

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

члена-корреспондента РАН, профессора, доктора химических наук
Федорова Алексея Юрьевича на диссертационную работу

Мокрова Григория Владимировича «Создание оригинальных малых молекул с психотропной, противосудорожной и кардиотропной активностью методами молекулярного моделирования», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности
1.4.16 – медицинская химия.

Актуальность диссертации Г.В. Мокрова подкреплена эпидемиологическими данными, согласно которым заболевания центральной нервной системы встречаются почти у 12,5% населения нашей планеты, а сердечно-сосудистые заболевания также распространены повсеместно и являются ведущей причиной смерти в мире, включая Россию. Дополнительный существенный вклад в тяжесть и распространенность неврологических и сердечно-сосудистых заболеваний внесла пандемия коронавируса Covid-19. Несмотря на непрекращающийся поиск новых лекарственных средств для терапии указанных заболеваний, разработка более эффективных и безопасных препаратов остается важнейшей задачей. С этой целью ведется поиск новых биомишеней для конструирования потенциальных лекарств, разрабатываются новые концепции их дизайна, включая компьютерные методы моделирования, все чаще используется мультитаргетный подход.

В связи с этим диссертационная работа Мокрова Г.В., целью которой являлось создание новых оригинальных малых молекул с психотропной, противосудорожной и кардиотропной активностью, выполнено на актуальную тему.

Общая структура и апробация работы

Рецензируемая диссертация изложена на 421 странице машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка используемой литературы, содержит 34 таблицы, 124 рисунка и 32 схемы. Библиографический указатель содержит 611 источников. Результаты диссертации опубликованы в 44 статьях в периодических научных изданиях из списка ВАК, 19 патентах РФ на изобретение и в 30 тезисах устных и стендовых докладов на конференциях, симпозиумах и съездах российского и международного уровней.

Литературный обзор

Приведенный в работе Г.В. Мокрова литературный обзор (84 страницы, 326 литературных источников) посвящен дизайну новых соединений, обладающих психотропной, противосудорожной и кардиотропной активностью. В частности, в нем собраны данные по структурам известных лигандов 18 кДа транслокаторного белка, блокаторам управляемых циклическими нуклеотидами гиперполяризационно-активируемых (HCN) каналов, блокаторам натриевых, калиевых и кальциевых каналов и бета-блокаторам. Важной частью обзора является описание подходов к дизайну потенциальных биологически активных соединений, включая фармакофорный подход к конструированию веществ с предполагаемой противосудорожной активностью.

Обзор является содержательным, имеет аналитический характер и при желании читателя позволяет оценить не только путь, уже пройденный в данной области, но и наметить новые перспективные направления в области создания терапевтических агентов с психотропной, противосудорожной и кардиотропной активностью.

Научная новизна и теоретическая значимость

В ходе выполнения своего исследования Г.В. Мокров получил ценные научные результаты. Эти результаты можно условно отнести к трем «научным сюжетам»:

1. Дизайн и синтез новых лигандов TSPO, обладающих нейропсихотропной активностью.
2. Созданию новых терапевтических агентов, проявляющих противосудорожную активность.
3. Дизайн новых терапевтических средств с кардиотропной активностью.

Успех рецензируемой работы обусловлен эффективным сочетанием тонкого органического синтеза с расчетными методами мишень- и лиганд-ориентированного дизайна терапевтических агентов, основанных на структурной информации о целевых биомишенях и об их лигандах. Применение подобного комплексного подхода к дизайну новых лекарственных средств наиболее перспективно в современной медицинской химии. В целом, все используемые в работе методы конструирования новых биологически активных соединений оказались эффективными, так как позволили создать спектр молекул различного строения с целевыми видами активности.

В первой части работы приведены результаты по конструированию лигандов транслокаторного белка TSPO. Дизайн этих лигандов был осуществлен с применением комплексного подхода, включающего 3D-фармакофорное моделирование, молекулярный докинг и ADMET-оптимизацию. Это позволило создать новый тип TSPO-лигандов на основе пирроло[1,2-а]пиразинового ядра. Была синтезирована достаточно большая библиотека этих соединений. Были найдены соединения - лидеры, не уступавшие по своей анксиолитической активности препарату сравнения диазепаму, но лишенные его негативных побочных эффектов.

Изучение соединений *in vivo* проводилось в стандартных тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» на анксиолитическую активность. При этом часть соединений исследовалась в одном тесте, а часть – в другом. В обоих тестах были исследованы лишь некоторые производные пирроло[1,2-а]пиразинов. Как итог скрининговых исследований – было отобрано соединение ГМЛ-1, для которого также показано наличие ноотропной и антидепрессивной активности. Для него была подтверждена вовлеченность белка TSPO и процесса нейростероидогенеза в механизм его действия.

В рамках Госпрограммы Фарма 2020 (ГК № 14.N08.12.0087, 2016-2018 гг) проведены доклинические исследования соединения – лидера ГМЛ-1 в качестве быстродействующего анксиолитика.

Вторая часть работы посвящена фармакофорному дизайну новых групп соединений с потенциальной противосудорожной активностью. Эффективность такого подхода хорошо обоснована в литературном обзоре. Автором были выявлены четыре новые фармакофорные модели, на основании которых были предложены несколько групп гетероциклических соединений. Правильность выбранных моделей, в последствии была подтверждена тем, что во всех группах веществ, сконструированных на основе этих моделей, были найдены вещества с антиэпилептическими свойствами. Детально рассмотрен синтез веществ сконструированных групп, и представлены данные по изучению их противосудорожной активности в тестах максимального электрошока (МЭШ) и антагонизма с коразолом. При этом, к сожалению, некоторые соединения были исследованы лишь в одном тесте МЭШ. Важным результатом, подчеркивающим успешность подхода к моделированию, является наличие большого количества активных соединений во всех предложенных группах. Особый интерес вызвал мультидокинг-подход по изучению анализа возможных механизмов действия новых веществ. Этот метод в перспективе может быть использован и при конструировании новых потенциальных биологически активных соединений. Неожиданным

результатом явилось то, что в некоторых подгруппах было определено достаточно большое количество возможных биомишеней, что позволяет предположить мультитаргетное действие таких соединений.

На основе анализа связи «структура-активность» в результате исследований были отобраны соединения ГИЖ-272, ГИЖ-298 и ГИЖ-290 для расширенных доклинических исследований. Соединение ГИЖ-298 в настоящее время проходит цикл доклинической разработки в качестве потенциального противосудорожного средства.

В третьей части работы приводится «мультитаргетный» дизайн биароматических молекул, отвечающих обобщенному фармакофору кардиопротекторов. При этом на основании баз данных биароматических лигандов 8 отобранных биомишеней (кальциевые каналы L-типа, натриевые каналы Nav1.5, калиевые hERG-каналы и Kv1.5-каналы, HCN-каналы, бета1-адренорецепторы, рианодиновым RyR2-рецепторы, сигма1-рецепторы) были рассчитаны их фармакофорные модели, которые, как и ожидалось, содержали по два ароматических фармакофора. Сконструированные автором молекулы имели достаточно высокий уровень соответствия всем расчетным фармакофорным моделям. Эти вещества были синтезированы и в широком наборе тестов *in vivo* проанализированы на наличие антиаритмического и антиишемического действия. К сожалению, для большинства новых соединений отсутствуют исследования *in vitro* в отношении выбранных биомишеней, которые были проведены лишь для соединения-лидера АЛМ-802. Для этого вещества была подтверждена его способность блокировать натриевые и калиевые каналы, а также ингибировать рианодиновый рецептор и связываться с сигма1-рецептором. При этом спектр кардиопротекторного действия лидера АЛМ-802 оказался очень широк. Интересным и достаточно неожиданным результатом является также наличие у АЛМ-802 анальгетической, анксиолитической и актопротекторной активности.

Соединение АЛМ-802 в настоящее время проходит цикл доклинической разработки в качестве средства, сочетающего антиаритмические и антиишемические свойства.

Всего в работе синтезировано более 130 новых конечных соединений различных классов, более половины из которых продемонстрировали наличие того или иного вида активности.

Практическая значимость

В результате работы была создана целая линейка соединений, которые могут стать перспективными лекарственными средствами. Это

потенциальный анксиолитик ГМЛ-1, который является лигандом транслокаторного белка массой 18 кДа. Важным фактом является отсутствие у соединения ГМЛ-1 синдрома отмены и наркогенного потенциала, что выгодно отличает его от анксиолитических средств бензодиазепинового ряда. Отобрано несколько перспективных веществ с противосудорожной активностью: ГИЖ-272, ГИЖ-290 и ГИЖ-298. Каждое из них имеет дополнительные положительные эффекты, которые могут использоваться при терапии определенных подтипов эпилептических расстройств: ГИЖ-272 обладает антиишемическим действием, ГИЖ-290 – ноотропным эффектом, а ГИЖ-298 – анальгетической и анксиолитической активностью. Использование гипотезы по созданию кардиопротекторов биароматической структуры с мультитаргетным механизмом действия позволило получить вещество АЛМ-802 с широким спектром кардиопротекторных свойств.

Одно соединение – лидер ГМЛ-1 прошло доклинические испытания в качестве быстродействующего анксиолитика в рамках Федеральной программы Фарма-2020; еще два соединения в настоящий момент проходят доклинические испытания в качестве потенциального противосудорожного средства и в качестве терапевтического агента, сочетающего антиаритмические и антиишемические свойства.

Достоверность полученных результатов

Результаты рецензируемой работы сомнений не вызывают, поскольку получены на основе квалифицированного применения современных методов органического синтеза и физико-химических исследований: спектроскопии ЯМР, РСА, современных биохимических подходов, а также методов молекулярного моделирования и квантовой химии. Полученные результаты обсуждены с использованием новых данных современной химической литературы.

Замечания и вопросы

Работа Г.В. Мокрова выполнена на высоком экспериментальном уровне, тщательно оформлена, изложена четко и аргументировано. Имеются вопросы, носящие дискуссионный характер:

1. Полагаю, что автором допущена смысловая ошибка в названии диссертации: «Создание оригинальных малых молекул с психотропной, противосудорожной и кардиотропной активностью методами молекулярного моделирования». Создать малые молекулами методами молекулярного моделирования не представляется возможным т.к. органические молекулы, о которых

идет речь в диссертации, создаются методами органического синтеза, а молекулярное моделирование позволяет предсказать их свойства в зависимости от строения.

2. В экспериментальной части работы не хватает данных физико-химических методов анализа. Синтезированные в работе соединения охарактеризованы данными ПМР-спектроскопии, также большая часть полученных соединений охарактеризована с применением элементного анализа. Данные ^{13}C ЯМР спектроскопии приводятся только на страницах 295 – 300 экспериментальной части. Масс-спектрометрических данных оппоненту в работе обнаружить не удалось. В связи с этим, доказательство строения и состава части синтезированных в работе соединений, не соответствуют современным критериям.
3. На страницах 283-288 отнесение оксимов к Z- или E-формам не обосновано, также как не обосновано определение соотношения Z- и E-изомеров в смесях. В случае смесей Z- и E-изомеров необходимо приводить набор сигналов в спектрах ^1H и ^{13}C ЯМР, относящихся к каждому из изомеров. Не ясно, находятся ли эти изомеры в динамическом равновесии при комнатной температуре и при температуре тела пациента и можно ли их разделить препаративно? Как влияет E/Z-изомерия этих оксимов на биологическую активность и какой вклад в нее у каждого из изомеров? Эти вопросы принципиальны так как оксим ГИЖ-298 находится на стадии доклинических испытаний.
4. В экспериментальной части неожиданно и спонтанно в различных местах появляются данные по очистке растворителей (например, стр. 310 «BP-1. Осушение ДМФА») или данные про приготовление растворов, например, на стр. 278: «Приготовление раствора хлорангидрида акриловой кислоты в сухом дихлорметане. В плоскодонной колбе на 1 л готовят раствор 60.65 г (0.65 моль) хлорангидрида акриловой кислоты в 250 мл сухого дихлорметана». Полагаю, что в последнем случае, было бы достаточно в обсуждении результатов привести концентрацию реагента.
5. Как определяли выходы хлорангидридов коричневых кислот 2.2.13 (схема 16) и какова их чистота и стабильность по отношению к гидролизу?
6. Для таблиц 4 и 5 в тексте диссертации практически отсутствует обсуждение, поэтому оппоненту не совсем ясно, о чем

свидетельствуют приведенные в этих таблицах параметры и в чем заключается их физический смысл.

7. В таблице 4, на рисунке 80 и в таблице 21 не приводятся сравнение активности синтезированных соединений с активностями известных препаратов, обладающих анксиолитической, нейропротекторной и противосудорожной активностями соответственно.
8. Почему в таблицах 14 и 15 у препарата сравнения - вальпроевой кислоты противосудорожная активность проявлялась при использовании терапевтической дозы в 100 мг/кг, в таблице 16 при использовании доз 150-200 мг/кг, а в таблице 18 уже применялась доза 200 мг/кг? Если доза одного и того же препарата сравнения в однотипных тестах, на одном типе мышей изменяется в 2 раза, можно ли проводить достоверное относительное сравнение между собой приведенных в этих таблицах данных по тестированию синтезированных автором соединений? Почему в таблицах 14 – 16 противосудорожная активность синтезированных молекул сравнивалась с вальпроевой кислотой, а в таблице 17 с мексидолом? Каковы критерии выбора препаратов сравнения?
9. В работе в достаточно большом объеме применяется метод молекулярного докинга для анализа эффективности взаимодействия новых соединений с предполагаемыми биомишенями. Известно, что этот метод имеет определенные ограничения по точности предсказаний. При этом существенно более функциональным и прецизионным является метод молекулярной динамики, позволяющий оценивать поведение молекул в активных сайтах белков в реальном времени с учетом конформационных изменений. Почему данный метод не был применен в диссертационном исследовании для соединений - лидеров?
10. На страницах 207 – 216 диссертации очень наглядно с применением диаграмм продемонстрировано политаргетное действие известных бисароматических препаратов - карведилола, ивабрадина, небиволола, ранолазина и верапамила. На основе этих и других известных структурных типов молекул с кардиотропной активностью автором диссертации проведена очень большая работа по выявлению закономерностей «структура – активность» и предложены новые соединения лидеры на основе бисароматических структур. В связи с этим возникает ряд вопросов: (а) Насколько востребована разработка новых бисароматических молекул с кардиотропной активностью при наличии на фармацевтическом рынке большого количества

аналогичных по химическому строению и фармакологическому действию лекарственных средств? (б) Диаграммы биомишеней, приведенные на Рис. 100 – 104 демонстрируют сродство вышеуказанных препаратов к большому количеству различных рецепторов (от полутора до, практически, четырех десятков!). Хороша ли такая мультитаргетность или нет? Как отсутствие избирательности действия препарата связана с побочными эффектами? (в) Какова афинность, предлагаемых автором соединений – лидеров с кардиотропной активностью по отношению к этим многочисленным рецепторам и биологическим мишеням? (г) Не стоит ли, в рамках современных тенденций в кардиологии, сфокусироваться на разработке более селективных или таргетных кардиотропных препаратов?

Заключение

Представленную диссертационную работу Мокрова Григория Владимировича можно квалифицировать как научное достижение в области дизайна и синтеза новых терапевтических агентов, проявляющих психотропную, противосудорожную и кардиотропную активности. Полученные соискателем экспериментальные данные достоверны, выводы носят обобщающий характер. Основное содержание работы отражено в 44 статьях в периодических научных изданиях из списка ВАК, 19 патентах РФ на изобретение и в 30 тезисах устных и стендовых докладов на конференциях, симпозиумах и съездах российского и международного уровней.

Многие положения диссертационного исследования могут найти применение в университетских учебных курсах по медицинской химии, результаты могут быть рекомендованы для применения в научных организациях, в которых изучаются методы получения и применение органических соединений, а также методы медицинской химии: в Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Институте молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Институте биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, а также в учебных курсах МГУ им. М.В. Ломоносова, РХТУ им. Д.И. Менделеева, ННГУ им. Н.И. Лобачевского и других вузах.

Диссертация «Создание оригинальных малых молекул с психотропной, противосудорожной и кардиотропной активностью методами молекулярного моделирования» полностью отвечает критериям, определенным для

диссертаций на соискание ученой степени доктора наук в пунктах 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (утв. Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г с последующими изменениями и дополнениями), а ее автор – Мокров Григорий Владимирович заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.16 – медицинская химия.

Официальный оппонент
Федоров Алексей Юрьевич,
доктор химических наук, профессор,
член-корреспондент РАН,
заведующий кафедрой
органической химии химического факультета
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский
Нижегородский государственный университет
им. Н. И. Лобачевского»

Контактная информация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский
государственный университет им. Н. И. Лобачевского»,
603950, г. Нижний Новгород, просп. Гагарина, д. 23, +7-910-872-38-70
Адрес электронной почты: afedorovnn@yandex.ru

«24» _____ марта _____ 2025 г.

А.Ю. Федоров

Подпись А. Ю. Федорова удостоверяю
начальник управления кадров
ННГУ им. Н. И. Лобачевского



Т.А. Лапоног