

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Алекс

Алексеев Александр Александрович

**Синтез и биотестирование новых антигипотензивных,
нейропротекторных и противоопухолевых агентов на основе
циклических изотиомочевин**

02.00.16 — Медицинская химия

02.00.03 — Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2022

Работа выполнена на кафедре медицинской химии и тонкого органического синтеза
Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научные руководители

– **Зефирова Ольга Николаевна**,
доктор химических наук, доцент
Нуриева Евгения Владимировна,
кандидат химических наук

Официальные оппоненты

– **Белоглазкина Елена Кимовна**
доктор химических наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Московский государственный
университет имени М. В. Ломоносова»,
химический факультет, кафедра
органической химии, профессор.
Шевцова Елена Феофановна
доктор химических наук
ФГБУН Институт физиологически активных
веществ РАН, лаборатория
биомолекулярного скрининга, и.о.
зав.лабораторией, главный научный
сотрудник
Семенов Виктор Владимирович
доктор химических наук, профессор,
ФГБУН Институт органической химии им.
Н.Д. Зелинского РАН, лаборатория
медицинской химии (№17), заведующий
лабораторией

Защита диссертации состоится «17» июня 2022 г. в 13 часов на заседании
диссертационного совета МГУ.02.06 Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д.1,
стр. 3, химический факультет, ауд. 337.

E-mail: natalylozinskaya@mail.ru (учёный секретарь),

aleksandr.alekseev@chemistry.msu.ru (соискатель).

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной
библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте
ИАС «ИСТИНА»: <http://istina.msu.ru/dissertations/454573955/>

Автореферат разослан «____» мая 2022 г.
Ученый секретарь
диссертационного совета МГУ.02.06,
кандидат химических наук


Н.А. Лозинская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Заболевания, связанные с возникновением злокачественных опухолей, относятся к числу социально значимых во многих странах мира. Неуклонный рост числа таких заболеваний в сочетании с высокой общей токсичностью клинически используемых препаратов вызывает постоянную необходимость в разработке новых эффективных и селективных противоопухолевых агентов и требует нестандартных идей в ходе дизайна их структур. Неизменно актуальной остается, и задача создания нейропротекторных агентов для лечения миллионов больных болезнью Альцгеймера, а также антигипотензивных препаратов для коррекции вызванных токсичными веществами или действием радиации шоковых состояний, которые сопровождаются нарушением жизненно важных функций дыхания и системы кровообращения. Число клинически используемых низкомолекулярных препаратов с подобными типами активности невелико, что делает важной задачу дизайна новых молекул с нейропротекторным и антишоковым действием и разработки подходов к их синтетической реализации. Попытка создания соединений с указанными типами активности на основе относительно малоизученного в медхимических работах структурного типа циклических изотиомочевин и вошла в круг решаемых в настоящей работе задач.

Степень разработанности темы диссертации. В диссертационной работе представлен обзор литературных данных о применении в ходе разработки лекарственных веществ фрагмента циклических изотиомочевин с эндоциклическим атомом серы за период с 1970-х годов до 2021 года включительно, с учетом только тех работ, в которых присутствовало указание на конкретную молекулярную мишень действия разрабатываемых соединений. Также проанализированы синтетические подходы, используемые для получения веществ, содержащих указанные группировки. Анализ литературных данных показывает, что циклические изотиомочевинны с эндоциклическим атомом серы относительно редко применяют для направленного создания структур с заданной биологической активностью, хотя такой фрагмент содержится в структурах ряда клинически используемых лекарств и кандидатов в лекарство, находящихся на различных этапах доклинических испытаний. Это делает интересной и важной задачу расширения числа примеров использования циклических изотиомочевин в дизайне лекарственных веществ.

Целью настоящей работы являлся молекулярный дизайн и синтез новых серий веществ на основе производных циклических изотиомочевин, действующих на такие молекулярные мишени, как фермент синтаза оксида азота, белок тубулин и фермент бутирилхолинэстераза. В соответствии с указанной целью в работе были поставлены следующие **задачи**:

- с помощью разнообразных приемов молекулярного дизайна предложить пути оптимизации заданных структурных прототипов (соединений-лидеров) – лигандов синтазы оксида азота, тубулина и бутирилхолинэстеразы;
- разработать синтетические подходы и препаративно удобные методики для получения целевых структур, изучить особенности протекания реакций и установить строение всех ранее не описанных соединений;
- проанализировать соотношения *структура – активность* для всех полученных и протестированных соединений с целью выявления их возможных сравнительных преимуществ.

Объекты и предметы исследования:

- моно, би- и трициклические изотиомочевинны;
- реакции внутримолекулярной циклизации с образованием циклических изотиомочевин;
- ингибиторы синтазы оксида азота (преимущественно индуцибельной изоформы, в меньшей степени – эндотелиальной изоформы);
- лиганды колхицинового сайта связывания тубулина;
- ингибиторы бутирилхолинэстеразы.

Методология и методы исследования. В работе использованы классические методы молекулярного дизайна лекарственных веществ, а также их разновидности, предложенные ранее в

лаборатории медицинской химии химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова. Схемы синтеза исходных и целевых веществ разрабатывались на основе анализа литературных данных. Структура и состав синтезированных соединений доказаны с помощью комплекса физико-химических методов: ЯМР спектроскопии на ядрах ^1H и ^{13}C и масс-спектрометрии, а в некоторых случаях – и с помощью данных ИК спектроскопии, рентгеноструктурного анализа и элементного анализа. Компьютерное молекулярное моделирование проведено в соответствии со стандартными протоколами, используемыми в лаборатории медицинской химии химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

Научная новизна. Впервые обнаружено необычное взаимодействие N-(эндо-бицикло[3.3.1]нон-6-ен-3-ил)-N'-(*трет*-бутил)тиомочевины с бромом с протеканием внутримолекулярной циклизации не по атому серы, а по атому азота предварительно окисленной до мочевины тиомочевинной группировки. Продукт реакции принадлежит к новому структурному типу каркасных производных мочевины. Впервые изучена реакция N-[(эндо-3-бицикло[3.3.1]нон-6-енил)метил]-N'-(*трет*-бутил)-тиомочевины с иодом в присутствии $^t\text{BuOOH}$ или K_2CO_3 и выделены продукты внутримолекулярной циклизации с 4-азатрицикло[4.3.1.1^{3,8}]ундекановым ядром. Впервые проведен синтез серии аналогов верубулина, полученных путем замены его метилхиназолиновой группировки фрагментом циклической изотиомочевины, аннелированной с различными алициклами. Реализован синтез новой серии бициклических аналогов N,N-дизамещенных 2-аминотиазолинов с ингибирующей активностью по отношению к бутирилхолинэстеразе.

Теоретическая и практическая значимость работы. В настоящем исследовании предложена эффективная схема синтеза бициклических изотиомочевин, применение которой позволяет нарабатывать целевые вещества в препаративных количествах. С помощью указанной схемы получена серия аналогов известных ингибиторов синтазы оксида азота, два из которых продемонстрировали выраженное антигипотензивное действие на модели эндотоксического шока *in vivo* с большей продолжительностью по сравнению с прототипами. Для синтезированного в работе аналога верубулина – $(\pm)$ -(3aR,8aS)-N-(4-Метоксифенил)-N-метил-3a,5,6,7,8,8a-гексагидро-4H-циклогепта[d]тиазол-2-амин гидробромида – в концентрации 10мкМ продемонстрирована выраженная антимиотическая активность по отношению к клеткам карциномы A549, не связанная с воздействием на тубулин. Метод ограничения конформационной подвижности и гомологизации, примененный в работе для модификации известных соединений структурного класса N,N-дизамещенных 2-аминотиазолинов позволил получить их аналоги с улучшенными характеристиками – большей ингибиторной активностью по отношению к бутирилхолинэстеразе и меньшей цитотоксичностью.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Препаративно удобным способом синтеза бициклических (аннелированных и мостиковых) изотиомочевин является внутримолекулярная циклизация производных N-циклоалкенил-тиомочевин с участием электрофильного реагента, а полученные этим способом $(\pm)$ -(3aR,7aS)-3a,4,5,6,7,7a-гексагидро-1,3-бензотиазол-2-амин и $(\pm)$ -(1R,5R,8R)-3-амино-2-тиа-4-азабицикло[3.3.1]нон-3-ен-8-ол обладают антигипотензивным действием на модели эндотоксического шока *in vivo*.
- В реакции N-(эндо-бицикло[3.3.1]нон-6-ен-3-ил)-N'-(*трет*-бутил)тиомочевины с бромом образуется $(\pm)$ -(1R,3R,4S,6R,8S)-4-бromo-N-*трет*-бутил-2-азатрицикло[4.3.1.0^{3,8}]декан-2-карбоксамид, а в реакции N-[(эндо-3-бицикло[3.3.1]нон-6-енил)метил]-N'-(*трет*-бутил)-тиомочевины с йодом в присутствии $^t\text{BuOOH}$ или K_2CO_3 образуются продукты внутримолекулярной циклизации с 4-азатрицикло[4.3.1.1^{3,8}]ундекановым ядром.
- $(\pm)$ -(3aR,8aS)-N-(4-Метоксифенил)-N-метил-3a,5,6,7,8,8a-гексагидро-4H-циклогепта[d]тиазол-2-амин гидробромид в концентрации 10мкМ обладает антимиотическим действием на опухолевые клетки A549 без воздействия на сеть их микротрубочек.
- В субмикромольном интервале концентраций N-бензил-N-(4-(*трет*-бутил)бензил)-2-амино-2-тиазолины с *цис*-аннелированными пяти-, шести- или семичленным алициклом ингибируют бутирилхолинэстеразу и не ингибируют ацетилхолинэстеразу.

Достоверность. Достоверность полученных результатов подтверждается систематической воспроизводимостью полученных экспериментальных данных, их верификацией, согласованностью полученных выводов с литературными источниками, использованием современных физико-химических методов анализа.

Личный вклад автора. Автором проведен поиск и анализ литературных данных с последующей систематизацией в литературном обзоре. Лично выполнен синтез всех описанных веществ, проведены обработка и интерпретация полученных физико-химических, а также анализ данных биотестирования. Автор принимал участие в разработке всех синтетических схем, а также в формировании и подготовке материалов к публикации в научных журналах и представлении докладов по тематике диссертационной работы на конференциях.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 печатных работ, в том числе 6 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus, RSCI) и рекомендованных в диссертационном совете МГУ по специальности 02.00.16 – “Медицинская химия” и 02.00.03 – “Органическая химия”, и 11 тезисов докладов на российских и международных конференциях. Во всех работах вклад автора является определяющим.

Апробация работы. Основные результаты были представлены в виде стендовых и устных докладов на следующих конференциях: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2020", "Ломоносов-2021", "Ломоносов-2022", VIII Молодежная конференция ИОХ РАН (Москва 2019); Пятая международная научная конференция, “Advances in synthesis and complexing” (Москва, 2019); XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Санкт-Петербург, 2019); 4-я Всероссийская конференция по медицинской химии с международным участием “MedChem Russia”, (Екатеренбург, 2019); II Научная конференция молодых ученых с международным участием “Актуальные исследования в фармакологии” (Москва, 2021); 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием “МедХим-Россия 2021” (Волгоград, 2022).

Объем и структура диссертации: Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введения, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения результатов, заключения и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 127 страницах машинописного текста, содержит 44 рисунка, 35 схем химических реакций и 3 таблицы. Список литературы включает 124 наименования.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность тематики исследования, которой посвящена диссертационная работа, сформулированы цели и задачи, описаны научная новизна и практическая значимость полученных результатов, а также указаны конференции, на которых были представлены результаты работы с целью ее апробации.

Обзор литературы посвящен анализу работ по «рациональному» применению фрагмента циклических изотиомочевин (с эндоциклическим атомом серы) в дизайне структур лекарственных веществ, и включает в себя примеры биоизостерической замены, конформационного ограничения и др. с участием указанных группировок. Обсуждаются также синтетические подходы к получению циклических и бициклических изотиомочевин. В обзоре представлены интересные примеры попыток применения рассматриваемых фрагментов для создания веществ с нейропротекторной, антигипотензивной, антипролиферативной, анальгетической и другими видами активности.

В **Экспериментальной части** представлены методики синтеза целевых и промежуточных соединений, данные, полученные методами ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии, масс-спектрометрии, а в некоторых случаях –ИК спектроскопии, рентгеноструктурного анализа и элементного анализа; кратко описаны методы проведения молекулярного моделирования и биотестирования.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1.1. Создание антишоковых агентов пролонгированного действия на основе циклических изотиомочевин

Моноциклические изотиомочевины 2-амино-2-тиазолин (**A**, рис. 1) и 2-амино-5,6-дигидро-4H-1,3-тиазин (**B**) проявляют выраженное, но краткосрочное антигипотензивное, антишоковое и радиопротекторное действие за счет способности ингибировать синтазу оксида азота (главным образом, индуцибельную, и, в меньшей степени, эндотелиальную изоформы фермента). Попытка увеличить продолжительность их действия путем увеличения липофильности за счет введения коротких алкильных заместителей в исходные молекулы привела к ограниченному успеху, – максимум двукратной пролонгации по сравнению с молекулой **A**. Целью настоящего исследования стало получение аналогов соединений-лидеров с еще более продолжительным действием, что достигалось увеличением липофильности за счет включения моноцикла в аннелированную, мостиковую или каркасную структуру (см. структуры **C**, **D** и **E** на рис. 1).

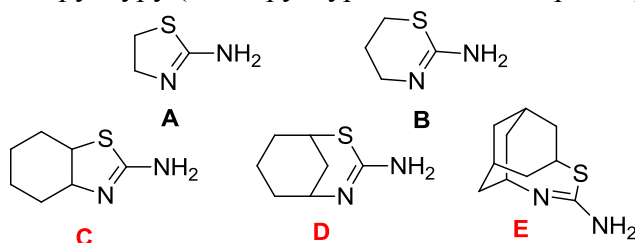


Рисунок 1. Соединения-лидеры – моноциклические изотиомочевины 2-амино-2-тиазолин (**A**) и 2-амино-5,6-дигидро-4H-1,3-тиазин (**B**) и их более липофильные аналоги **C**, **D** и **E**.

2-Тиа-4-азабицикло[3.3.1]нон-3-ен-3-амин (Рисунокрис. 1, структура **D**) был ранее получен на химическом факультете МГУ и оказался эффективным ингибитором индуцибельной изоформы синтазы оксида азота *in vitro* [1]. Однако синтез этого соединения включал в себя реализацию трудоемкой шестистадийной схемы (включающей в себя в качестве ключевых стадий циклизацию *транс*-3-бromoциклогексиламина с сероуглеродом с последующей модификацией тиокарбонильного фрагмента), некоторые стадии которой проходят с очень низкими выходами [1]. На основании анализа литературных данных мы предложили для синтеза полициклических изотиомочевин **C**, **D** и **E** другую, более удобную в препаративном отношении схему, с использованием в качестве ключевой стадии реакции циклизации тиомочевинного фрагмента по двойной связи с участием электрофильного реагента (схема 1). Изучение возможности реализации этих схем, их эффективности в препаративном плане и масштабирование продуктов для тестирования *in vivo* проводилось в данной работе.

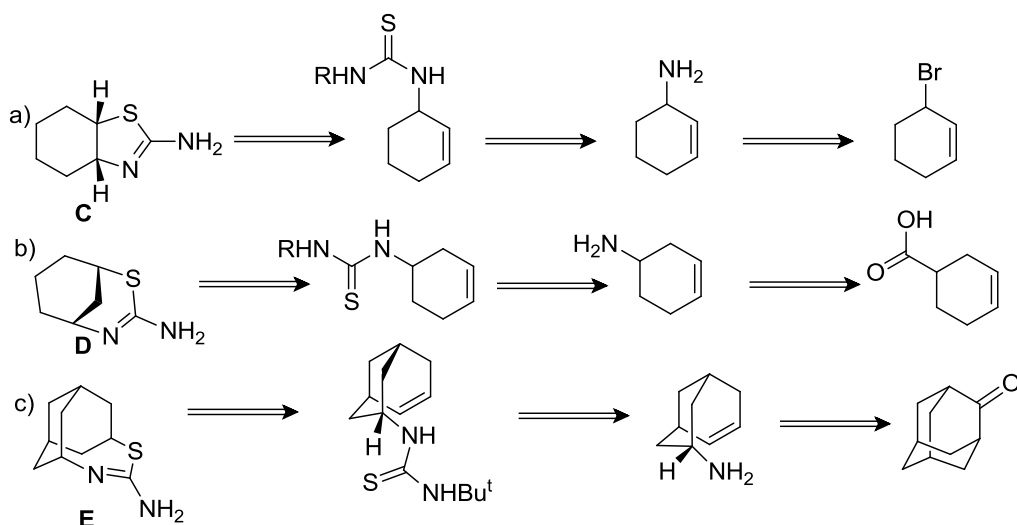


Схема 1. Ретросинтетические схемы получения полициклических изотиомочевин **C**, **D**, **E**

1.1.1. Синтез бициклических аналогов 2-амино-2-тиазолина

На первом этапе мы синтезировали серию 2-амино-2-тиазолинов, аннелированных с циклогексановым кольцом (см.рис. 1, общая формула **C**). Докинг простейшего структурного шаблона **C** (AutoDock Vina 1.1.2) в трехмерную модель активного центра iNOS (PDB ID: 2NSI) [2], показал, что расположение изомеров с *цис*-(3aR,7aS) и *транс*-(3aS,7aS) сочленением колец близко друг другу и позиции сокристаллизованному с iNOS ингибитору этилизотиомочевине (рис. 2). Этот результат согласуется с данными литературы об iNOS ингибиторной активности структурно близких изомерных 4,5-диалкил-2-аминотиазолидинов.

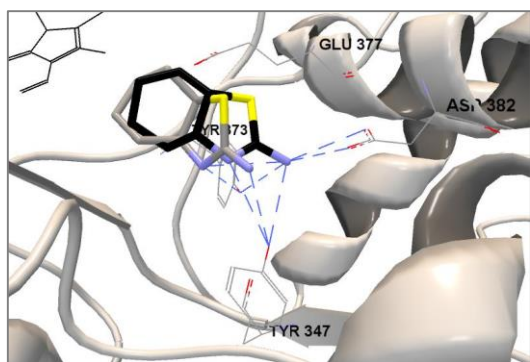


Рисунок 2. Расположение (3aR,7aS)- и (3aS,7aS)-3a,4,5,6,7,7a-гексагидро-1,3-бензотиазол-2-аминов (**C**) в активном центре iNOS.

Мы сконцентрировались на получении *цис*-лигандов и сначала получили незамещенное целевое соединение **7** (схема 3). В качестве исходного соединения использовали циклогекс-2-ен-1-амин **4**, который предварительно получали из 3-бромциклогексена **1** через соответствующее фталимидное производное **2** или 3-азидоциклогексен **3** (схема 2). Отметим, что второй путь синтеза циклогекс-2-ен-1-амина **4** (в виде гидрохлорида) оказался более эффективным в препаративном плане из-за большего суммарного выхода продукта.

Циклогекс-2-ен-1-амин **4** превращали в соответствующие *трет*-бутил- или бензоил- замещенные тиомочевин **5a,b**, которые затем вводили в реакцию циклизации. Попытка циклизации тиомочевин с одновременным удалением защитных групп кипячением в концентрированной водной HBr привела к образованию сложной смеси продуктов, выделить из которой целевые соединения не удалось.

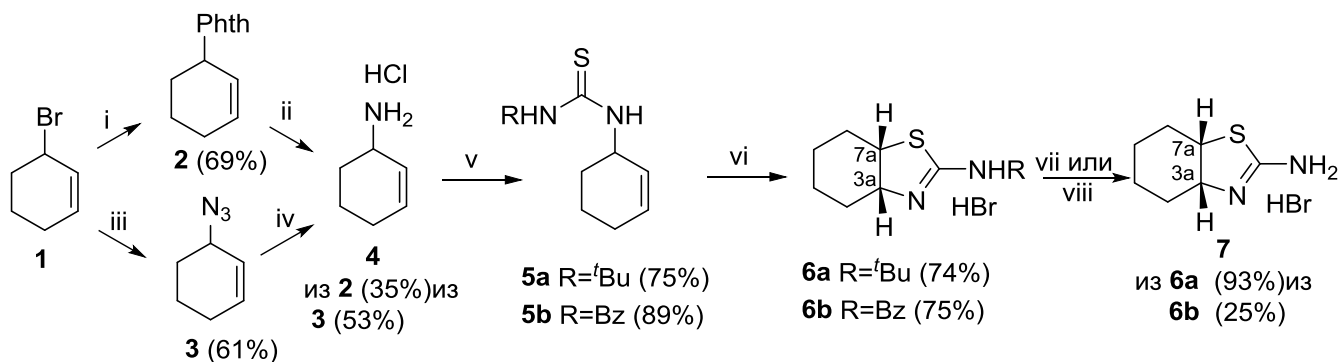


Схема 2. Реагенты и условия: i) фталимид калия, ДМФА, CH_2Cl_2 , 100°C , 12 ч; ii) $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, MeOH, Δ , 3 ч; iii) NaN_3 , $\text{H}_2\text{O}/\text{CCl}_4$, 20°C , 48 ч; iv) 1) LiAlH_4 , Et_2O , Δ , 56 ч, 2) H_2O , NaOH, 3) HCl; v) R-NCS , $i\text{-Pr}_2\text{NEt}$, CH_2Cl_2 , 20°C , 12 ч; vi) $\text{AcBr} + \text{MeOH}$, CH_2Cl_2 , 20°C , 12 ч; vii) $\text{HBr}_{\text{водн}}$, Δ , 3 ч; viii) DBU, MeOH, 20°C , 12 ч, затем $\text{HBr}_{\text{водн}}$. Обозначенная конфигурация является относительной, так как вещества представляют собой рацемические смеси.

Проведение циклизации в более мягких условиях путем обработки смесью ацетилбромид и метанола в хлористом метиле позволило получить гидробромиды замещенных гексагидро-1,3-бензотиазол-2-аминов **6a,b** с хорошими выходами (схема 2). Строение полученных структур подтверждено данными рентгеноструктурного анализа монокристалла бензоильного аналога **6b** (рис. 3)¹.

¹Представленные в настоящей работе данные рентгеноструктурного анализа предоставлены в.н.с. В.А. Тафеенко (кафедра общей химии химического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова) и проф. К.А. Лысенко (кафедра физической химии химического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова).

Отщепление защитных групп в соединениях **6a** и **6b** кипячением в водном HBr (для **6a**) или обработкой DBU в метаноле с последующим действием водного HBr (для **6b**) привело к целевому амину **7** (в виде гидробромида). Спектральные данные указывают на присутствие только одного таутомера соединения **7**, но не позволяют определить конкретную таутомерную форму (на схеме 2 и далее показана одна из возможных таутомерных форм).

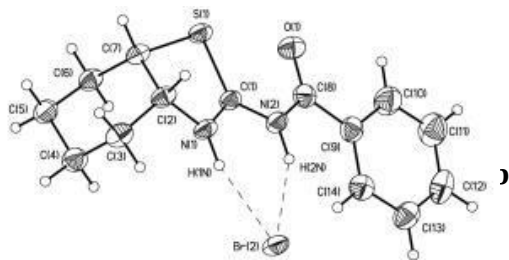


Рисунок 3. Общий вид молекулы **6b** в кристалле.

Следует подчеркнуть, что применение защитных групп (*трет*-бутильной или бензоильной) является необходимым этапом в ходе синтеза рассматриваемых бициклических изотиомочевин. Так, нами показано, что модельная реакция незамещенной циклогекс-2-ен-1-илтиомочевины **8** (полученной из соответствующего изотиоцианата) с эквивалентным количеством брома при 0°C приводит к сложной смеси продуктов.

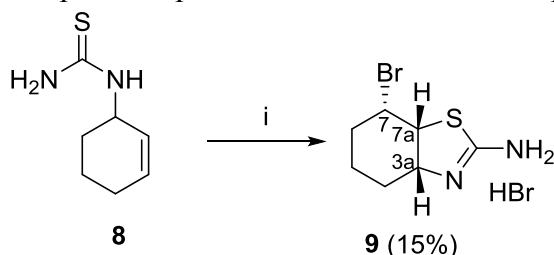


Схема 3. Реагенты и условия: i) Br₂, CHCl₃, 0°C, 0.5 ч (указана относительная конфигурация соединения **9**, так как соединение получено в виде рацемической смеси).

Дробное осаждение из диэтилового эфира позволило выделить только одно соединение с низким выходом, а именно гидробромид (3aRS,7SR,7aRS)-7-бromo-3a,4,5,6,7,7a-гексагидро-1,3-бензотиазол-2-амин (**9**) (схема 3), строение которого было доказано методом рентгеноструктурного анализа (рис. 4).

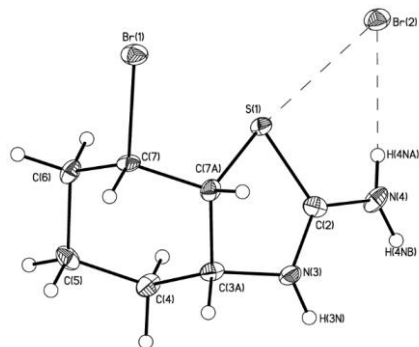


Рисунок 4. Общий вид молекулы **9** в кристалле.

Разработанная схема синтеза оказалась эффективной и удобной для масштабирования целевой циклической изотиомочевины **7**, и нами было проведено исследование возможности получения ее производных. Как следует из данных молекулярного докинга (рис. 2), атом C⁷ расположен вблизи ключевого амикислотного остатка Glu377. Это вызвало интерес к получению производного соединения **7** с гидроксильной группой в указанном положении. Мы осуществили циклизацию тиомочевин **5a,b** в присутствии брома или иода с последующим удалением защитных бензоильной или *трет*-бутильной групп от экзоциклического атома азота. Продукты циклизации **10a,b** и **11a,b** и их производные со свободной экзоциклической NH₂-группой были выделены в виде индивидуальных диастереомеров. Удаление *трет*-бутильного заместителя в **10a** при кипячении с HBr дало бромзамещенный гексагидро-1,3- бензотиазол-2-амин **12** в виде гидробромида. Дебензоилирование **10b** действием DBU в метаноле протекало с гораздо меньшим выходом и сопровождалось сложностями выделения целевого продукта **12** в индивидуальном виде. Иодозамещенный гексагидро-1,3-бензотиазол-2-амин **13** в виде гидробромида был получен из *трет*-бутильного производного **11a** аналогично соединению **12**, но с заметно меньшим выходом (схема 4).

Реакция восстановительного дегалогидирования для бромида **10a** и иодида **11a** нагреванием их с гидридом три-*n*-бутилолова привела к соединению **6c**, представляющее собой свободное основание соли **6a** (схема 5). Спектральные данные полученного встречным синтезом соединения **6c** служат дополнительным подтверждением *цис*-ориентации циклических фрагментов в продуктах **10a,b** и **11a,b**.

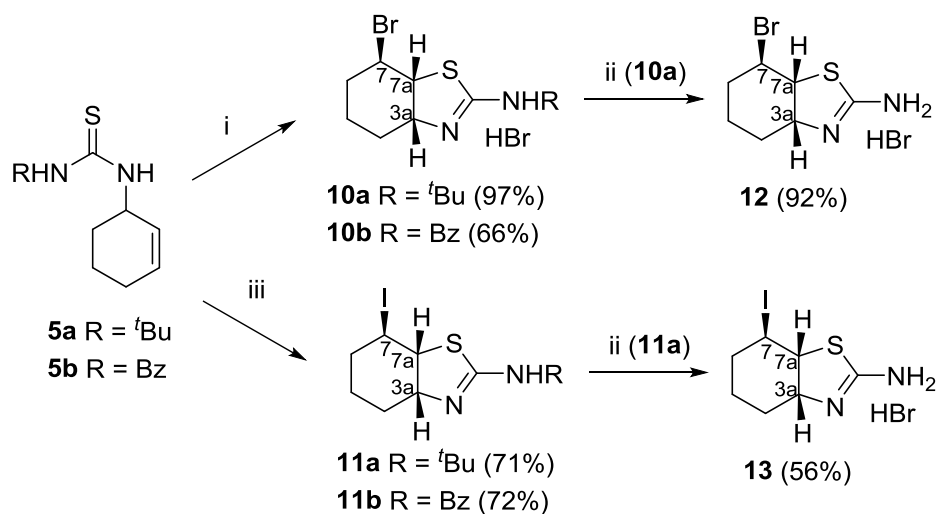


Схема 4. Реагенты и условия: i) Br₂, CH₂Cl₂, 20°C, 24 ч; ii) HBr_{водн}, Δ, 3 ч; iii) I₂, K₂CO₃, Et₂O, 20°C, 24 ч.

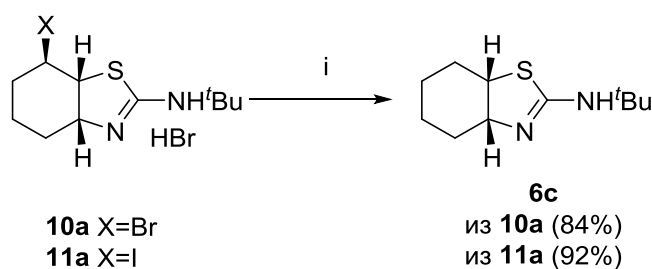


Схема 5. Реагенты и условия: i) 1) ⁿBu₃SnH, AIBN, PhCH₃, 100°C, 10 ч; 2) NaHCO₃(водн).

Из бром-замещенного амина **12** нами был с высоким выходом синтезирован соответствующий спирт **14** (схема 6) путем обработки исходного реагента суспензией PbO в воде (выбор реагента обусловлен указанием на низкий выход в аналогичной реакции гидролиза структурно близких субстратов с использованием раствора NaHCO₃). Интересно отметить, что спирт **14** получен в виде индивидуального диастереомера с *транс*-ориентацией гидроксила по отношению к конденсированному тиазолидиновому ядру, такой же, как в исходных бромпроизводных **10a** и **12**.

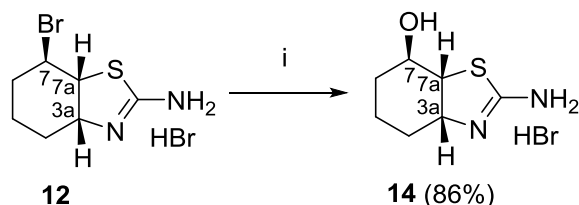


Схема 6. Реагенты и условия: i) PbO, H₂O, 50°C, 10 ч.

Отметим, что, хотя реакции нуклеофильного замещения, протекающие с сохранением конфигурации, известны, литературный поиск не выявил примеров подобных реакций для производных изотиомочевин. Сохранение конфигурации при превращении бромиды **12** в спирт **14** является следствием двойного обращения конфигурации в ходе нуклеофильного замещения, которое протекает, вероятно, при содействии гетероатомов и/или аминогруппы в соединении **12**. Эти группы могут координировать оксид свинца, участвующий в замещении атома брома, при этом происходит первое обращение конфигурации. Последующая нуклеофильная атака молекулой воды вызывает второе обращение конфигурации углеродного центра.

Для соединения **14** данные молекулярного докинга (AutoDock Vina 1.1.2) в модель активного центра iNOS показывают, что, хотя его дополнительная гидроксильная группа не образует водородных связей с белком, оно располагается практически так же, как и незамещенный лиганд **7**, а комплекс с ним имеет лучшее значение оценочной функции (рис. 5). Поэтому нами было принято

решение о масштабировании соединения **14** для изучения *in vivo*. Реализация синтеза галогенсодержащих бициклических изотиомочевин **12** и **13** вызвала вопрос о целесообразности их масштабирования и тестирования *in vivo*. Токсикологический профиль таких соединений обычно ухудшается, однако возможность введения в такие структуры определенной радиоактивной метки делает их (в случае проявления высокой активности) полезными в качестве «молекулярных инструментов» для изучения распределения и метаболизма вещества в организме.

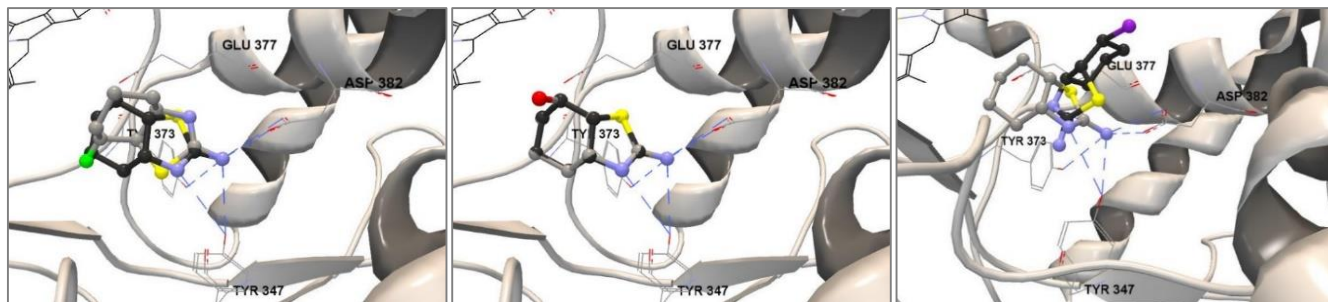


Рисунок 5. Расположение соединений **12**, **14** и **13** (слева направо) в активном центре iNOS (PDB ID: 2NSI) по данным молекулярного докинга (соединение **7** показано светло-серым для сравнения).

По данным докинга соединение **12** «перевернуто» в активном центре по сравнению с незамещенной изотиомочевинной **7**, но при этом образует многие из ключевых водородных связей с белком, в то время как в комплексе соединения **13** с ферментом иод-содержащий фрагмент «выходит» из сайта связывания, вызывая стерические затруднения (рис. 5). Учитывая эти данные, а также умеренный выход иод-замещенной изотиомочевины на стадии отщепления защитной группы, мы не масштабировали вещество **13**, в то время как соединения **7**, **12** и **14** были наработаны в препаративных количествах для проведения биотестирования *in vivo*.

1.1.2. Разработка препаративного метода синтеза 2-тиа-4-азабицикло[3.3.1]нон-3-ен-3-амина и его производных

Общая стратегия синтеза циклических изотиомочевин общей формулы **C** (рис. 1) была использована на втором этапе настоящей работы для получения производных общего структурного типа **D** (рис. 1), представляющего собой, как указывалось выше, производные ранее полученного мостикового тиазина, для которого ранее была доказана способность ингибировать iNOS в экспериментах *in vitro*. Исходное соединение для реализации новой схемы синтеза – трифторацетат циклогекс-3-ен-1-амина **15** – получали из 3-циклогексенкарбоновой кислоты по известной, реализуемой «one-pot» методике (схема 7).

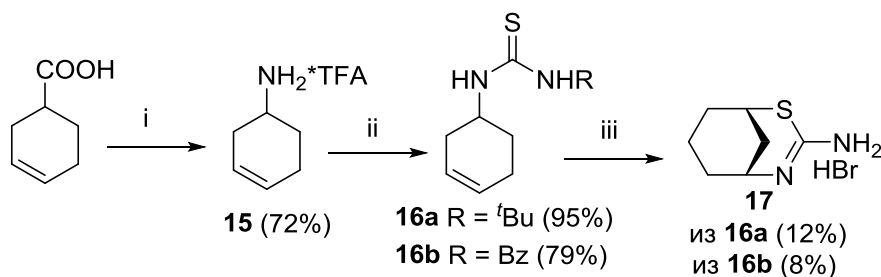


Схема 7. Реагенты и условия: i) 1) Voc_2O , NaN_3 , $^t\text{Bu}_4\text{NBr}$, $\text{Zn}(\text{OTf})_2$, 40°C , ТГФ, 2) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$, 20°C , 12 ч; ii) R-NCS , $^t\text{Pr}_2\text{NEt}$, CH_2Cl_2 , 20°C , 12 ч; iii) $\text{HBr}_{\text{водн}}$, Δ , 5 ч.

Амин **15** превращали в *трет*-бутил-(**16a**) или бензоилзамещенные (**16b**) тиомочевины, действием соответствующих изотиоцианатов. Попытки циклизации соединений тиомочевин в мягких условиях (аналогично таковому соединений структурного типа **C**) действием смеси AcBr/MeOH оказались неудачными: в реакционной смеси после нейтрализации были обнаружены только исходные тиомочевины. Поэтому реакцию проводили в более жестких условиях кипячением с водной бромистоводородной кислотой, что привело к одновременному гидролизу *трет*-

бутильной и бензоильной групп. Из образовавшейся сложной смеси продуктов в результате хроматографической очистки удалось выделить целевой продукт **17** с очень низкими выходами (схема 7). Для *трет*-бутил-замещенной тиомочевины **16a** суммарный выход соединения **17** по трем стадиям (из циклогекс-3-ен-1-карбоновой кислоты) равен 8%, что в четыре раза выше, чем по схеме, описанной в работе [1]. Однако, такой выход также не достаточен для масштабирования целевого продукта. Поэтому далее нами изучалась реакция 1-*трет*-бутил-3-циклогекс-3-ен-1-илтиомочевины **16a** с бромом по схеме 8. В результате бромирования и одновременной циклизации исходной тиомочевины получили индивидуальный диастереомер **18a**.

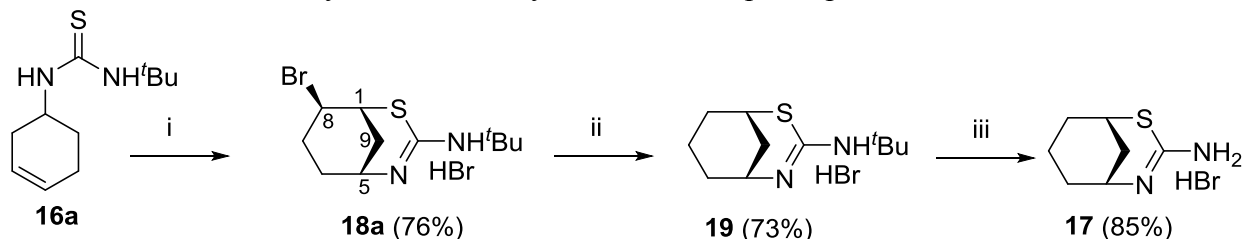


Схема 8. Реагенты и условия: i) Br_2 , CH_2Cl_2 , 20°C , 24 ч; ii) $^t\text{Bu}_3\text{SnH}$, AIBN, PhCH_3 , 100°C , 6 ч; iii) $\text{HBr}_{\text{водн}}$, Δ , 3 ч. (Указанная конфигурация является относительной, так как вещества представляют собой рацемические смеси).

Восстановительное дебромирование соединения **18a** в присутствии три-*n*-бутилового гидрида привело к соединению **19** и затем, после кипячения в водном растворе HBr – к целевой мостиковой тиомочевине **17** (схема 8). Все мостиковые соединения получены в виде индивидуальных таутомеров (на схемах представлена одна из возможных таутомерных форм). Суммарный выход вещества **17** в разработанной синтетической схеме из циклогекс-3-ен-1-карбоновой кислоты, составил 32%, что превысило выход этого соединения по сравнению с ранее описанной схемой (2%) в 16 раз.

Для получения замещенных производных мостиковой изотиомочевины **17** соединение **18a** нагревали в водном растворе HBr , что привело к гидробромиду (1*RS*,5*RS*,8*RS*)-8-бromo-2-тиа-4-азабицикло[3.3.1]нон-3-ен-3-амин **20**, а далее провели замещение атома брома обработкой PbO в воде (схема 9). Спирт **21** (в виде гидробромиды) был выделен в виде индивидуального диастереомера, в спектрах ЯМР ^1H которого характер расщепления и ширина сигналов ($\sim 8\text{--}9$ Гц) в интервале 3–5 м.д. полностью совпадали с таковыми для исходной бромзамещенной изотиомочевины **20**. То есть нуклеофильное замещение в соединении **20** в системе $\text{PbO}/\text{H}_2\text{O}$ протекает с сохранением конфигурации, аналогично таковому для аннелированной бициклической изотиомочевины **12**.

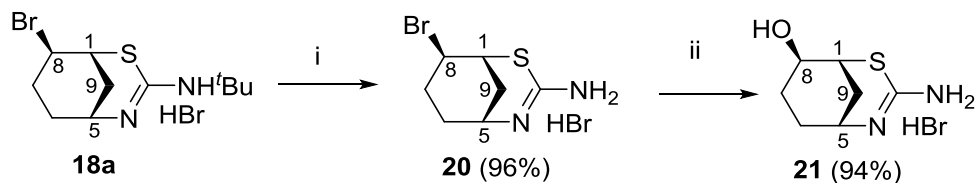


Схема 9. i) $\text{HBr}_{\text{водн}}$, Δ , 3 ч; ii) PbO , H_2O , 50°C , 10 ч. (Обозначенная конфигурация является относительной, так как вещества представляют собой рацемические смеси).

Разработанная эффективная схема синтеза целевых циклических изотиомочевин позволила наработать соединения **17**, **20** и **21** в препаративных количествах, достаточных для проведения биотестирования *in vivo*.

1.1.3. Изучение возможности синтеза трициклических (каркасных) изотиомочевин

На следующем этапе работы мы изучили возможность реализации ретросинтетической схемы, показанной на рис. 1, для получения целевых трициклических (каркасных) изотиомочевин общего структурного типа **Е**. Исходный *эндо*-бицикло[3.3.1]нонан-6-ен-3-амин гидрохлорид **23** получали из адамантанона, который действием азидата натрия в метансульфоновой кислоте превращали в бицикло[3.3.1]ноненкарбоновую кислоту **22**. Из кислоты **22** реакцией с

дифенилфосфорилазидом (ДФФА) получали азид, который *in situ* перегруппировывался в соответствующий изоцианат. Гидролиз последнего разбавленной соляной кислотой позволил получить гидрохлорид искомого амина **23** с удовлетворительным выходом (схема 10). Реакцией непереломленного амина **23** с *tert*-бутилизоцианатом была получена 1-[(1*RS*,3*SR*,5*SR*)-бицикло[3.3.1]нон-6-ен-3-ил]-3-*tert*-бутилтиомочевина **24**.

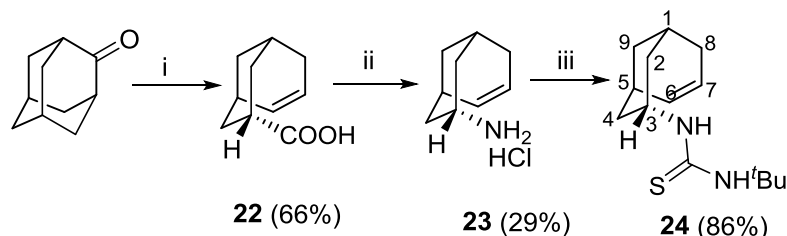


Схема 10. Реагенты и условия: i) 1) NaN₃, MsOH, 20°C, 2 ч, 2) NaOH, 3) HCl_{водн}; ii) 1) NEt₃, ксилол, (PhO)₂P(O)N₃, 10 ч, 2) 8% HCl_{водн}, CCl₄, Δ, 3 д.; iii) ^tPr₂NEt, ^tBuNCS, CH₂Cl₂, 20°C, 12 ч; (Указанная конфигурация является относительной, так как вещества представляют собой рацемические смеси).

Для мостиковой тиомочевина **24** далее изучали различные варианты циклизации с целью получения 4-тиа-6-азатрицикло[5.3.1.1^{3,9}]додекан-5-имина (рис.1, **E**). Попытки циклизации действием смеси AcBr/MeOH или кипячением с водной HBr оказались неудачными, а использование брома в качестве электрофильного реагента привело к смеси продуктов, в спектре ¹H ЯМР которой сигналов исходного соединения не обнаружилось. По данным хромато-масс-спектрометрии преобладающий продукт смеси (более 70%) имел молекулярную массу 315/317, кроме того, около 10% смеси составляло соединение с молекулярной массой 237. Попытки выделить преобладающий продукт с помощью перекристаллизации и методом колоночной хроматографии оказались неудачными, поэтому реакционную смесь нейтрализовали гидрокарбонатом натрия, и хроматографической очистке подвергли неионизованные продукты. В результате в индивидуальном виде с выходом 47% было получено соединение **25** (схема 11), которое по данным масс-спектрометрии высокого разрешения имеет состав C₁₄H₂₃BrN₂O (моноизотопная молекулярная масса = 315.1074) и не содержит в своем составе атома серы.

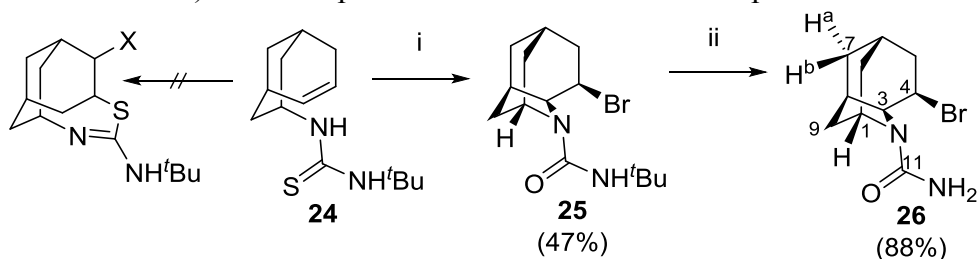


Схема 11. Реагенты и условия: i) 1) Br₂, CH₂Cl₂, 20°C, 24 ч; 2) NaHCO₃, H₂O; ii) HCl_{водн}, Δ, 16ч (Указанная конфигурация является относительной, так как вещества представляют собой рацемические смеси).

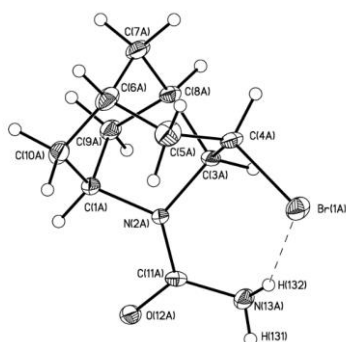


Рисунок 6. Общий вид молекулы **26** в кристалле.

Однозначное строение соединения **25** определили на основании данных рентгеноструктурного анализа продукта его гидролиза – соединения **26** (рис. 6). Структура **26** имеет другой (отличный от структурного типа **E**) тип каркаса и содержит не тиомочевинный, а мочевинный фрагмент.

Таким образом, внутримолекулярная циклизация мостиковой тиомочевина **24** проходит не по атому серы, как это наблюдалось для соединений **10** и **18**. Поскольку в реакционной смеси продуктов циклизации присутствует соединение с молекулярной массой 237, соответствующей продукту окисления исходной тиомочевина **24** до соответствующей мочевины, можно сделать вывод о том, что последняя образуется при взаимодействии брома с тиомочевина **24** в

присутствии следовых количеств влаги в реакционной смеси, а не в ходе дальнейшей её обработки. Механизм рассматриваемой реакции, вероятнее всего, включает в себя участие молекулы брома как в электрофильном присоединении к двойной связи (с образованием *транс*-дибромидного производного), так и в окислении тимочевинного фрагмента до мочевины с последующей внутримолекулярной циклизацией по атому азота с образованием производного мостиковой трициклической мочевины **25**. Поскольку подобные каркасные структуры не были описаны в литературе ранее, мы провели восстановительное дебромирование соединения **25** и (через промежуточный продукт **27**, схема 12) получили незамещенную мочевины с азатрицикло[4.3.1.0^{3,8}]декановым фрагментом (**28**). Это соединение принадлежит к новому структурному типу мостиковых трициклических мочевины.

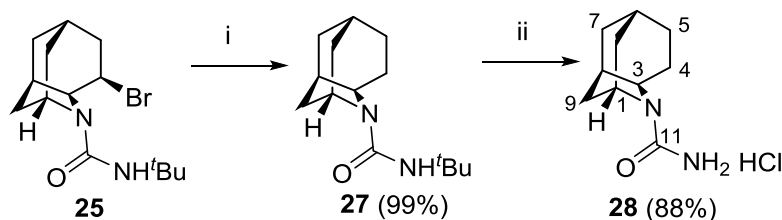


Схема 12. Реагенты и условия: i) $n\text{-Bu}_3\text{SnH}$, AIBN, толуол, 100°C, 6 ч; ii) $\text{HCl}_{\text{водн}}$, Δ , 16ч; (указанная конфигурация является относительной, так как вещества представляют собой рацемические смеси)

Далее мы изучили возможность циклизации гомолога мостиковой тиомочевины **24** (структура **30**, схема 13) в трициклическое производное изотиомочевины. Исходное соединение **30** было получено в две стадии из адамантанона, который с помощью перегруппировки Шмидта превращали в *эндо*-бицикло[3.3.1]нон-6-ен-3-карбонитрил и затем восстанавливали алюмогидридом лития до *эндо*-бицикло[3.3.1]ноненилметиламина **29**. Реакция амина **29** с *трет*-бутилизотиоцианатом привела к тиомочевине **30** (схема 13).

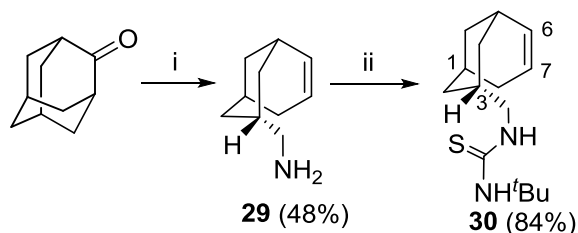


Схема 13. Реагенты и условия: i) 1) NaN_3 , MsOH , AcOH , 20°C, 2) LiAlH_4 , AlCl_3 , Et_2O , 3) NaOH , H_2O ; ii) $i\text{-Pr}_2\text{NEt}$, $t\text{-BuNCS}$, CH_2Cl_2 , 20°C, 12 ч. Указанная конфигурация является относительной, так как вещества представляют собой рацемические смеси.

Обработка тиомочевины **30** бромом привела к продукту присоединения галогена к двойной связи и окисления тиомочевинного фрагмента до мочевины – соединению **31**, при этом образования трициклической структуры не наблюдалось (схема 14).

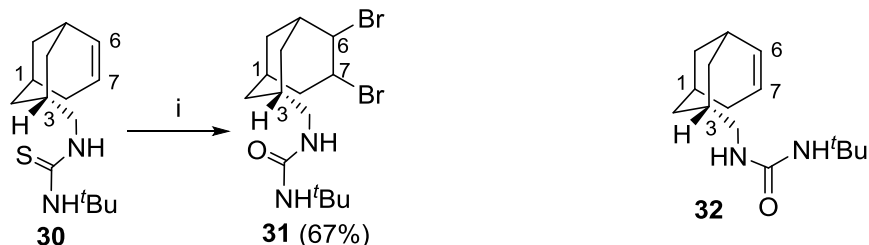


Схема 14. Реагенты и условия: i) Br_2 , CH_2Cl_2 , 20°C, 24 ч.

Попытка проведения внутримолекулярной циклизации через аналогичное соединению **31** иод-производное также не увенчалась успехом – по данным хроматомасс-спектрометрии преобладающим продуктом смеси (>70%) являлось соединение с m/z 251, что соответствует протонированному молекулярному иону $[\text{M}+\text{H}]^+$ соединения **32**.

Наконец, реакция тиомочевины **30** с иодом в присутствии *трет*-бутилгидропероксида (схема 15) привела к сложной смеси продуктов, из которой с помощью колоночной хроматографии в индивидуальном виде удалось выделить только соединение **33**, строение которого установлено методом рентгеноструктурного анализа (рис. 7).

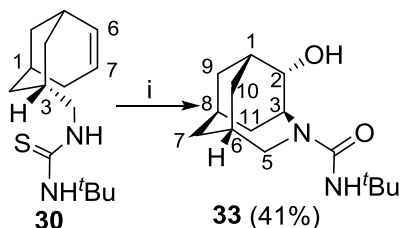


Схема 15. Реагенты и условия: i) I_2 , $t\text{-BuOOH}$, CH_2Cl_2 , 20°C , 24 ч. (Указана относительная конфигурация соединения **33**, полученного в виде рацемической смеси).

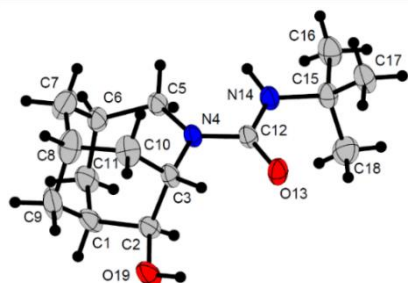


Рисунок 7. Общий вид молекулы **33** в кристалле.

По данным РСА, это вещество содержит трициклическое азагомадамантановое ядро с фрагментом мочевины (кольца бицикло[3.3.1]нонановой системы в каркасе соединения **33** принимают конформацию, близкую к «кресло – кресло», в то время как в соединении **26** она близка к «кресло – ванна» из-за конформационной жесткости дополнительного гетероцикла).

Наконец, мы провели реакцию тиомочевины **30** с иодом в присутствии K_2CO_3 в качестве основания (схема 16). Однако и в этом случае трициклическая изотиомочевина не была обнаружена в реакционной смеси, хотя два индивидуальных продукта удалось выделить после двукратного колоночного хроматографирования.

Соединения **33** и **34**, по всей вероятности, получаются в результате одновременной экзо-электрофильной атаки по двойной связи мостиковой тиомочевины **30** (эпоксидирования в случае соединения **33** или образования иодониевого иона в случае соединения **34**), окисления тиомочевинного фрагмента до мочевинового и последующего внутримолекулярного нуклеофильного замещения с образованием связи с атомом углерода C^7 и формированием азагомадамантанового каркаса. Этот процесс отличается от описанной выше циклизации гомологичной тиомочевины **24** (схема 11), затрагивающей C^6 атом углерода бициклической системы с образованием изоадамантановой структуры.

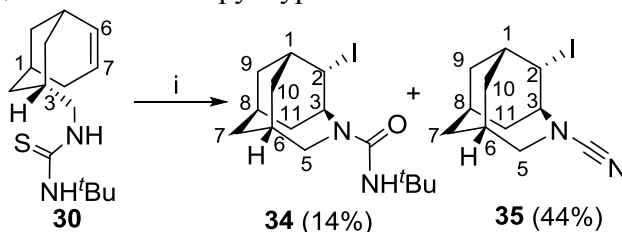


Схема 16. Реагенты и условия: i) I_2 , K_2CO_3 , CH_2Cl_2 , 20°C , 24 ч. (Обозначенная конфигурация является относительной, так как вещества представляют собой рацемические смеси).

Отметим, что образование N-карбонитрила **35**, по всей вероятности, является результатом отщепления защитной группы и дегидратации мочевиновой группировки соединения **34**, протекающей в присутствии основания.

Таким образом, из трех базовых синтетических схем, представленных на схеме 1, первые две были реализованы и доведены до удобства масштабирования продуктов, а соединения **7**, **12**, **14** и **17**, **20**, **21** наработаны в количествах, достаточных для проведения биотестирования *in vivo*. Трициклические производные изотиомочевин на основании разработанной синтетической стратегии получить не удалось. Однако, в ходе ее реализации было обнаружено интересное протекание реакции внутримолекулярной циклизации мостиковых изотиомочевин с образованием не описанного ранее структурного типа каркасных производных мочевины и N-карбонитрилов.

1.1.4. Результаты биотестирования серий аннелированных и мостиковых изотиомочевин¹

Антигипотензивные свойства гексагидро-1,3-бензотиазол-2-аминов **7**, **12** и **14** (в виде рацемических смесей) тестировали на крысах Wistar с острым эндотоксическим вазодилатационным шоком, стимулированным липополисахаридом. Анализ полученных соотношений *структура – антигипотензивная (антишоковая) активность* показывает, что закономерности для мостиковых изотиомочевин **17**, **20**, **21** отличаются от таковых для их аннелированных аналогов **7**, **12**, **14**. Однако, природа заместителя в обеих сериях играет ключевую роль в способности веществ вызывать прекращение состояния эндотоксического шока у экспериментальных животных. В первой серии наибольшую активность проявляет гидроксильрованный мостиковый тиазин **21**, а во второй – соединение **7** (для обоих соединений получено предварительное подтверждение iNOS-ингибирующего действия *in vitro*). Оба вещества не проявили негативного побочного действия, но аннелированный аналог оказался более эффективным.

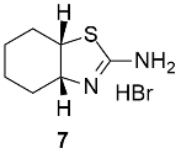
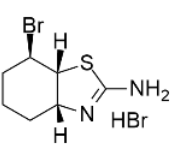
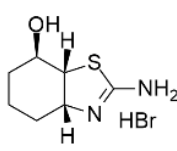
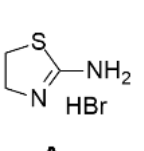
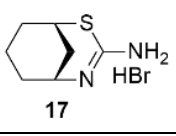
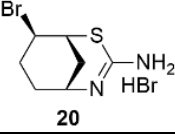
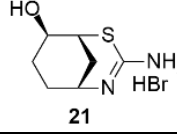
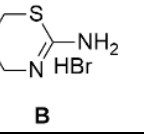
			
Длительное (минимум 90 мин) антигипотензивное действие без тенденции к снижению, частота дыхания и сердцебиение в норме	Кратковременное и слабое антигипотензивное действие с последующим непрерывным понижением давления, частота дыхания в норме	Дополнительная гипотензия, увеличение частоты дыхания, отдышка	Кратковременное (~30 мин) антигипотензивное действие
			
Дополнительная гипотензия, уменьшение частоты сердцебиения и дыхания	Сильная дополнительная гипотензия, уменьшение частоты сердцебиения и дыхания, мышечные спазмы	Длительное (минимум 90 мин) антигипотензивное действие, сердцебиение в норме	Кратковременное (~30 мин) антигипотензивное действие

Рисунок 8. Сводные данные тестирования *in vivo* (**A** и **B** – положительный контроль).

Лучший результат – значительное и продолжительное антигипотензивное действие без токсических побочных эффектов наблюдалось для гидроксильной замещенной мостиковой тиомочевин **21**, в то время как незамещенное базовое соединение **17**, для которого доказана высокая iNOS ингибиторная активность *in vitro*, вызывало дополнительную гипотензию на модели острого эндотоксического шока *in vivo*. Эти данные были подтверждены и в дополнительном тесте на модели продолжительной эндотоксемии (*refractory vasoplegia*). Неожиданное поведение *in vivo* для активного ингибитора iNOS *in vitro* может быть связано с взаимодействием с другими, отличными от iNOS молекулярными мишенями. Как и предполагалось, увеличение липофильности соединения **7** по сравнению с соединениями лидерами 2-амино-2-тиазолином (**3**, $n=1$) и 2-амино-5,6-дигидро-4H-1,3-тиазином (**3**, $n=2$) привело к существенно большей продолжительности его действия *in vivo*.

¹ Предоставлены сотрудниками медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба РАМН Е.А. Чеснаковой и д.х.н. М.В. Филимоновой.

1.2. Разработка противоопухолевых агентов с фрагментами бициклических изотиомочевин

Проведенная нами разработка удобной препаративной схемы получения бициклических изотиомочевин стимулировала дальнейшие попытки использования таких структурных шаблонов для дизайна соединений с другими видами биоактивности, в частности, противоопухолевых агентов. В настоящей работе в качестве молекулярной мишени действия таких соединений был выбран клеточный белок тубулин, среди описанных лигандов которого рассматриваемые структуры не упоминаются.

1.2.1. Аналоги верубулина на основе замещенных бициклических изотиомочевин

К настоящему моменту изучено множество лигандов колхицинового сайта тубулина как синтетических, так и полученных из природных источников. Тем не менее, использование таких соединений в противораковой терапии ограничивается единичными примерами из-за их слишком высокой общей токсичности при эффективных концентрациях или малой активности *in vitro* и/или *in vivo*. Попытки преодоления указанных недостатков стимулируют применение самых разнообразных, в том числе нестандартных подходов к созданию лигандов колхицинового сайта тубулина. Одним из таких подходов является замена ароматического фрагмента неароматическим. Такая замена применяется редко из-за резких различий их геометрических и электронных характеристик, и, как следствие, вероятной потери активности. Однако, в некоторых случаях такая замена может приводить к более активным аналогам (например, из-за более полного «заполнения» неароматической группировкой определенной области сайта связывания) или улучшать их фармакокинетические параметры. В литературе представлены успешные примеры использования замены ароматического – тиазольного или пиримидинового и др. – цикла фрагментом циклической изотиомочевин в ходе дизайна ингибиторов белок-белкового взаимодействия менин – MLL, лигандов рецепторов γ -аминомасляной кислоты и ингибиторов синтазы оксида азота. В данной работе мы провели аналогичную замену в структуре *Верубулина* (рис. 9) – активного, но не одобренного клинически лиганда колхицинового сайта тубулина, предложив для синтеза структуры **F** и **G** (рис. 9) с целью изучения потенциала циклических изотиомочевин в качестве тубулин направленных антимитотических агентов.

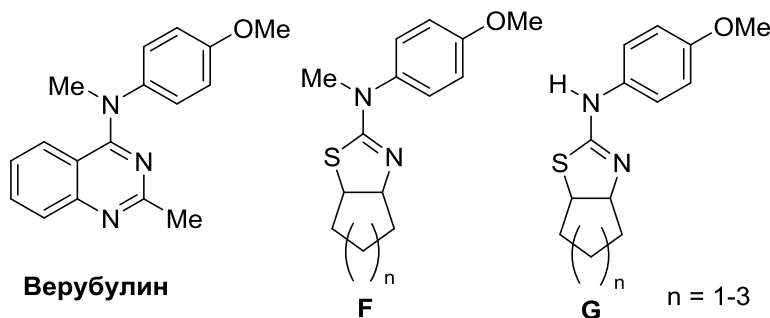


Рисунок 9. Структуры *Верубулина* и его аналогов общей формулы **F** и **G**, изученных в данной работе.

Для синтеза целевых веществ предполагалось использовать разработанную препаративную схему, ключевой стадией которой является внутримолекулярная циклизация соответствующих ненасыщенных замещенных тиомочевин.

Для синтеза исходных реагентов **36** – **41** нами была реализована серия последовательных реакций аллильного бромирования, нуклеофильного замещения и присоединения к соответствующему анизидину, проведенная для препаративного удобства без выделения промежуточных легколетучих бромидов и изотиоцианатов (схема 17). Это позволило получить целевые замещенные тиомочевин **36** – **41** (в виде рацемических смесей), в основном (кроме соединения **39**), с удовлетворительными выходами.

В результате обработки тиомочевин **36** – **38** смесью AcBr/MeOH одновременно протекала реакция электрофильного присоединения и внутримолекулярной циклизации с образованием конденсированных бициклических изотомочевин **42** – **44** (схема 18).

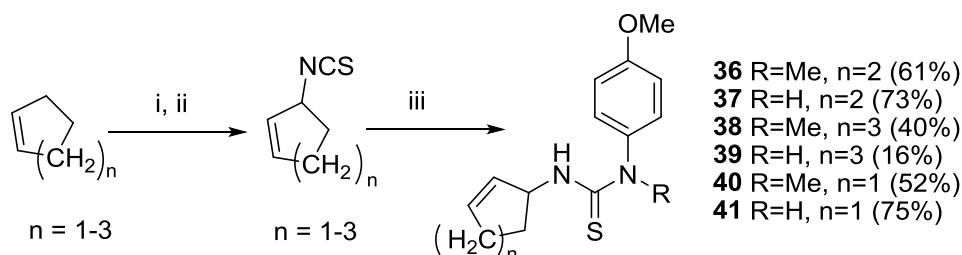


Схема 17. Реагенты и условия: i) NBS, AIBN, CCl₄, Δ, 1,5 ч; ii) KSCN, MeOH, 0–22°C, 2 ч; iii) 4-метоксианилин или 4-метокси-N-метиланилин, ⁱPr₂NEt, CH₂Cl₂, 22°C, 12ч. Соединения получены в виде рацемических смесей.

Процесс проходил диастереоселективно с образованием продуктов с *цис*-конфигурацией (как и для аналогичного процесса, описанного выше). Спектральные данные соединений **42** – **44** указывают на наличие одного таутомера, но не позволяют отнести его к конкретной форме. Следует отметить, что аналог соединения **44** с семичленным циклом, не содержащий метильного заместителя при экзоциклическом атоме азота, нам не удалось выделить в индивидуальном виде, поскольку в ходе соответствующей реакции для тиомочевин **39** образовывалась сложная смесь продуктов.

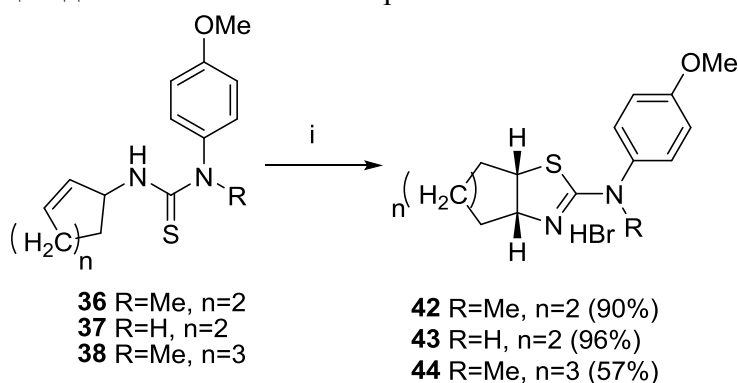


Схема 18. Реагенты и условия: i) AcBr, MeOH, 22°C, 24 ч. Указанная конфигурация является относительной, вещества получены в виде рацемических смесей.

Для синтеза изотиомочевин, конденсированных с пятичленными циклами, циклизацию тиомочевин **40** и **41** проводили более жестких условиях, а именно, в присутствии брома (схема 19).

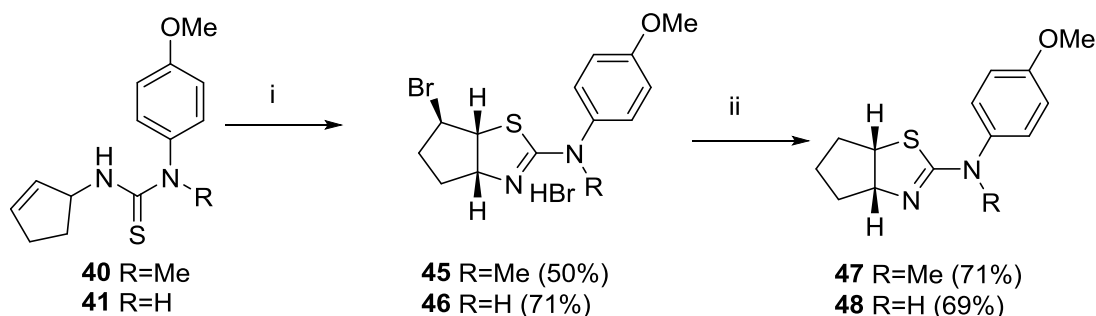


Схема 19. Реагенты и условия: i) Br₂, CH₂Cl₂, 22°C, 24 ч; ii) ⁿBu₃SnH, AIBN, PhCH₃, 100°C, 10 ч. Указанная конфигурация является относительной, вещества получены в виде рацемических смесей.

После хроматографирования реакционной смеси были выделены индивидуальные диастереоизомеры соединений **45** и **46**. Бромзамещенные производные **45** и **46** подвергли восстановительному дебромированию путем обработки гидридом три-*n*-бутилолова, что привело к

целевым изотиомочевинам **47** и **48**. Аналогично изотиомочевинам **42 – 44**, соединения **45, 46** и **47, 48** получены в одной таутомерной форме.

Изучение действия полученных изотиомочевин на опухолевые клетки карциномы легких человека A549¹ показало, что соединения с циклогексильным и цикlopентильным кольцами **42, 43** и **47, 48**, независимо от наличия или отсутствия в их структуре N-метильного заместителя, не оказывали никакого действия на клетки даже при высокой концентрации 100 мкМ. Для изотиомочевины **44**, конденсированной с семичленным циклом, была, однако, выявлена способность при 10 мкМ вызывать заметные изменения в морфологии клеток и остановку их деления, но без изменения сети микротрубочек (рис. 10).

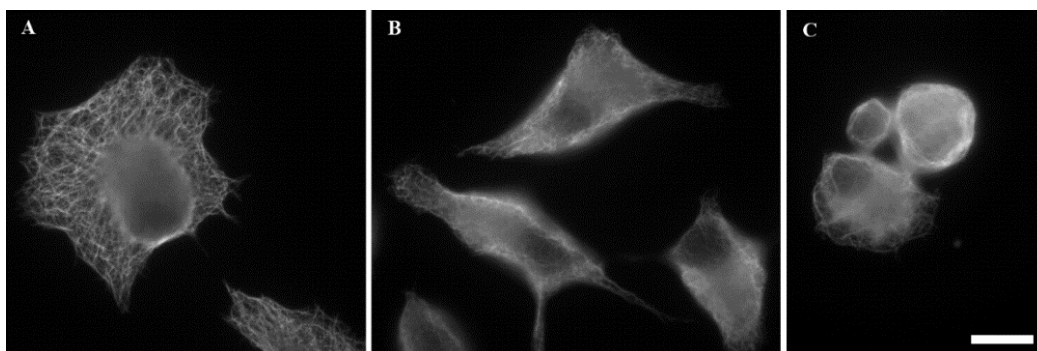


Рисунок 10. Иммунофлуоресцентная микроскопия клеток A549, обработанных в течение 24 ч А): 0.5% ДМСО (МТ в норме); В) - 10 мкМ **44** (МТ в норме, сокращение клеточной поверхности); С) – 100 мкМ **44** (МТ в норме, округление клеток). Шкала 10 мкм.

Это означает, что антимитотическое действие изотиомочевины **44** связано с воздействием не на тубулин, а на другую молекулярную мишень.

1.2.2. Бициклические изотиомочевины для синтеза конъюгатов с подофиллотоксином и колхицином

В рамках работ по созданию тубулин-направленных антимитотических агентов с фрагментами бициклических изотиомочевин нами изучены подходы к синтезу соединений **49** и **50** с целью их последующего конъюгирования с известными лигандами тубулина – подофиллотоксином (**51**) и колхицином (**53**) (рис. 11).

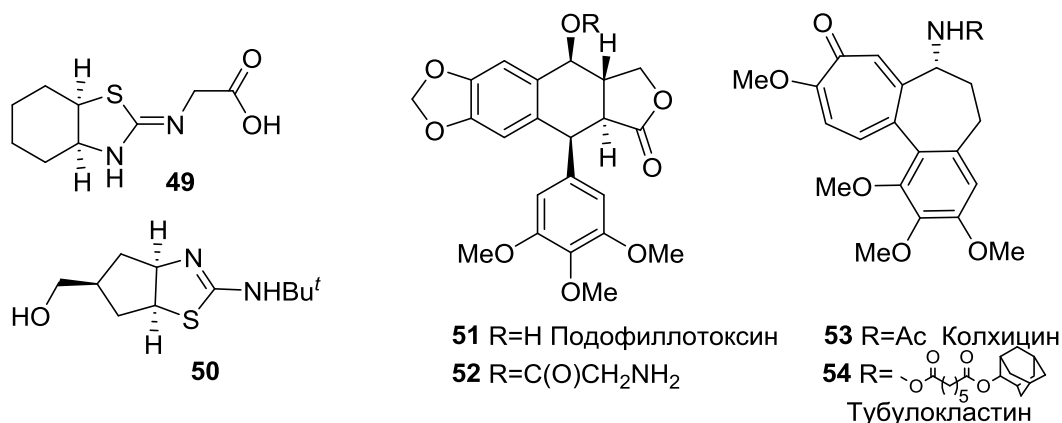


Рисунок 11. Структуры целевых бициклических изотиомочевин **49** и **50**, предложенных для конъюгирования с лигандами тубулина подофиллотоксином (**51**) и колхицином (**53**).

¹ Тестирование проведено в Институте биологических наук университета г. Росток (Германия) в научной группе д.х.н. С. А. Кузнецова.

Интерес к синтезу подобных соединений был обусловлен данными о селективности некоторых C^4 -производных подофиллотоксина и C^7 -производных колхицина с объемными липофильными заместителями по отношению к опухолевым клеткам[2]–[5], а также о необычном действии ряда таких конъюгатов на сеть микротрубочек опухолевых клеток. Кроме того, для серии аналогов тубулокластина (**54**), представляющих собой C^7 -производные колхицина с объемными неплоскими липофильными заместителями, показана корреляция необычного (кластеризующего) действия на микротрубочки с активностью и улучшением токсикологического профиля *in vivo* по сравнению с высоко токсичной природной молекулой.

Следует отметить, что введение объемного липофильного заместителя в молекулу подофиллотоксина или колхицина приводит к существенному уменьшению ее водорастворимости. Чтобы скомпенсировать это уменьшение, мы предложили в качестве заместителей фрагменты бициклических изотиомочевин, способных протонироваться (по крайней мере частично) при физиологическом pH и характеризующихся хорошим балансом липофильность – гидрофильность. Так как молекула подофиллотоксина содержит при C^4 спиртовую группу, была получена кислота **49** для последующего синтеза соответствующего сложного эфира. Для C^7 производного колхицина, представляющего собой аналог тубулокластина **54**, мы предложили в качестве заместителя структуру **50** с разветвленной липофильной группировкой и спиртовой группой, позволяющей присоединить к природной молекуле линкерную цепь определенной длины.

Основные подходы к синтезу целевого соединения **49** показаны на схеме 20. Попытки получить его путем циклизации циклогекс-3-ен-1-илтиомочевин **55** или **56** действием брома или HBr не увенчались успехом: хотя продукты циклизации **57** и **58** были выделены и охарактеризованы (схема 20, A), дальнейшее отщепление защитной группы провести не удалось.

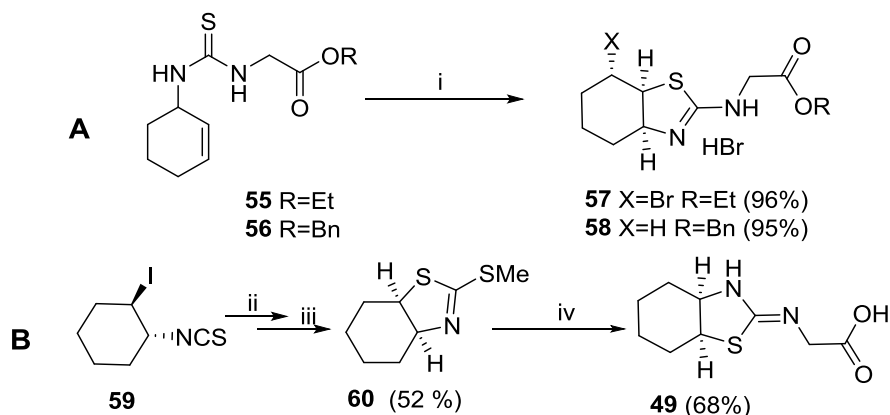


Схема 20. Реагенты и условия: i) для **55**: Br₂, CH₂Cl₂, 22°C, 8 ч или для **56**: AcBr, MeOH, CH₂Cl₂, 22°C, 12 ч; ii) Na₂S×9H₂O, ацетон, H₂O, 22°C, 45 мин; iii) 1) MeI, ацетон, Δ, 3 ч; 2) K₂CO₃; iv) глицин, MeOH, H₂O, Δ, 5 ч. Указанная конфигурация является относительной, вещества получены в виде рацемических смесей.

Поэтому мы провели циклизацию синтезированного из циклогексена иод-замещенного изотиоцианата **59** под действием сульфида натрия (схема 20, B), что привело к образованию требуемого бициклического темплата с тиокарбонильной группой. Дальнейшее метилирование с образованием соединения **60** и замещение тиометильной группы глицином привело к целевой гетероциклической кислоте **49**. Кислоту **49** ввели в реакцию этерификации с подофиллотоксином, однако, независимо от условий ее проведения, нам не удалось получить целевой сложный эфир. Попытка реализации «обратной» синтетической стратегии также оказалась неудачной: реакция глицинового сложного эфира подофиллотоксина **52** (полученного из природной молекулы в две стадии по описной методике) с соединением **60** не привела к образованию целевого конъюгата.

Более успешным оказался синтез конъюгата колхицина с изотиомочевинной **50**. Целевая изотиомочевина была получена в три стадии как показано на схеме 21. Сначала обработкой ((1S,4R)-4-аминоциклопент-2-ен-1-ил)-метанола *трет*-бутил изотиоцианатом синтезировали

соответствующую мочевины **61**. Циклизация последней под действием HBr не проходила, но в более жестких условиях – в присутствии брома – протекала гладко с образованием замещенной бициклической изотиомочевины **62** с *цис*-сочленением колец. Восстановительное дебромирование изотиомочевины **62** привело к целевому соединению **50**. Спектральные данные всех полученных циклических изотиомочевин указывают на образование одного таутомера, но не позволяют соотнести их с конкретной формой.

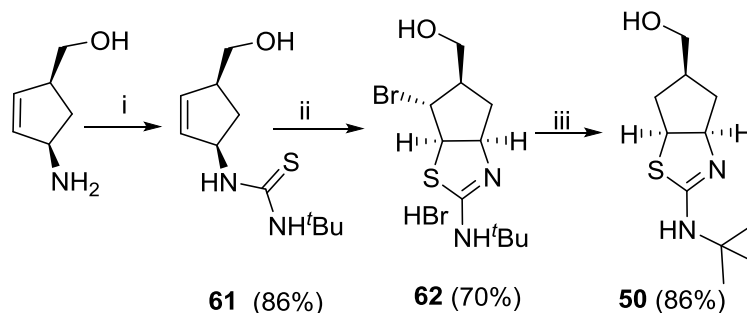


Схема 21. Реагенты и условия: i) $t\text{BuNCS}$, $t\text{Pr}_2\text{NEt}$, CH_2Cl_2 , 22°C , 12 ч; ii) Br_2 , CH_2Cl_2 , 22°C , 12 ч; iii) Bu_3SnH , PhCH_3 , AIBN , 100°C , 5 ч.

Далее нами был реализован синтез конъюгата колхицина с полученным спиртом **50**. Чтобы общая длина заместителя при C^7 в таком конъюгате была примерно равна таковой в тубулокластине (**54**), мы формировали сукцинамидную линкерную цепь (схема 22). Поэтому спирт **50** ввели в реакцию с янтарным ангидридом, получив моноэфир **63**. Отметим, что реакция протекала региоселективно: соответствующий *бис*-эфир не образовывался. Амидирование свободной кислотной группы в соединении **11** N-деацетилколхицином (полученным из колхицина по стандартной трехстадийной схеме) в присутствии EEDQ привело к целевому конъюгату **64** с общим выходом 21% (из исходного ((1*S*,4*R*)-4-аминоциклопент-2-ен-1-ил)метанола).

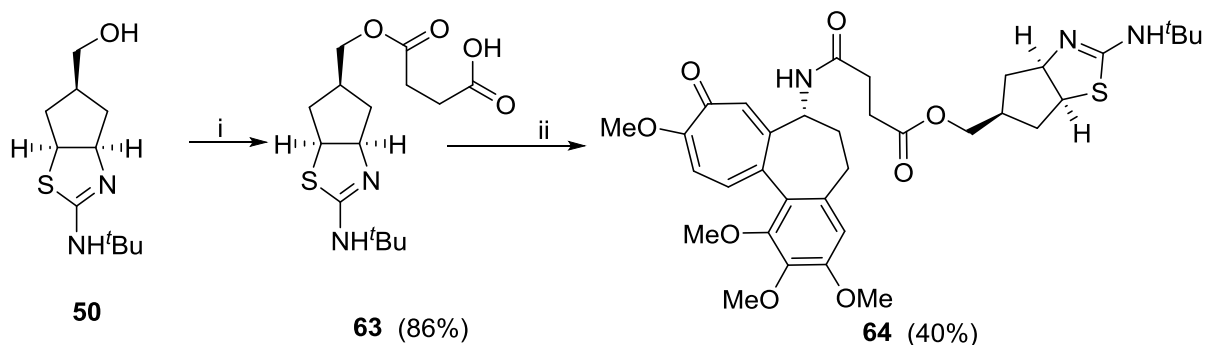


Схема 22. Реагенты и условия: i), ангидрид янтарной кислоты, ДМАП, CH_2Cl_2 , 22°C , 8 ч; ii) N-деацетилколхицин, EEDQ, CH_2Cl_2 , 22°C , 24 ч.

Первичный скрининг конъюгата **64** на селективность антимиотического действия по отношению к опухолевым клеткам по сравнению с клетками неопухолевой этиологии показал, что в концентрации 10 мкМ он продемонстрировал высокую цитотоксичность и двукратную селективность к клеткам карциномы легких человека A549 по сравнению с линией легочных фибробластов VA13.¹ Эти данные в сочетании с улучшенной растворимостью конъюгата **64** в воде по сравнению с тубулокластином (**54**) (в 1.5 – 2 раза по расчетам в программе ChemAxon) делает интересным дальнейшее биотестирование соединения **64**, включая изучение действия на микротрубочки опухолевых клеток.

¹ Здесь и далее данные скрининга на селективность антимиотического действия предоставлены с.н.с. кафедры химии природных соединений МГУ имени М.В.Ломоносова к.х.н. Д. А. Скворцовым.

1.3. Конформационно ограниченные аналоги *N,N*-дизамещенных 2-аминотиазолинов как потенциальные нейропротекторные агенты

Заключительный раздел представленной работы посвящен получению новой серии бициклических изотиомочевин с нейропротекторной активностью, действующих как ингибиторы фермента бутирилхолинэстеразы (BuChE). Из данных литературы известно, что рассматриваемый структурный тип оказался очень удачным в ходе разработки ингибиторов фермента бета-секретазы-1 (BACE 1): некоторые соединения были введены в клинические испытания в качестве средств для лечения болезни Альцгеймера. В последние годы, однако, в научных исследованиях наблюдается тенденция к созданию для терапии болезни Альцгеймера мультитаргетных агентов, что определяется сложностью этиологии указанного заболевания. Это обстоятельство вызвало интерес к литературному поиску производных циклических изотиомочевин среди лигандов других молекулярных мишеней, интересных для терапии нейродегенеративных состояний. Такой поиск выявил одну работу [3], в которой авторами путем скрининга серии *N,N*-дизамещенных 2-амино-5-галометил-2-тиазолинов выявлены вещества, обладающие умеренной ингибиторной активностью по отношению к бутирилхолинэстеразе. Наиболее активные соединения **65a,b** (рис. 12) ингибировали этот фермент в субмикромольном интервале концентраций ($IC_{50} = 2.34$ мкМ и 0.77 мкМ соответственно), и при этом проявляли к нему высокую селективность по сравнению с ацетилхолинэстеразой (AChE) [3][6].

Хотя бутирилхолинэстераза является известной молекулярной мишенью для компенсации дефицита ацетилхолина при болезни Альцгеймера, ни один BuChE ингибитор с высокой селективностью по отношению к AChE пока не одобрен для клинического применения. Это требует поиска новых структурных прототипов, а также оптимизации известных соединений, в том числе такой, чтобы на их основе можно было разрабатывать мультитаргетные агенты. В этом плане соединения **65a,b** являются перспективными и были выбраны в настоящей работе в качестве соединений-лидеров для дальнейшей оптимизации, которая и стала предметом проведенного исследования.

Оптимизация соединений-лидеров **65a,b** была направлена, в первую очередь, на увеличение их BuChE ингибиторной активности с сохранением высокой селективности. Для этого использовали классические методы дизайна лекарств, а именно конформационное ограничение и гомологизацию, часто позволяющие увеличить ингибиторную активность молекулы-лидера. Мы предложили для синтеза бициклические аналоги молекул **65a,b**, в которых вращение вокруг связи C5–CHal затруднено (рис. 12, общая формула **A**), причем степень жесткости введенной в алицикл связи варьировалась в зависимости от размера этого цикла. Дальнейший шаг в модификации структур **65a,b** предполагал получение аналогов соединений общей формулы **A**, не содержащих атом галогена (общая формула **B**, рис. 12), с целью компенсации увеличения липофильности при введении дополнительного цикла и улучшения токсикологического профиля исходных молекул.

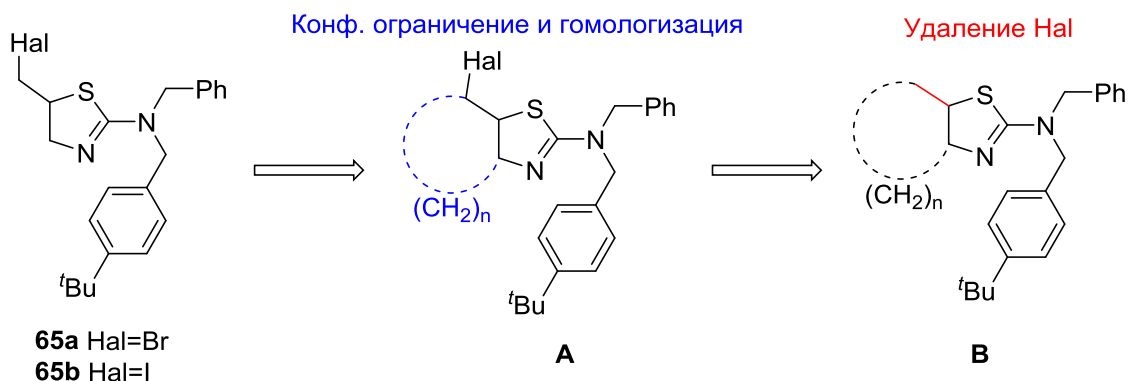


Рисунок 12. Молекулы-лидеры и пути их оптимизации, изученные в настоящей работе.

Ключевые исходные тиомочевины **66–68** были получены из *N*-бензил-1-(4-*tert*-бутилфенил)метанамина (Bn(*p*-*t*BuBn)NH) и соответствующих циклоалкенилизотиоцианатов

(схема 23), синтезированных по описанным выше методикам. Реакция циклоалкенилтиомочевин **66–68** с Br₂ или I₂ при комнатной температуре привела к бром- и иод-содержащим изотиомочевинам **69–71** и **72–74** с хорошими выходами (схема 24).

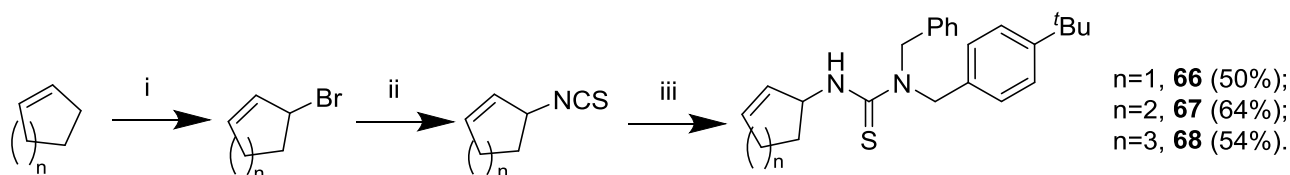


Схема 23. Реагенты и условия: i), NBS, AIBN, CCl₄, Δ, 1.5ч; ii) KSCN, MeOH, 22°C, 2h; iii) ^tPr₂NEt, Bn(*p*-^tBuBn)NH, CH₂Cl₂, 22°C, 12ч.

Все процессы, кроме реакции бромирования мочевины **66** ($n = 1$) с циклопентильным циклом, протекали диастереоселективно с преимущественным образованием изомеров с *транс*-ориентацией атома галогена по отношению к гетероциклическому фрагменту. Но в ходе синтеза вещества **69** ($n = 1$) был также выделен и охарактеризован его *цис*-изомер **69a** с выходом 41%.

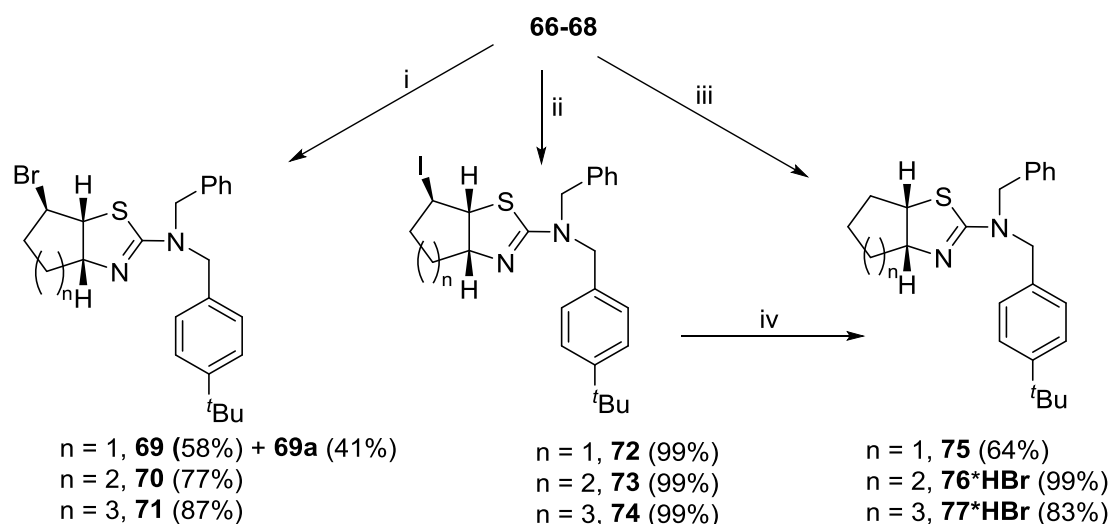


Схема 24. Реагенты и условия: i) 1) Br₂, CH₂Cl₂, 22°C, 12 ч; 2) NaHCO₃; ii) 1) I₂, CH₂Cl₂, 22°C, 12 ч, 2) NaHCO₃; iii) AcBr, MeOH, CH₂Cl₂, 22°C, 12 ч; iv) ⁿBu₃SnH, толуол, Δ. Указанная конфигурация является относительной, вещества получены в виде рацемических смесей.

Целевые соединения **76** и **77** ($n = 2$ и 3), не содержащие галогеновых заместителей в алициклах, получали обработкой мочевины **67** и **68**, дозированно образующимся *in situ* из метанола и

ацетилбромида бромоводородом, который в результате присоединения по двойной связи циклоалкенильного фрагмента вызывал процесс внутримолекулярной циклизации по атому серы. Мочевина **66** ($n = 1$) с циклопентильным циклом не вступала в реакцию циклизации ни в указанных условиях, ни в ходе кипячения с водной бромоводородной кислотой, поэтому целевое соединение **75** ($n = 1$) удалось получить только с помощью восстановительного деиодирования соответствующей иодбициклической изотиомочевины **72** ($n = 1$) обработкой ⁿBu₃SnH.

Тестирование¹ бициклических изотиомочевины **69–77** и **69a**, проведенное по отношению к человеческой изоформе AChE и BuChE лошади, показало, что все соединения ингибируют BuChE со значениями IC₅₀ в среднем наномолярном – низком микромолярном интервале концентраций, и при этом все обладают высокой селективностью по отношению к AChE.

¹ Результаты тестирования предоставлены к.х.н. Г.Ф. Махасовой (лаборатория молекулярной токсикологии Института физиологически активных веществ РАН, г. Черноголовка).

Анализ соотношений структура – активность показывает, что введение шестичленного цикла (**70**, **73**) в исходные молекулы **65a,b** уменьшает активность, в то время как введение семичленного цикла (**71**, **74**) увеличивает ее. Ингибиторные свойства соединений с дополнительным пятичленным циклом зависят от типа атома галогена: иод-содержащие производные (**72**) менее активны, чем **65b**, в то время как активность их бром-содержащих аналогов (**69** и **69a**) увеличивается в три раза по сравнению исходной молекулой **65a**. При этом конфигурация атома брома не играет существенной роли, так как значения IC_{50} для обоих диастереомеров **69** и **69a** очень близки.

Бициклические изотиомочевины, не содержащие атома галогена (**75–77**) показали наилучшую ингибирующую активность по отношению к BuChE в каждой гомологической серии, причем увеличение размера цикла **75 – 76 – 77** увеличивало эффективность ингибирования. Соединение **77** представляет собой наиболее активный ингибитор BuChE со значением IC_{50} , равным 130 нМ, что примерно в шесть раз больше, чем для молекулы-лидера **65b**. При этом соединение **77** сохраняет высокую селективность по отношению к AChE, что находится в соответствии с результатами молекулярного докинга двух возможных протонированных форм изотиомочевины **77** в активный центр BuChE и прилегающей области (PDB: 6R6W).

Проведенное в работе сравнение концентраций бициклической изотиомочевины **77** и ее иод-содержащего аналога **74**, вызывающих гибель 50% клеток линии MCF-10A (эпителиальные клетки молочной железы MCF-10A неопухоловой этиологии), показало, что они составляют $>>100$ мкМ и 62.0 ± 0.4 мкМ соответственно. Соединение **77** не проявило токсичности к фибробластам легких VA13 ($EC_{50} >> 100$ мкМ).

Таким образом, в данном исследовании нами предложена и успешно реализована стратегия первичной оптимизации малоизученного в дизайне нейропротекторных веществ структурного типа N,N-дизамещенных 2-аминотиазолинов, описанных в работе [3][6]. Полученный в работе циклогепта-[d]-тиазол-2-амин (**77**) представляет собой эффективный и нетоксичный ингибитор бутирилхолинэстеразы, очень селективный к этому ферменту по сравнению с ацетилхолинэстеразой. Это соединение представляет интерес для дальнейшей разработки на его основе мультитаргетных агентов для терапии болезни Альцгеймера.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Заключение и выводы

В ходе выполнения данной работы проведен молекулярный дизайн и синтез нескольких серий новых производных циклических изотиомочевин, и для каждой серии изучены зависимости *структура – активность* по отношению к определенной биологической мишени. Выявлены два вещества с антимитотической активностью, эффективный и селективный ингибитор бутирилхолинэстеразы с хорошим токсикологическим профилем, а также два эффективных антишоковых агента продолжительного действия.

На основании полученных результатов сделаны следующие выводы:

1) Для увеличения продолжительности антигипотензивного действия известных антишоковых агентов 2-амино-2-тиазолина и 2-амино-5,6-дигидро-4H-1,3-тиазина (ингибиторов синтазы оксида азота) предложены структуры их более липофильных аналогов, полученных путем «введения» моноцикла в аннелированную, мостиковую или каркасную структуру. Разработана и реализована эффективная препаративная схема синтеза соответствующих бициклических изотиомочевин с использованием в качестве ключевой стадии реакции внутримолекулярной циклизации N-циклоалкенил-замещенных тиомочевин с участием электрофильного реагента. Применение разработанной схемы позволило в 16 раз повысить общий выход одного из соединений серии – (±)-

(1S,5R)-2-тиа-4-азабицикло[3.3.1]нон-3-ен-3-амин – по сравнению с описанной в литературе методикой. Для (±)-(3aR,7aS)-3a,4,5,6,7,7a-гексагидро-1,3-бензотиазол-2-амин и (±)-(1R,5R,8R)-3-амино-2-тиа-4-азабицикло[3.3.1]нон-3-ен-8-ола продемонстрировано выраженное и продолжительное антигипотензивное действие *in vivo* на модели эндотоксического шока у экспериментальных животных.

2) Обнаружено необычное протекание реакции N-(эндо-бицикло[3.3.1]нон-6-ен-3-ил)-N'-(*трет*-бутил)тиомочевин с бромом, в ходе которого внутримолекулярная циклизация реализуется не по атому серы, а по атому азота предварительно окисленной до мочевины тиомочевинной группировки. Образующийся в ходе этой реакции продукт принадлежит к новому структурному типу каркасных трициклических производных мочевины. В реакции N-[(эндо-3-бицикло[3.3.1]нон-6-енил)метил]-N'-(*трет*-бутил)-тиомочевин с йодом в присутствии ^tBuOOH или K₂CO₃ получены продукты внутримолекулярной циклизации с 4-азатрицикло[4.3.1.1^{3,8}]ундекановым ядром.

3) Реализована многостадийная схема синтеза конъюгата тубулин-направленного агента колхицина с производным 3a,5,6,6a-тетрагидро-4H-циклопента[d]тиазол-5-ила и доказано его цитотоксическое действие в концентрации 10мкМ по отношению к клеткам карциномы легких A549. Синтезирована серия аналогов тубулин-направленного агента верубулина, полученных путем нестандартной замены метилхиназолиновой группировки исходной молекулы фрагментом циклической изотиомочевин, аннелированной с различными алициклами. Для (±)-(3aR,8aS)-N-(4-метоксифенил)-N-метил-3a,5,6,7,8,8a-гексагидро-4H-циклопента[d]тиазол-2-амин гидробромида продемонстрирована выраженная антимитотическая активность в концентрации 10мкМ по отношению к клеткам карциномы A549, не связанная с воздействием на тубулин.

4) Метод ограничения конформационной подвижности в сочетании с гомологизацией применен для оптимизации известных соединений структурного класса 5-бромометил- и 5-иодометил-N,N-дизамещенных-2-аминотиазолинов, – умеренно активных, но селективных (по сравнению с ацетилхолинэстеразой) ингибиторов бутирилхолинэстеразы. Реализован синтез предложенной серии циклических изотиомочевин, аннелированных с циклоалкановыми фрагментами. Показано, что все соединения полученной серии селективно ингибируют бутирилхолинэстеразу и продемонстрирована зависимость эффективности ингибирования от размера алицикла и природы заместителя в алициклическом фрагменте. Наиболее активное соединение серии – N-бензил-N-(4-(*трет*-бутил)бензил)-4,5,6,7,8,8a-гексагидро-3aH-циклопента[d]тиазол-2-амин гидробромид.

Цитируемая литература и комментарии

1. Zefirova, O. N.; Plotnikova, E. D.; Nurieva, E. V.; Peregud, D. I.; Onufriev, M. V.; Gulyaeva, N. V. Synthesis of 2-Thia-4-Azabicyclo[3.3.1]Non-3-En-3-Amine-Bridged Nitric Oxide Synthase Inhibitor with Enhanced Lipophilicity. *Mendeleev Commun.* 2013, 23 (2), 76–77. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2013.03.006>.
2. Все исследования с помощью компьютерного молекулярного моделирования выполнены совместно с ассистентом кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова к.х.н. **Н.А. Зефировым**.
3. Makhaeva, G. F.; Boltneva, N. P.; Lushchekina, S. V.; Serebryakova, O. G.; Stupina, T. S.; Terentiev, A. A.; Serkov, I. V.; Proshin, A. N.; Bachurin, S. O.; Richardson, R. J. Synthesis, Molecular Docking and Biological Evaluation of N,N-Disubstituted 2-Aminothiazolines as a New Class of Butyrylcholinesterase and Carboxylesterase Inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* 2016, 24 (5), 1050–1062. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.01.031>.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Научные статьи, опубликованные в журналах Scopus, Web of Science, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова по специальностям 02.00.16 – «Медицинская химия» и 02.00.03 – «Органическая химия»

1. Nurieva E. V.; Trofimova T. P.; **Alexeev A. A.**; Proshin A. N.; Chesnakova E. A.; Grishin Yu. K.; Lyssenko K. A.; Filimonova M. V.; Bachurin S. O.; Zefirova O. N. Synthesis and antihypotensive properties of 2-amino-2-thiazoline analogues with enhanced lipophilicity. *Mendeleev Communications*, **2018**, 28, 390-392. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2018.07.016>. IF =2.010 (WOS, 2018), Q2.
2. Evdokimova, A. V.; Alexeev, A. A.; Nurieva, E. V.; Milaeva, E. R.; Kuznetsov, S. A.; Zefirova, O. N. N-(4-Methoxyphenyl)-substituted bicyclic isothioureas: effect on morphology of cancer cells. *Mendeleev Communications*, **2021**, 31, 3, 288-290. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2021.05.003>. IF =1.786 (WOS, 2020), Q2.
3. Nurieva, E. V.; **Alexeev, A. A.**; Grishin, Yu. K.; Tafeenko, V. A.; Zefirova, O. N. New compounds with 4-azatricyclo[4.3.1.1(3,8)]undecane framework. *Mendeleev Communications*, **2020**, 30, 2, 145-146, <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2020.03.004>. IF =1.786 (WOS, 2020), Q2.
4. **Alexeev, A. A.**; Nurieva, E. V.; Trofimova, T. P.; Chesnakova, E. A.; Grishin, Yu. K.; Lyssenko, K. A.; Filimonova, M. V.; Zefirova, O. N. Bicyclic bridged isothioureas: synthesis and evaluation of activity in a model of lipopolysaccharide-induced septic shock. *Mendeleev Communications*, **2019**, 29, 1, 14-16. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2019.01.003>. IF =1.694 (WOS, 2019), Q2.
5. **Alexeev, A. A.**; Nurieva, E. V.; Lyssenko, K. A.; Grishin, Yu. K.; Zefirova, O. N. Novel structural type of bridged urea derivatives bearing azatricyclo[4.3.1.0(3,8)]decane moiety. *Structural Chemistry*, **2019**, 30, 2, 473-479. <https://doi.org/10.1007/s11224-018-1252-8>. IF =2.081 (WOS, 2019), Q3.
6. Nurieva, E. V.; **Alexeev, A. A.**; Zefirova, O. N. Cyclic Isothiourea in Drug Design. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, **2021**, 57, 9, 889-899. <https://doi.org/10.1007/s10593-021-02996-2>. IF =1.277 (WOS, 2020), Q4.

Другие публикации:

1. **Алексеев А. А.**; Нуриева Е. В.; Зефирова О. Н. Разработка эффективной методики синтеза полициклических изотиомочевин. *VIII Молодежная конференция ИОХ РАН. Сборник тезисов докладов*. Москва, **2019**, с. 78.
2. **Alexeev A. A.**; Nurieva E. V.; Zefirova O. N. Novel structural type of bridged urea derivatives. *Advances in syn-thesis and complexing. Book of abstracts. The Fifth International Scientific Conference*. Moscow, **2019**, V. 1, P. 98.
3. **Алексеев А. А.**; Нуриева Е. В.; Зефирова О. Н. Новые конформационно ограниченные аналоги 2-амино-1,3-тиазолина как ингибиторы холинэстераз. *XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Сборник тезисов в 6 томах*. Санкт-Петербург, 9–13 сентября, **2019**, Т. 5, с. 130.
4. **Alexeev A. A.**; Zefirov N. A.; Kuznetsov S. A.; Nurieva E. V.; Zefirova O. N. Structural manipulations with lipophilic moieties. *4th Russian Conference on Medicinal Chemistry with international participants MedChem Russia 2019. Abstract book* Ekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2019, с. 136.
5. **Алексеев А. А.**; Нуриева Е. В.; Филимонова М. В.; Зефирова О. Н. Молекулярный дизайн, синтез и биотестирование бициклических изотиомочевин с пролонгированным антигипотензивным действием. *II Научная конференция молодых ученых с международным участием «Актуальные исследования в фармакологии»*. Тезисы докладов. Москва, 2021, с. 54.
6. Евдокимова А. В.; **Алексеев А. А.** Бициклические изотиомочевины как потенциальные радиопротекторные и противоопухолевые агенты. *Материалы XXVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2020», секция «Химия»*

[Электронный ресурс] отв. ред. Н. А. Коваленко, А. В. Дзюбан – М.: Издательство «Перо», Москва, **2020**, с. 763.

7. Евдокимова А. В.; **Алексеев А. А.**; Нуриева Е. В.; Зефирова О. Н. Синтез бициклических изотиомочевин и изучение их действия на морфологию опухолевых клеток. *Материалы XXVIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2021», секция «Химия»*. [Электронный ресурс] отв. ред. Н. А. Коваленко, А. В. Дзюбан – М.: Издательство «Перо», Москва, **2021**, с. 566.

8. Елисеев И. А.; Боровик А. Н.; **Алексеев А. А.**; Нуриева Е. В.; Зефирова О. Н. Новые производные подофиллотоксина и эпи-подофиллотоксина с N,S-содержащими гетероциклическими фрагментами. *Материалы XXIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2022», секция «Химия»*. [Электронный ресурс] отв. ред. Н. А. Коваленко, А. В. Дзюбан – М.: Издательство «Перо», Москва, **2022**, с. 424.

9. Евдокимова А. В.; **Алексеев А. А.**; Елисеев И. А.; Зефиров Н. А.; Нуриева Е. В.; Зефирова О. Н. Молекулярное моделирование и синтез новых селективных ингибиторов бутирилхолинэстеразы на основе циклических изотиомочевин. *Материалы XXIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2022», секция «Химия»*. [Электронный ресурс] отв. ред. Н. А. Коваленко, А. В. Дзюбан – М.: Издательство «Перо», Москва, **2022**, с. 484.

10. **Алексеев А. А.**; Елисеев И. А.; Боровик А. Н.; Нуриева Е. В.; Зефирова О. Н. Конъюгат колхицина с фрагментом бициклической изотиомочевины. *Материалы XXIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2022», секция «Химия»*. [Электронный ресурс] отв. ред. Н. А. Коваленко, А. В. Дзюбан – М.: Издательство «Перо», Москва, **2022**, с. 485.

11. **Alexeev, A. A.**; Evdokimova, I. A.; Eliseev, I. A.; Nurieva, E. V.; Milaeva, E. R.; Kuznetsov S. A.; Zefirova O. N. Application of bicyclic isothioureia moiety for the design of new anticancer agents. 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021»: материалы конференции, Волгоград, 2022– Волгоград: Издательство ВолгГМУ, **2021**, с. 379.