разного по своей природе. Найдено, что галогенная связь образуется исключительно для атомов брома в бромфенильном фрагменте при C5 атоме тиазолидинового фрагмента. При этом, согласно диссертанту, для *мета*-бромфенилзамещенного соединения **6.34** реализуется классическая галогенная связь N...Br, тогда как для *пара*-бромфенилзамещенного производного **6.25** диссертантом фиксировался другой тип связывания – галогенная связь O...Br. При этом галогенная связь O...Br, возникает между двумя разными изомерами и приводит к образованию димерных структур, тогда как связь N...Br ведет к образованию бесконечных гомохиральных цепей.

На следующем этапе для оценки химических свойств 2-арилметиленовых производных тиазоло[3,2-*a*]пиримидина диссертантом были изучены их превращения в реакциях с O-нуклеофилами (метиловым спиртом) в условиях микроволновой активации. В результате диссертантом было установлено, что реакция приводит не к ожидаемым продуктам присоединения спирта по Михаэлю, а исключительно 3,5-диарил-2,3-дигидротиазоло[3,2-*a*]пиримидин-2,6-дикарбоксилатам, которые, согласно представленному диссертантом механизму, образуются в результате нуклеофильной атаки спирта по карбонильному атому углерода циклического тиазолидинового фрагмента или продукта его раскрытия с последующей рециклизацией. Структура одного из полученных дигидротиазоло[3,2-*a*]пиримидин-2,6-дикарбоксилатов была доказана методом РСА.

Наконец, последний раздел второй главы содержит данные биологической активности синтезированных соединений, которые были протестированы на цитотоксичность в отношении раковых и нормальных клеточных линий. Для соединений **4.1**, **4.16** и **5.2** диссертантом была обнаружена средняя цитотоксическая активность в отношении линий карциномы шейки матки (*M-HeLa*), аденокарциномы предстательной железы (*PC3*) и аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека (*HuTu 80*). При этом для всех соединений фиксировалась цитотоксическая активность в отношении нормальных клеток печени (линия Chang liver) со значениями IC_{50} в диапазоне 73.5 – ≥ 100 мкМ с умеренной цитотоксичностью в отношении нормальных клеток печени. Согласно диссертанту, в отношении клеточных линий *M-HeLa* и *HuTu 80* цитотоксическое действие проявлялось на уровне препарата сравнения сорафениба, а для соединения **6.2** в отношении *M-HeLa* диссертантом наблюдалось двукратное превышение активности в сравнении с известными противоопухолевыми препаратами. Диссертантом также был оценен индекс селективности (SI) цитотоксического действия, при этом самая высокая селективность наблюдалась для соединения **6.2** в отношении раковых линий *M-HeLa* и *HuTu 80* со значениями SI 6.3 и 7.5 соответственно, что, исходя их стандартных значений $SI \geq 3$, при значительно более низком значении SI для препарата сравнения сорафениб. Диссертантом также была проведена оценка апоптотических эффектов в клетках *M-HeLa* и после 24-часовой инкубации в присутствии **6.2** в данных клетках фиксировался дозозависимый апоптоз с более активно регистрируемыми эффектами на поздней стадии. Согласно диссертанту, цитотоксический эффект соединения **6.2** может характеризоваться

индукцией апоптоза по внутреннему пути, связанному с нарушением функции митохондрий и задержкой клеточного цикла в фазе G1/G0.

Достоверность полученных в рамках работы экспериментальных результатов сомнения не вызывает, так как для доказательства структуры полученных соединений автором грамотно применялись методы 1D ЯМР ^1H , ^{13}C спектроскопии, методы ИК-спектроскопии. Приятное впечатление производит наличие большого количества данных PCA, которые умело использовались диссертантом для оценки поведения полученных соединений в кристаллической фазе.

В главе 3 приведены экспериментальные методики синтеза исходных и конечных продуктов, а также приведены подробные физико-химические характеристики полученных соединений. Экспериментальная часть работы выполнена на высоком профессиональном уровне и, тем самым, достоверность полученных результатов не вызывает сомнения. Все соединения были синтезированы в достаточных количествах для их характеристики с использованием методов ИК-спектроскопии, одномерной и двумерной спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H , ^{13}C , элементного анализа, а также масс-спектрометрии (ESI-MS, HRESI-MS, MS-MALDI) и PCA.

Научная новизна и теоретическая значимость проведенного исследования заключается в следующем:

1. Открыты две новые перегруппировки в ряду тиазоло[3,2-*a*]пиримидинов: 2-арилгидразонов тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-3-онов в 1-арил-3-гидроксиметил[1,2,4]триазоло-[4,3-*a*]пиримидины и 2-арилметилидентиазоло[3,2-*a*]пиримидин-3-онов в 3-арил-2,3-дигидро-тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-2-карбоксилаты.
2. Показано, что как в кристаллической фазе, так и в растворе преимущественно образуется *Z*-изомер арилгидразоновых производных 2-тиазоло[3,2-*a*]пиримидина.
3. Установлены структурные факторы, влияющие на кристаллическую упаковку 2-арилметилиденовых производных тиазоло[3,2-*a*]пиримидина: положение заместителя в ароматическом фрагменте при пятом атоме углерода тиазолопиримидинового каркаса и в арилметилиденовом фрагменте.
4. Установлено влияние природы растворителя на супрамолекулярную организацию в кристаллической фазе 2-арилметилиденовых производных тиазоло[3,2-*a*]пиримидина.
5. Определена роль галогенной связи в образовании супрамолекулярных ансамблей в кристаллической фазе производных 2-арилметилидентиазоло[3,2-*a*]пиримидина, содержащих 3- или 4-бромфенильный фрагмент.

6. Исследована цитотоксическая активность синтезированных 2-арилгидразоновых и 2-арилметиленовых производных триазоло[3,2-*a*]пиримидина и триазоло[4,3-*a*]пиримидина, и выявлены соединения-лидеры.

7. Синтезировано и охарактеризовано 82 новых соединения.

Практическая значимость заключается в разработке новых путей синтеза ранее недоступных гетероциклических производных триазоло[4,3-*a*]пиримидина и 2,3-дигидротриазоло[3,2-*a*]пиримидина, а также эффективных методов синтеза 2-арилгидразоновых и 2-арилметиленовых производных триазоло[3,2-*a*]пиримидина с высокими выходами. Показано, что нековалентные взаимодействия (водородное и галогенное связывание) являются движущей силой хиральной дискриминации в кристаллической фазе 2-арилметиленовых производных триазоло[3,2-*a*]пиримидина. Синтезированные гетероциклы являются перспективными для поиска структур с потенциальной противораковой, противовоспалительной и противогрибковой активностью. Выявлены соединения-лидеры с высокой противоопухолевой активностью в отношении клеточных линий карциномы шейки матки (*M-HeLa*) и аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека (*HuTi 80*).

Публикации

Диссертационный материал полностью отражен в автореферате, а также в 5 опубликованных статьях по тематике диссертации и в виде 11 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

В целом, диссертационное исследование изложено хорошо, но при прочтении диссертации возник **ряд замечаний и вопросов**.

1. По оформлению диссертации и автореферата:

- В тексте автореферата и диссертации присутствуют несогласованные предложения, например стр. 8, 6 строка сверху после рисунка 3; стр. 35, 2 строка сверху; стр. 55, 1 стр. сверху после таблицы 10.

- В разделе 1 диссертации в большинстве схем отсутствует подробная информация по условиям реакций (время реакции, температура и т.д.) (Схемы 3-18 и далее по тексту).

- В литературном обзоре (глава 1) при обозначении условий реакции и названий реагентов в некоторых схемах использованы английские обозначения (Схема 3, 13,15).

- В разделе 3 в элементном анализе для соединений **1.20**, **2.13**, **2.16**, **2.19** и **2.20** для содержания углерода допущено расхождение более чем 0.3% (1.20, 61.18% и 61.64%; **2.13**, 49.33% и 49.78%; **2.16**, 69.59% и 70.32%), **2.19** (56.22% и 56.69%) и **2.20** (61.06% и 61.45%). Элементный анализ для соединений **4.7** и **4.8** содержит одни и те же значения

(видимо, данные вставлены по ошибке). Отсутствуют данные элементного анализа для соединения **4.16**.

- Отсутствует выделение курсивом латинских названий, терминов и символов в главе 2.5 диссертации и главе 4 автореферата.

3. По содержанию диссертации:

- В обсуждении результатов (глава 2) более логично было бы начать нумерацию соединений, начиная с номера главы, и использовать буквенные обозначения для идентификации производных.

4. Вопросы по существу:

1. Чем обусловлен выбор метанола в качестве *O*-нуклеофила для реакции с 2-арилметилиденовыми производными тиазоло[3,2-*a*]пиримидина? Почему не исследовались другие *O*-нуклеофилы (вода или другие спирты)?

2. Проводилась ли диссертантом оценка соотношения *R*- и *S*-энантиомеров в полученных продуктах? Можно, например, предложить проведение ЯМР ¹H экспериментов в присутствии хиральных «*shift*-реагентов» (реагент Пиркле и др.).

3. Для **6.2** диссертантом указана более высокая активность в отношении *M-HeLa* в сравнении с известным противоопухолевым препаратом. Какой именно препарат имеется в виду?

4. Чем, по мнению диссертанта, можно объяснить различия в структуре кристаллосольватов продуктов **4.8** и **4.11**, а именно координации растворителя (ДМФА)?

Необходимо отметить, что замечания и вопросы носят лишь частный и/или дискуссионный характер и нисколько не умаляют очевидных достоинств настоящей диссертационной работы.

С содержанием данной диссертации следует ознакомить Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (г. Москва), Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, химический факультет, Уральский федеральный университет, Химико-технологический институт и Институт естественных наук и математики (г. Екатеринбург), Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (г. Иркутск), Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН (г. Новосибирск) и т.д.

Диссертационная работа Агаркова Артема Сергеевича «2-Замещенные производные тиазоло[3,2-*a*]пиримидина: синтез, структура, химические свойства и противоопухолевая активность» является законченным научным исследованием, которое отличается научной новизной, выполнено на хорошем теоретическом и экспериментальном уровне с привлечением всех необходимых современных физико-химических методов анализа. Достоверность полученных диссертантом данных и научных результатов не вызывает сомнений. Автореферат полноценно отражает

содержание диссертации и проведенного исследования. Результаты исследования изложены в 16 работах, в том числе в 5 научных статьях в рецензируемых журналах, соответствующих требованиям ВАК РФ, предъявляемым к журналам, в которых должны быть опубликованы основные результаты работ.

По актуальности темы, объему выполненных исследований, новизне полученных результатов, методам исследования и практической значимости диссертационная работа Агаркова Артема Сергеевича «2-Замещенные производные тиазоло[3,2-*a*]пиримидина: синтез, структура, химические свойства и противоопухолевая активность» полностью соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Агарков Артем Сергеевич, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3 – Органическая химия.

Настоящий отзыв рассмотрен и утвержден на семинаре Лаборатории фторорганических соединений ИОС УрО РАН. Протокол № 1 от 09.01.2023.

09.01.2023 г.

Доктор химических наук (02.00.03 – Органическая химия)

Бургарт Янина Валерьевна

Должность: Заместитель директора по научной работе ИОС УрО РАН,

Ведущий научный сотрудник лаборатории фторорганических соединений

Адрес: 620137, Свердловская область, город Екатеринбург, улица Софьи Ковалевской, дом 22/20

Телефон: +7(343) 3623225

Адрес электронной почты: burgart@ios.uran.ru

Наименование организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук (ИОС УрО РАН)

Адрес: 620137, Свердловская область, город Екатеринбург, улица Софьи Ковалевской, дом 22/20

Телефон+7 (343) 369-30-58

Адрес электронной почты организации: verbitsky@ios.uran.ru

Адрес официального сайта организации: <https://www.iosuran.ru/>