

## ВІДГУК

офіційного опонента, д-ра фарм. н., доц. Воскобойніка Олексія Юрійовича на дисертаційну роботу Деркач Галини Олегівни на тему «Синтез та вивчення кореляції «структур – біологічна активність» похідних 5-амінометилентіазолідинонів», що представлена до спеціалізованої вченої ради Д 35.600.02 при Львівському національному медичному університеті ім. Данила Галицького на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – «фармацевтична хімія та фармакогнозія».

*1. Актуальність теми дисертації та її зв'язок з державними чи галузевими програмами, пріоритетними напрямками розвитку науки і техніки.* Становлення та розвиток хімії похідних тіазоліну має майже 150-річну історію, що обумовлено високою синтетичною доступністю ряду найбільш простих за будовою похідних зазначеної гетероциклічної системи та широкими можливостями її хімічної модифікації. Інтенсифікація подальших досліджень спрямованих на розробку методів синтезу нових похідних тіазоліну була пов'язана з виявленням серед них агентів з вираженою біологічною активністю. Так, серед похідних тіазоліну виявлені речовини з протираковою, протизапальною, гіпоглікемічною дією тощо. Багаторічна робота у галузі синтезу тіазолінів, що проводилась чисельними науковими групами дозволила сформувати значний пул методів конструювання даного класу речовин. Зазначений факт, в свою чергу, обумовив необхідність розробки стратегій спрямованого пошуку біологічно активних агентів серед речовин, що містять тіазоліновий фрагмент. Саме зазначеній тематиці, а саме розробці стратегій пошуку біоактивних агентів серед 5-амінометилентіазолідинонів, і присвячено дисертаційне дослідження Деркач Галини Олегівни.

Дисертаційна робота є фрагментом плану робіт кафедр хімії фармацевтичного факультету, біологічної та медичної хімії імені академіка Г.О. Бабенка та кафедри мікробіології, вірусології та імунології Івано-Франківського національного медичного університету на тему «Вивчення біологічної активності природних і синтетичних гетероциклічних сполук, що містять піридиновий, імідазолійний цикли та комплекси з біометалами» (№ державної реєстрації 0112U008505).

**2. Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.** Представлена робота привертає увагу ретельним плануванням та розробкою стратегії дослідження, для реалізації якої обрано виправдані тактичні рішення по методам конструювання потенційних біоактивних сполук, підходам до визначення біологічної активності речовин та методам обробки одержаних результатів. Синтетичні підходи, що були засновані для структурної модифікації речовин повністю відповідали структурі вихідних речовин та цільовим продуктам. Результати синтетичних досліджень не викликають сумніву, адже верифікацію індивідуальності та структури одержаних сполук проведено сучасними фізико-хімічними методами дослідження, зокрема спектроскопією  $^1\text{H}$  та  $^{13}\text{C}$  ЯМР. Для ряду з синтезованих сполук проведено рентгеноструктурне дослідження. Вивчення протимікробної, антитрипаносомної, протипухлини, протизапальної активностей та гострої токсичності проведено у відповідності до сучасних підходів до фармакологічного скринінгу. Дослідження афінності до потенційних біологічних мішеней є виправданим та гармонійно доповнюють результати біологічних досліджень. Висновки викладені чітко та є теоретично й експериментально обґрунтованими, мета дослідження досягнута, а завдання виконані.

**3. Новизна дисертаційних досліджень.** Автором вперше розроблено та опрацьовано стратегію пошуку біологічно активних сполук з прогнозованою фармакологічною дією серед продуктів взаємодії 5-етоксиметилентіазолідинів з N-нуклеофілами. В рамках реалізації зазначеної стратегії було виявлено ряд особливостей перебігу реакції 5-етоксиметилентіазолідинів з амінами, що дозволило провести спрямований синтез відповідних єнамінів як перспективних об'єктів фармакологічних досліджень. Додатково, показано можливість заміни етоксильного залишку на аміногрупу реакцією вихідних 5-етоксиметилентіазолідинів з гідрокарбонатом амонію в середовищі етанолу. При реалізації «гібрид-фармакофорного» підходу до конструювання біологічно активних молекул автором одержано ряд раніше невідомих 5-піразоліл-вмісних тіазолідинів, встановлено їх фізико-хімічні і біологічні властивості. Для окремих 5-піразоліл-вмісних тіазолідинів проведено структурні дослідження, що дозволили виявити особливості їх таутомерних перетворень.

Вперше адаптовано розроблені методи синтезу 5-етоксиметилентіазолідинів та продуктів їх взаємодії з аліфатичними, ароматичними та гетероциклічними амінами для одержання амінометилензаміщених тіазоло[3,2-*b*][1,2,4]тріазол-6-ону як потенційних біологічно активних сполук.

Встановлено, що етиловий естер 5-етоксиметилен-2-(4-оксо-2-тіоксотіазолідин-3-іл)-3-фенілпропіонової кислоти легко взаємодіє з ароматичними та гетероциклічними амінами, а також гідрокарбонатом амонію в середовищі спиртів з утворенням відповідних єнамінів. Вперше встановлено утворення 4-(2Н-[1,2,4]тріазол-5-ілсульфаніл)-1,2-дигідропіразол-3-ону при реакції 5-етоксиметилентіазоло[3,2-*b*][1,2,4]тріазол-6-ону з гідразином.

В рамках дисертаційної роботи автором здійснено цілеспрямований синтез 132 гетероциклічних сполук, серед яких виявлено серію високоактивних протимікробних, протигрибкових, антитрипанасомних, протипухлих та протизапальних агентів. Вперше виявлено ряд закономірностей «будова – біологічна активність», що можуть бути використані для конструювання потенційних активних фармацевтичних інгредієнтів.

**4. Теоретичне значення результатів дослідження.** Представлені автором результати є теоретично значими у галузях препаративної та структурної органічної хімії, медичної хімії, фармакології та фармацевтичної хімії. Теоретичне значення у галузі органічної хімії мають результати вивчення таутомерних перетворень в ряду синтезованих сполук та систематизовані результати синтетичних досліджень, що дозволили встановити особливості перебігу ряду реакцій. Також теоретичне значення мають запропоновані автором механізми перебігу ряду перетворень. Теоретичну цінність у галузі медичної хімії та фармакології мають одержані автором результати SAR досліджень.

**5. Практичне значення одержаних результатів.** Автором розроблено нові та оптимізовано існуючи підходи до синтезу амінометилентіазолідинів, 5-(піразол-1-іл)метилентіазолідинів, продуктів модифікації етилових естерів 2-(5-амінометилен-4-оксо-2-тіоксотіазолідин-3-іл)-3-фенілпропіонової кислоти, 5-амінометилентіазоло[3,2-*b*][1,2,4]тріазол-6-онів, що є практично значимим для галузі препаративної органічної хімії. Встановлені автором особливості перебігу реакцій, що, як вже зазначалось, мають теоретичну значимість, мають також практичну значимість, оскільки дозволяють планувати синтез цільових речовин, що є структурно наближеними до об'єктів дисертаційного дослідження. Практичну цінність для галузі фармацевтичної хімії мають результати спектральних досліджень, оскільки останні можуть бути використані при розробці методів контролю якості синтезованих сполук у разі їх впровадження в медичну практику. Для галузі медичної хімії практичну значимість мають розроблені автором підходи до конструювання біологічно активних агентів.

Очевидну практичну цінність має запропонований автором для подальших фармакологічних досліджень високоефективний протизапальний агент, а саме 5-[3,5-біс-(4-хлорофеніл)-4,5-дигідропіразол-1-ілметилен]-2-тіоксо-4-тіазолідинон, який у разі успішності доклінічних та клінічних досліджень може бути впроваджений у медичну практику.

Результати проведених досліджень впроваджено у наукову та навчально-методичну роботу ряду вищих навчальних закладів України.

**6. Повнота викладу основних результатів дисертації в наукових фахових виданнях.** Результати, що одержані при виконанні дисертаційного дослідження відображені у 7 статтях (з них 4 у виданнях, що включені до міжнародної наукометричної бази Scopus). Особливо хочеться відмітити статтю у науковому виданні *Bioorganic chemistry*, яке входить до першого квартилю як у галузі органічної хімії, так і медичної хімії (*Drug Discovery*). Також, матеріали дисертаційної роботи представлено науковій спільноті на зібраннях з питань органічної, фармацевтичної та медичної хімії. Сполучка з високою протистафілококовою та антиканідозною дією та метод її одержання задекларовані у патенті України на винахід, що додатково підтверджує наукову новизну роботи. Автореферат дисертаційної роботи як за структурою, так і за змістом відповідає дисертації.

**7. Зауваження щодо змісту і оформлення дисертації та автореферату, завершеності дисертації в цілому.** Дисертаційна робота викладена на 230 сторінках друкованого тексту (включно з додатками) і складається зі вступу, чотирьох розділів (в тому числі одного оглядового розділу і трьох розділів власних досліджень), висновків, списку літературних джерел та додатків. Робота ілюстрована 54 схемами, 32 рисунками і 38 таблицями. Перелік використаних літературних джерел містить 282 найменувань, 44 з яких кирилицею.

**Перший розділ** являє собою детальний, структурований та критичний аналіз літературних та патентних відомостей про синтез та структурну модифікацію 5-ен-4-тіазолідинонів в рамках досліджень спрямованих на створення інноваційних біологічно активних агентів. В рамках розділу 1 автором проаналізовані наявні відомості про особливості взаємодії 4-тіазолідинонів з карбоніл-вмісними сполуками в реакції Кньовенагеля як одного з перспективних підходів до синтезу біоактивних сполук, методи хімічної модифікації 5-етокси-метиленпохідних спрямованих на формування 5-енаміно-4-тіазолідинонів, нетипові підходи до синтезу 5-ен-4-тіазолідинонів та 5-енаміно-4-тіазолідинонів. В окремому підрозділі

розділу 1 систематизовано наявні відомості про біологічну активність 5-ен-4-тіазолідинонів.

В другому розділі представлено результати досліджень спрямованих на одержання 5-амінометилентіазолідинонів, виявлення особливостей перебігу реакцій, що ведуть до утворення названих вище сполук, та встановлення їх спектральних та фізико-хімічних властивостей. Об'єкти хімічної модифікації спрямованої на одержання 5-амінометилентіазолідинонів, а саме відповідні 5-етоксиметиленпохідні були одержані конденсацією 2,4-тіазолідинону, ізороданіну, псевдотіогідантоїну, роданіну та його 3-заміщених похідних з триетилортотформіатом в середовищі оцтового ангідриду. Автором досліжено взаємодію названих вище сполук з ароматичними та гетероциклічними амінами, моноетаноламіном, гліцином, морфоліном, піперазином та фенілгідразином. Показано, що в більшості випадків продуктами є відповідні 5-амінотіазолідинони. Серед перетворень, які відбуваються з особливостями, автор відзначив реакції 5-етоксиметиленпохідного ізородоніну з піперазином, в результаті якої утворюється відповідне біспохідне, та фенілгідразином, що веде до відповідного дизаміщеного похідного. Встановлено ряд особливостей перебігу взаємодії 5-етоксиметиленпохідних тіазолідинів з N-нуклеофілами. В подальшому автором описано методи синтезу речовин в структурі яких поєднано тіазоліновий фрагмент з піразоліновим залишком. Додатково в розділі 2, окрім детального обговорення даних  $^1\text{H}$  та  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопії, представлено результати рентгеноданих структурного дослідження 4-(4-ацетоксифеніл)аміно-5-(5-(4-хлорофеніл)-3-(4-хлорофеніл)-4,5-дигідро-1*H*-піразол-1-іл)метиліден-2-тіазоліону, детальний аналіз якого дозволив, зокрема, встановити факт існування молекули в кристалічній формі в аміновій таутомірній формі.

В третьому розділі автором описано результати досліджень спрямованих на синтез та встановлення фізико-хімічних характеристик 5-енаміно-похідних 2-фенілпропіонової кислоти та тіазоло[3,2-*b*][1,2,4]тріазол-6-ону. (роданін-3-іл)-3-фенілпропіонової кислоти та тіазоло[3,2-*b*][1,2,4]тріазол-6-ону. Серед іншого показано, що при взаємодії 2-(4-оксо-2-тіоксотіазолідин-3-іл)-3-фенілпропіонової кислоти з триетилортотформіатом відбувається як введення етоксиметиленового фрагменту, так і естерифікація карбоксильної групи. Одержаній продукт досліжено у реакціях з ароматичними та гетероциклічними амінами і амонію гідрокарбонатом. Також, в рамках даного розділу проведено синтез 5-етокси-метилентіазоло[3,2-*b*][1,2,4]тріазол-6-ону та дослідження його взаємодії з N-нуклеофілами, що дозволило розробити методи синтезу серії 5-амінометилентіазоло[3,2-*b*][1,2,4]тріазол-6-онів. Необхідно відзначити виявлену автором особливість перебігу реакції 5-етокси-метилентіазоло[3,2-*b*][1,2,4]тріазол-

6-ону з гідразин гідратом, яка за даними фізико-хімічних методів досліджень приводить до утворення 4-(2Н-[1,2,4]тріазол-5-ілсульфаніл)-1,2-дигідропіразол-3-ону. Додатково авторами запропоновано два вірогідні механізми зазначеного перетворення.

**Четвертий розділ** присвячено дослідженню біологічної активності синтезованих сполук, зокрема встановленню їх протимікробної, протигрибкової, антитрипаносомної, протиракової, протизапальної дії. Аналіз даного розділу показав, що всі дослідження біологічної активності були проведені відповідно до сучасних підходів. Вкрай цікавим виявився дизайн дослідження протимікробної активності синтезованих сполук, який передбачав додаткове встановлення синергізму антимікробної дії синтезованих сполук при сумісному застосуванні з антибіотиком оксациліном. За результатами проведених досліджень виявлено найбільш активну речовину, а саме 5-[(4-етил-сульфанилсульфоніл-аніліно)метилен]-4-тіоксо-2-тіазолідинон, для якого проведено поглибленні дослідження активності по відношенню до грибів роду *Candida* та бактерій *Klebsiella pneumoniae*. Автору також вдалось виявити ряд речовин з вираженою антитрипаносомною активністю. При дослідженні протипухлинної активності синтезованих сполук автором проведено прескринінг ріст-інгібуючої дії 12 синтезованих сполук по відношенню до 60 клітинних ліній раку людини. Для етилового естера 2-(5-{[5-(2,4-дихлоробензил)-тіазол-2-іламіно]-метилен}-4-оксо-2-тіоксотіазолідин-3-іл)-3-фенілпропіонової кислоти, що була ідентифікована як найбільш перспективна речовина, проведено дослідження протиракової дії в діапазоні концентрацій. Проведений COMPARE аналіз дозволив запропонувати ймовірні механізми протиракової дії сполуки **3.14**.

Дослідження протизапальної активності синтезованих сполук було проведено на моделях карагенінового та формалінового набряків. Для найбільш активних, за результатами скринінгу протизапальної дії, сполук визначені параметри токсичності. Проведення докінгових досліджень дозволило запропонувати ймовірний механізм реалізації протизапальної активності синтезованих сполук.

Загальне враження від дисертації вкрай **позитивне**, разом з тим, в роботі, як і в будь якому об'ємному дослідженні, присутні типографські помилки, невдалі вислови та фрагменти, що потребують додаткового пояснення.

Зокрема:

1. В схемі 1.2 співвідношення геометричних ізомерів **3** та **4** показано як 45% на 45%, що в сумі дає 90%, а не 100%.

2. По відношенню до сполуки **14** більш коректним є використання терміну «спіроконденсовані», а не «спірозаміщені».
3. На схемі 1.15 представлено окиснення сполуки 38 у похідне 39 під дією триетиламіну та ДМФ. Зазначені дві сполуки не є окисниками, аналіз першоджерела показав, що окисниками в зазначеному перетворені виступають кисень або бром.
4. В схемах 1.20 (стор. 42) та 1.21 (стор. 43) різні сполуки зазначені під однаковими номерами.
5. На мою думку, використання терміну «пірольний атом Нітрогену» по відношенню до сполуки 66 не є коректним, краще використати термін «атом Нітрогену піролідинового фрагменту».
6. На схемі 1.23 (стор. 43) не вказана структура реагенту (гліцину).
7. В табл. 2.4 (стор. 74) при описі  $^1\text{H}$  ЯМР спектру сполуки **2.18** метильного фрагменту вказано як трипротонний синглет при 1.75 м.ч., що не є коректним, адже сигнали протонів метильного залишку метоксильної групи, як правило, реєструються приблизно при 3.80 м.ч. Також, сигнали двох метиленових фрагментів у спектрі сполуки 2.39 краще інтерпретувати як мультиплет.
8. При описі експериментів автором на стор. 94-97 та 125-128 представлено структури синтезованих сполук, що на мою думку не є доцільним, адже це є дублюванням інформації, що представлена в схемах перетворень та таблицях.
9. На схемі 3.6 (стор. 121) автором представлено ймовірні механізми утворення сполуки **3.32**. В даній схемі показана нуклеофільна атака гідразинного залишку по атому Нітрогену триазольного циклу, що не є коректним, адже атака відбувається по атому Карбону амідного фрагмента.
10. При представлені результатів дослідження протимікробної активності (табл. 4.3, 4.4) не представлено дані протимікробної активності препарату порівняння.
11. Підрозділ 4.1.2 називається «Поглиблene вивчення протистафілоковокої і антиканадіозної активності (5Z)-5-[(4-етилсульфанілсульфоніланіліно)метилен]-4-тіоксо-2-тіазолідинону», одинак в даному розділі представлено дані про активність зазначеної сполуки по відношенню до грибів роду *Candida* та *Klebsiella pneumoniae*.

12. Не зрозуміло чому сполуки **2.37** за відсутності антибіотика представлена як неактивна в табл. 4.7, а в табл. 4.8 навіть за відсутності антибіотику проявляє виражену антимікробну активність.
13. На мою думку автору слід було деталізувати, на основі яких саме даних зроблено висновок про здатність сполуки **2.37** інгібувати бактеріальну  $\beta$ -лактамазу.
14. В табл. 4.9, 4.10, 4.11 концентрації приведені у мг/мл замість мкг/мл. Зазначені зауваження не є принциповими, та не впливають на, як вже зазначалось, позитивне враження від роботи.  
Також, хотілось би почути відповіді автора на наступні питання:
  1. Чи можна провести взаємодію сполук **2.3** та **2.8** з триетилортогоформіатом без використання оцтового ангідриду як розчинника, що дозволило б уникнути процесу ацилування?
  2. При опрацюванні методів синтезу 5-(піразол-1-іл)метилен-4-(ариламіно)-5Н-тіазол-2-онів автором обрано у якості ароматичного аміну амінофенол. Чим обумовлений зазначений вибір.

**8. Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження в практиці.** Опрацьовані дисертантом підходи до створення нових біологічно активних агентів можуть бути з успіхом використані у наукових лабораторіях, які займаються пошуком біологічно активних сполук. Для 5-[3,5-біс-(4-хлорофеніл)-4,5-дигідропіразол-1-ілметилен]-2-тіоксо-4-тіазолідинону як «кандидата у лікарський засіб», що був ідентифікований як перспективний протизапальний агент, рекомендується провести поглиблені доклінічні дослідження, а у разі їх успішності клінічні дослідження. Результати вивчення взаємозв'язку «структура - дія» доцільно використати для оптимізації «сполук-лідерів». Одержані в рамках дисертаційного дослідження результати рекомендується впровадити до навчального процесу при викладанні таких дисциплін як органічна хімія, медична хімія, фармацевтична хімія.

**9. Висновок про відповідність дисертації вимогам положення.** Враховуючи наведене вище, можна зробити висновок, що дисертаційна робота Деркач Галини Олегівни «Синтез та вивчення кореляції «структура – біологічна активність» похідних 5-амінометилентіазолідинонів» є завершеною науковою працею і за актуальністю, об'ємом проведених досліджень, науковою новизною одержаних результатів, їх теоретичним та практичним значенням, ступенем обґрунтованості наукових положень, повнотою викладу у фахових виданнях

повністю відповідає вимогам Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України 567 від 24.07.2013 р. (із змінами, внесеними згідно з постановами № 656 від 19.08.2015 р. і № 1159 від 30.12.2015 р.) та вимогам, які ставляться до дисертаційних робіт на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02, а її автор Деркач Галина Олегівна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія.

Офіційний опонент

доцент кафедри органічної

і біоорганічної хімії Запорізького  
державного медичного університету,

д-р. фарм. н., доц.

