

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Протас Александры Владимировны «Свободные и координированные ионами Pt(II), Pd(II) тетразолилуксусные кислоты как перспективные скаффолды в синтезе новых биологически активных веществ», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химии в диссертационный совет 212.232.28 на базе ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Протас А.В. выполнена в рамках актуальной задачи по поиску и разработке новых биологически активных веществ на базе тетразолилуксусных кислот и их производных. Эти соединения можно рассматривать как аналоги природных аминокислот, в которых аминогруппа замещена на тетразолильный фрагмент, что позволяет рассматривать их как перспективные скаффолды в синтезе новых биологически активных веществ. Различные изомеры данных соединений обладают хорошей растворимостью в водных средах, могут выступать в качестве кислоты или основания, а также обладают способностью эффективно участвовать в различных межмолекулярных взаимодействиях. Кроме того, варьируя заместители у атома азота тетразольного цикла можно добиться оптимальной липофильности данных соединений. Несмотря на очевидную перспективность таких веществ, исследований в этой области недостаточно. Координационные соединения ионов переходных металлов, содержащие тетразолилуксусные кислоты в качестве лигандов, также могут проявлять различные виды биологической активности.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Диссертационная работа Протас А.В. выполнена на высоком научном

уровне. В работе использованы современные химические, физико-химические, компьютерные методы исследования и обработки результатов. Научные положения, выводы и рекомендации основаны на большом объеме экспериментальных данных, полученных на сертифицированном оборудовании в необходимом числе повторностей. Сформулированные в работе выводы и рекомендации аргументированы и логично вытекают из результатов исследований.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на IV международной конференции по неорганической и координационной химии: «Advances in synthesis and complexing» (Москва, 2017); XXVII Международной Чугаевской конференции по координационной химии (Нижний Новгород, 2017); IV Международной конференции по медицинской химии «МедХим-2017» (Казань, 2017); X Международной конференции молодых ученых по химии (Санкт-Петербург, 2017); Кластере конференций по органической химии «ОргХим-2016» - Медицинская и биоорганическая химия» (Санкт-Петербург, 2016); IV-конференции «Современные проблемы молекулярной биофизики», посвященной 105-летию со дня рождения Э.В. Фрисман, (Санкт-Петербург, 2016).

По теме диссертации опубликовано 5 статей, рекомендуемых ВАК и входящих в базы цитирования WoS, Scopus и 6 тезисов докладов. Опубликованные научные работы полностью отражают основное содержание диссертационной работы.

Диссертантом достигнута сформулированная цель и решены поставленные задачи.

Достоверность полученных результатов и научная новизна

Достоверность результатов подтверждается воспроизводимостью данных при многократном повторении эксперимента; использованием современных синтетических подходов и физико-химических методов анализа: ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР- и ИК-спектроскопия, рентгеноструктурный анализ монокристаллов, синхронный термический анализ, элементный анализ, масс-

спектрометрия высокого разрешения, а также методов электронной спектроскопии, спектроскопии кругового дихроизма, вискозиметрии, электрофореза, термической денатурации ДНК, *in silico* и *in vitro* для определения активности синтезированных соединений. Выбранные методы адекватны поставленным целям и задачам. Материал собственных исследований соотносился автором с литературными данными и проводился сопоставительный анализ.

Научная новизна исследования.

а) синтезировано нескольких серий тетразол-1-ил- и тетразол-5-илуксусных кислот, а также их эфиров и амидов, содержащих различные заместители в тетразольном цикле ($R = H, Alkyl, CH_2CH_2OH$). При использовании в качестве исходных субстратов энантиомерно чистых природных аминокислот впервые, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, была установлена их частичная рацемизация, степень которой зависит от структуры исходного субстрата и условий реакции. Предложен вероятный механизм данного процесса.

б) получены *транс*-комплексы ионов Pt(II), Pd(II) с тетразол-1-ил- и тетразол-5-илуксусными кислотами, их эфирами и амидами ($R = t-Bu, iso-Pr, CH_2CH_2OH$) в качестве лигандов в присутствии 1M HCl и метилового или этилового спиртов. Установлено, что природа спирта, а также его относительное количество существенно влияют на процесс комплексообразования. Согласно данным РСА, во всех случаях в координации с ионами Pd(II) и Pt(II) участвуют исключительно наиболее основные N(4)-атомы пиридинового типа тетразолильных фрагментов с образованием плоскоквадратных *транс*-комплексов.

в) с помощью различных теоретических и экспериментальных методов *in vitro* изучена эффективность взаимодействия комплексов с ДНК. Установлено, что такое взаимодействие может осуществляться посредством связывания с атомом N⁷ гуанина полинуклеотида, а также посредством связывания по малой борозде ДНК.

г) исследовано взаимодействие координированных с ионами Pt(II), Pd(II) тетразолилуксусных кислот с сывороточным альбумином методами электронной спектроскопии поглощения и испускания (флуориметрия). Показано, что константы связывания K_{bin} исследуемых металлокомплексов с альбумином находятся в эффективном диапазоне ($K_{bin} = 8.32 \times 10^4 \text{ л}\cdot\text{М}^{-1} - 1,61 \times 10^5 \text{ л}\cdot\text{М}^{-1}$). Согласно результатам, молекулярного докинга, наиболее благоприятными сайтами связывания ионов платиновых и палладиевых комплексов является гидрофобная часть кармана в субдомене ПА (полость вокруг Trp-213).

д) для *транс*-[PtCl₂L₂], L = этиловый эфир 2-*трет*-бутил-2*H*-тетразол-5-илуксусной кислоты выявлена и оценена *in vitro* антипролиферативная активность в отношении клеточных линий рака человека.

Значимость для науки и практики результатов диссертации

Теоретическая значимость. Здесь, прежде всего, следует отметить высокую степень анализа, систематизации литературных данных и создание хорошего литературного обзора по методам синтеза и биологической активности тетразолилуксусных кислот и их производных.

Практическая значимость. Разработанные Протас А.В. методы получения свободных тетразолилуксусных кислот и координированных с ионами Pt(II), Pd(II) могут рассматриваться как перспективные скаффолды при разработке новых высокоэффективных противовирусных и противоопухолевых средств. Оптимизированные методы синтеза таких соединений, в том числе энантимерно чистых тетразолилкарбоновых кислот, могут быть использованы в масштабном лабораторном и опытно-промышленном синтезе.

Соответствие содержания автореферата

основным положениям и выводам диссертации

Автореферат полностью отражает содержание диссертации и включает ее основные положения и выводы.

Диссертационная работа Протас А.В. соответствует паспорту научной

специальности 02.00.10 – биорганическая химии, в частности, охватывает область исследования, предусмотренную пунктами 1 и 5:

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).

Оценка содержания диссертации

Рукопись оппонируемой работы Протас А.В. изложена на 156 страницах текста компьютерного набора и состоит из общей характеристики работы, обзора литературы (глава 1), 2 глав собственных экспериментальных исследований и обсуждения полученных результатов, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 32 рисунками, содержит 6 таблиц. Библиография включает 140 ссылок на литературные источники, в том числе 130 зарубежных.

Во **введении** изложена актуальность и степень разработанности темы, сформулированы цель и задачи работы, представлены научная новизна, практическая значимость.

Глава 1 традиционно посвящена обзору литературы, в котором проводится обобщение и сопоставительный анализ информации, изложенной в научных публикациях по двум ключевым аспектам диссертационной работы: методам синтеза производных тетразола и их антипролиферативной активности. Содержание обзора достаточно полно освещает современное состояние научной проблемы, выявляет перспективу разработки новых производных тетразола и создания на их основе соединений с высокой

противоопухолевой активностью, а также свидетельствует о хорошей ориентации автора в материале.

Глава 2 содержит экспериментальную часть. Представленные экспериментальные данные иллюстрируют разработанные в рамках диссертационной работы методы синтеза и исследования некоторых тетразолильных производных аминокислот, а также комплексов хлоридов платины(II) и палладия(II) с 2R-2H-тетразол-5-ил- и 5-метилтетразол-1-илуксусными кислотами и их производными. Описанные в работе методики являются удобными, безопасными и, как правило, характеризуются высокими выходами продуктов. Структура синтезированных комплексов была установлена современными физико-химическими методами исследования. Характеристики использованного оборудования позволяют говорить о точности и достоверности проведенных измерений. Для установления состава и строения синтезированных соединений применялись методы рентгеноструктурного анализа, масс-спектрометрии, ИК-спектроскопии, элементного и синхронного термического анализа. Чистота соединений контролировалась методами ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии и высокоэффективной жидкостной хроматографией. Исследование биологической активности *in vitro* проводилась с использованием современных биофизических и биохимических методик, совокупность которых позволяет охарактеризовать противовирусную активность тетразолильных аналогов некоторых природных аминокислот, а также противоопухолевую активность производных тетразолилуксусных кислот, координированных с ионами Pt(II), Pd(II).

Глава 3 связана с оптимизацией условий, разработкой более экономичных и безопасных способов получения, изучения биологической активности:

а) тетразол-1-ил-, тетразол-5-илуксусных кислот и их производных этиловых эфиров и амидов; тетразолильных аналогов аминокислот. Азидированием *n*-пропиловых эфиров (2S)- и (2R)-2-[[9H-флуорен-9-

илметокси)карбонил]амино}-3-(4-аминофенил)пропионовой кислот и серией последующих химических превращений автору впервые удалось получить новые тетразолильные производные L- и D-фенилаланина, которые могут быть использованы для синтеза пептидомиметиков и других практически важных соединений.

Для полученных тетразолильных аналогов аминокислот была исследована противовирусная активность в отношении вируса гриппа H1N1. Установлено, что все полученные тетразолильные аналоги аминокислот проявляют противовирусную активность и низкую токсичность. Наибольшим индексом селективности относительно данного штамма обладает (2S)-5-(бензилокси)-5-оксо-2-(1H-тетразол-1-ил)пентановая кислота.

б) тетразолсодержащих комплексов Pd(II) и Pt(II). Диссертантом показано, что такие *транс*-комплексы удобно получать прямым взаимодействием тетразолилуксусных кислот и их производных с солями Pt(II) и Pd(II) в 1M растворе соляной кислоты с добавлением этилового или метилового спиртов. Природа спирта, а также его относительное количество существенно влияют на процесс комплексообразования. Так, в случае добавления этанола к реакционной смеси, этерификация наблюдается уже при 5% (w/w), в отличие от метанола, для которого этерификация наступает лишь при увеличении концентрации до 50%.

Согласно данным РСА, все исследованные соединения имеют молекулярное строение, *транс*-расположение лигандов в координационной сфере и типичное плоскоквадратное окружение атомов платины (II) и палладия (II). Данные рентгеновской дифракции показывают, что в полученных комплексах в координации с центрами Pd (II) и Pt(II) участвуют исключительно наиболее основные N(4)-атомы тетразолильных фрагментов, что является наиболее характерным для N-замещенных тетразолов способом координации.

Заслуживает внимание и сопоставление термограмм тетразолсодержащих лигандов и их комплексов свидетельствующее о том, что комплексообразование способствует повышению термической устойчивости тетразольных производных.

Строение и состав всех полученных соединений доказаны комплексом физико-химических методов (^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР- и ИК-спектроскопия, рентгеноструктурный анализ монокристаллов, синхронный термический анализ, элементный анализ, масс-спектрометрия высокого разрешения).

Эффективность взаимодействия полученных тетразолсодержащих комплексов с ДНК и бычьим сывороточным альбумином (БСА) была изучена теоретическими и экспериментальными методами *in vitro*, такими как УФ-спектроскопия, спектроскопия кругового дихроизма, вискозиметрия, электрофорез, термическая денатурация ДНК, флуоресцентная спектроскопия и молекулярный докинг. Установлено, что взаимодействие данных комплексов с ДНК может осуществляться путём связывания по малой борозде ДНК, а с БСА по аминокислотному остатку Trp-213.

Оценка противоопухолевой активности тетразолсодержащих комплексов Pt(II) и Pd(II) *in vitro* показала, что они могут быть перспективными цитостатиками.

Выводы по диссертационной работе полностью отражают решение поставленных задач.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Достоинство диссертационной работы, выполненной Протас А.В., заключается в получении и обработке большого массива экспериментальных данных и формировании широкого диапазона навыков по синтезу, выделению и очистке биологически активных соединений, установлению их строения на базе тетразолилуксусных кислот и их производных, в том числе комплексов ионов Pt(II), Pd(II) с тетразол-1-ил- и тетразол-5-илуксусными кислотами, их эфирами и амидами; по скрининговым испытаниям противовирусной и

антипролиферативной активности в отношении вируса гриппа А H1N1, рака молочной железы MCF-7, карциномы толстой кишки HT-29, карциномы молочной железы MDA-MB-231 и неопухолевых клеточных линий RC-124.

В диссертационной работе и автореферате использована научная терминология, они написаны хорошим литературным языком, дополнены иллюстративным материалом в виде схем реакций, рисунков и таблиц. Выводы, приведенные в тексте диссертации и автореферате, совпадают.

Вместе с тем, при рассмотрении работы возникли следующие **вопросы и замечания:**

1. Для многих веществ (1-5, 9, 10, 12, 13, 15-17, 19) в экспериментальной части, обсуждении результатов и автореферате диссертации приведены разные выходы, причем в ряде случаев отличия достигают 20%. Например, соединение 2 согласно экспериментальной части получено с выходом 68%, обсуждению результатов (в диссертации этого заголовка нет) – 75%, в автореферате же приведен выход в 88%.

2. В экспериментальной части (стр. 62) отсутствует описание веществ 18-20.

3. Во введении (стр. 9) соискатель утверждает, что «был предложен вероятный механизм данного процесса [рацемизации], включающий образование циклических интермедиатов». Тем не менее, в обсуждении результатов (стр. 88) обнаруживается лишь предположение об «образовании гетероциклических интермедиатов» без приведения их структуры, а также самого механизма рацемизации.

4. В тексте диссертации (стр. 88) после заявления об исследовании противовирусной активности тетразолильных аналогов аминокислот отсутствует обсуждение полученных результатов, хотя в автореферате (стр.8) эти результаты приведены в таблице 2.

5. Зарегистрированные противоопухолевые лекарственные препараты платины обычно являются *цис*-изомерами. В связи с этим не понятно почему

диссертант не пытался синтезировать *cis*-аналоги исследуемых комплексов тем более, что в литературном обзоре синтез подобных соединений приведен.

6. При обсуждении структурных особенностей комплексов (стр. 94) соискатель говорит о том, что «координация приводит к незначительным изменениям химических сдвигов протонов и атомов углерода в спектрах ЯМР». Однако координация протекает с участием в первую очередь атомов азота тетразольного цикла. Возможно, имело бы смысл зарегистрировать спектры ЯМР ^{15}N полученных соединений?

7. Обсуждаемая диссертация не лишена недочетов в оформлении. В тексте присутствуют опечатки (стр. 6, 8, 16, 35, 45, 49, 50, 66, 78, 88, 89), неудачные выражения (стр. 43, 46, 47, 48), смысл которых удастся восстановить лишь по контексту.

8. Отдельно стоит отметить список литературы, оформление которого не соответствует требованиям ГОСТ, при этом отсутствует и единообразие при оформлении библиографических ссылок.

Приведенные выше вопросы и замечания не носят принципиального характера, не снижают достоинства диссертационной работы и не влияют на ее общую положительную оценку.

Заключение

Представленная на отзыв диссертационная работа представляет собой завершенное квалификационное исследование, удовлетворяющее критериям актуальности, научной новизны и практической значимости. Полученные соискателем экспериментальные данные достоверны. Эксперимент описан в объеме достаточном для воспроизведения грамотным синтетиком. Вероятность плагиата полностью исключена. Выводы обоснованы и носят обобщающий характер. Основные результаты работы опубликованы в виде пяти научных статей в рецензируемых международных периодических изданиях, реферируемых Web of Science & Scopus и рекомендованных ВАК

РФ. Материалы прошли апробацию на всероссийском и международных форумах.

Автореферат *отражает* содержание рукописи.

Резюме: представленная на отзыв диссертационная работа «Свободные и координированные с ионами Pt(II), Pd(II) тетразолилуксусные кислоты как перспективные скаффолды в синтезе новых биологически активных веществ» удовлетворяет всем требованиям, установленным п. 9 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатской диссертации. Автор диссертационного исследования – Протас Александра Владимировна – заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биоорганическая химия.

06 июня 2018 г.

Официальный оппонент:

профессор, доктор химических наук  Яковлев Игорь Павлович

Почтовый адрес: Профессора Попова ул., д. 14, лит. А
Санкт-Петербург, 197376

Тел.: (812) 499 39 00 доб. 4200;

E-mail: nauka@sprca.ru ;

Наименование организации: ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России

Должность: заведующий кафедрой органической химии.

Ученое звание: профессор.

Подпись руки



удостоверяю

06.06.2018

Начальник отдела документации



Павлов И.П.

ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России