

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

На правах рукописи

Прошин

Прошин Алексей Николаевич

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ  
НОВЫХ ЛИПОФИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ИЗОТИОМОЧЕВИНЫ

02.00.03 — органическая химия

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва, 2004.

**Работа выполнена в ИФАВ РАН**

Научный руководитель: кандидат хим. наук С.Е. **Ткаченко**

Научный консультант: член-корреспондент РАН, доктор хим. наук, профессор С.О. Бачурин

Официальные оппоненты:

доктор хим. наук, профессор **М.М. Краюшкин**

кандидат хим. наук **А.Ю. Аксиненко**

Ведущая организация:

**Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН.**

Защита диссертации состоится 22 октября 2004 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета К 002.102.01 в ИФАВ РАН по присуждению ученой степени кандидата химических наук по адресу: Черноголовка, Северный проезд 1, ИФАВ РАН.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИФАВ РАН.

Автореферат разослан 20 сентября 2004 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета ИФАВ РАН,  
кандидат биологических наук



Киреева

## Общая характеристика работы.

### Актуальность проблемы.

Статистические данные последних лет дают основание считать возраст-зависимые нейродегенеративные расстройства, например болезнь Альцгеймера (БА), наряду с сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями, наиболее серьезной медико-социальной проблемой в развитых странах. В этой связи разработка и осуществление стратегии направленного синтеза новых оригинальных нейропротекторов и стимуляторов когнитивных функций является одной из приоритетных задач современной органической химии лекарственных средств (медицинской химии).

Среди широкого спектра различных подходов к созданию препаратов с нейропротекторными и когнитивно-стимулирующими свойствами особое внимание в последние годы уделяется различным лигандам глутаматэргической системы. Действие препаратов на их основе направлено на нормализацию кальциевого гомеостаза в клетках, регулируемого глутаматными рецепторами. Так, Мемантин — избирательный антагонист глутаматных рецепторов NMDA-подтипа, т. е. рецепторов, которые реагируют на специфическое связывание **N-метил-D-аспарагиновой** кислоты (NMDA), является единственным препаратом, рекомендованным для лечения болезни Альцгеймера на развитой стадии заболевания.

Помимо антагонистов NMDA-рецепторов крайне интересными и относительно мало исследованными в качестве потенциальных нейротропных препаратов являются лиганды другого подтипа глутаматных рецепторов, а именно AMPA-подтипа, которые активируются **(S)- $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-ил-пропионовой** кислотой (AMPA). В последние годы позитивные модуляторы AMPA-рецепторов, так называемые ампакины, были предложены в качестве новой группы когнитивных стимуляторов для лечения БА.

В этой связи весьма актуальной и перспективной представляется разработка направленной стратегии синтеза новых оригинальных соединений - потенциальных нейропротекторов и стимуляторов когнитивных функций, сочетающих свойства антагонистов NMDA-рецепторов и позитивных модуляторов AMPA-рецепторов.

Цель настоящей работы - направленный синтез эффекторов глутаматных рецепторов, в первую очередь антагонистов NMDA-рецепторов и позитивных модуляторов AMPA-рецепторов, в ряду производных изотиомочевины как новой группы потенциальных препаратов для лечения и предупреждения нейродегенеративных расстройств, связанных с нарушением функций глутаматэргической системы.



Научная новизна.

Разработан новый метод синтеза N-1-(гет)арилалкил-N-(гет)арилметиламинов на основе восстановления альдиминов.

Разработаны препаративные методы синтеза N-1-(гет)арилалкил-N-(гет)арилметилтиомочевин, изотиомочевин и изотиуруриновых солей и их циклических аналогов.

Рециклизацией **N-изоксазол-3-ил-N',N'**-дизамещенных тиомочевин синтезированы 3-(2-оксоалкил)-5-амино-[1,2,4]-тиадиазолы - перспективные реагенты для введения 3-алк-2-ил-5-амино-[1,2,4]-тиадиазольного фрагмента.

Синтезировано более 150 новых соединений, содержащих N-1-(гет)арилалкил-N-(гет)арилметиламиновый («дибензиламиновый») фрагмент, в том числе более 30 хиральных, более 80 производных изотиомочевина, а также более 40 циклических изотиуруриновых солей и их биоизостерных аналогов.

Впервые синтезированы соединения, сочетающие в себе свойства блокаторов NMDA-рецепторов и позитивных модуляторов AMPA-рецепторов.

Проведен комплексный анализ результатов исследования связи структура-активность и моделирования взаимодействия соединений с различными участками связывания глутаматных рецепторов, позволивший обосновать отбор наиболее перспективных соединений для исследования их нейротропных свойств на моделях *in vitro* и *in vivo*.

Практическая значимость.

Разработаны удобные препаративные методы синтеза N-1-(гет)арилалкил-N-(гет)арилметиламинов и на их основе — тиомочевин, изотиомочевин и изотиуруриновых солей, в том числе циклических.

Разработан новый, без применения тиофосгена, препаративный метод получения 3-метоксипропилизотиоцианата — ключевого реагента для синтеза 2-амино-5,6-дигидро-1,3-тиазинов.

Показана возможность введения в различные структуры 3-алк-2-ил-5-амино-[1,2,4]-тиадиазольного фрагмента.

Синтезирована и запатентована новая группа соединений на основе N,S-замещенных N'-(гет)арилметилизотиомочевин, в ряду которых выявлены оригинальные высокоэффективные блокаторы глутамат-стимулированного входа  $Ca^{2+}$ .

Выявлены соединения IP-5051 и IP-9040 с уникальным спектром нейропротекторных и когнитивно-стимулирующих свойств. Данные соединения предложены для проведения дальнейших преclinical испытаний.

Апробация работы.

Результаты диссертационного исследования были представлены на международных и российских конференциях:

- Всероссийской конференции «Проблемы противолучевой защиты» (Москва, 1998);
- XII European Symposium on Fluorine Chemistry (Berlin, Germany, 1998);
- XX Всероссийской конференции по химии и технологии органических соединений серы (Казань, 1999);
- Joint Meeting of International Society for Neurochemistry (ISN) and European Society for Neurochemistry (ESN) (Berlin, Germany, 1999);
- 5<sup>th</sup> International Conference on Neuroprotective Agents (Lake Tahoe, CA, 2000);
- Международной школе-семинаре по компьютерной автоматизации и информатизации «ACS-2000» (Москва, 2000);
- IV Съезде по радиационным исследованиям (Москва, 2001);
- X International Symposium "The New Frontiers of Neurochemistry and Biophysics on Diagnosis and Treatment of Neurological Diseases" (Firenze, Italy, 2001);
- Second Joint French-Swiss Meeting on Medicinal Chemistry (Beaune, France, 2003);
- International Symposium "Advances in Synthetic, Combinatorial and Medicinal Chemistry" (Москва, 2004).

Структура диссертационной работы. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 135 страницах, содержит 9 таблиц. Библиография включает литературные ссылки на 186 публикаций.

Содержание работы.

Первая глава представляет собой литературный обзор, в котором описаны способы получения и физиологическая активность производных изотиомочевины. Проанализированы данные для более 200 соединений, проявляющих разнообразную физиологическую активность, большая часть из которых являлась производными N,N'-незамещенной изотиомочевины. Однако среди активных соединений не было найдено ни одной тетразамещенной изотиомочевины, что подтверждает оригинальность введения в структуру «добензиламинового» фрагмента, обладающего в то же время и высокими липофильными свойствами. Также ни одно из описанных в литературе соединений данного класса не проявляет нейропротекторных или когнитивно-стимулирующих свойств за исключением препарата Клобенпропит (Clobenpropit) фирмы «Glaxo», прошедшего преclinical испытания на животных моделях деменции альцгеймеровского типа (рис. 1).

Основными соединениями, проявляющими нейропротекторные и когнитивно-стимулирующие свойства и выпускаемые в качестве лекарственных средств, являются Мемантин (Akanitol Memantine), существенно менее активный Арисепт (Aricept) и некоторые другие.

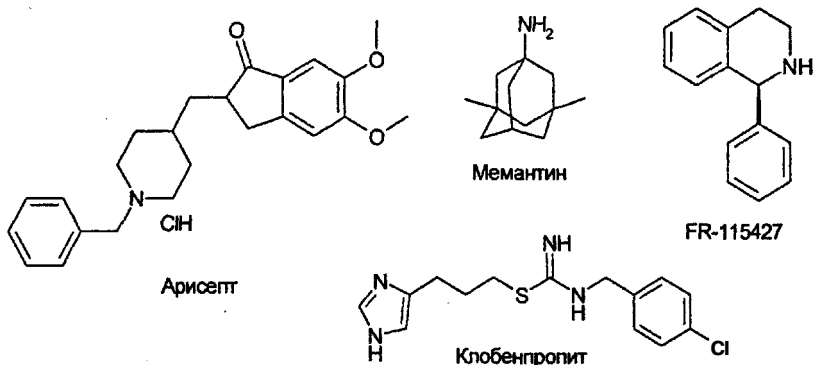


Рис.1. Некоторые из анти-альzheimerовских препаратов.

В литературном обзоре также описаны методы экспериментального и теоретического изучения нейропротекторных и когнитивно-стимулирующих свойств соединений. Показано, что перспективным экспериментальным методом для оценки этих свойств являются тест водного лабиринта Морриса и тест активного избегания.

Основные работы по компьютерному молекулярному моделированию и конструированию лекарственных препаратов проводятся, как правило, методом классического QSAR и/или методом создания искусственных нейронных сетей. Однако наиболее трудоемким, но и наиболее перспективным, является моделирование взаимодействия изучаемых препаратов с центрами связывания белковых молекул (т. н. докинг-исследование).

На основании анализа литературных данных был сделан выбор основных теоретических и экспериментальных методов, которые были применены в настоящей работе.

Вторая глава посвящена рассмотрению потенциально возможных подходов для целевого дизайна новых физиологически активных соединений, что позволило сформулировать и в дальнейшем реализовать синтетическую задачу.

В качестве основного соединения для направленного дизайна новых соединений был использован известный высокоаффинный неконкурентный антагонист NMDA-рецепторов препарат Дизоцилпин (Dizocilpine, МК-801). Метод, который был использован для генерации новых структурных аналогов МК-801, основан на концепции «привилегированных»

подструктур (фрагментов) в оригинальной трактовке, заключающейся в анализе получающихся фрагментов при виртуальном раскрытии напряженной структуры МК-801. Снятие напряженности МК-801 («дерегидификация») может предположительно привести к веществам, имеющим сродство к участку связывания МК-801 с NMDA-каналом, однако связывающимся в отличие от МК-801 обратимо. Это в свою очередь должно привести к потере нежелательных побочных психотомиметических эффектов, свойственных высокоаффинным блокаторам NMDA-каналов. Так, раскрытие бицикла в молекуле МК-801 приводит к двум типам веществ (рис. 2,3):

- (1) моноциклические аналоги при раскрытии одного цикла;
- (2) полностью разомкнутые аналоги при раскрытии двух циклов.

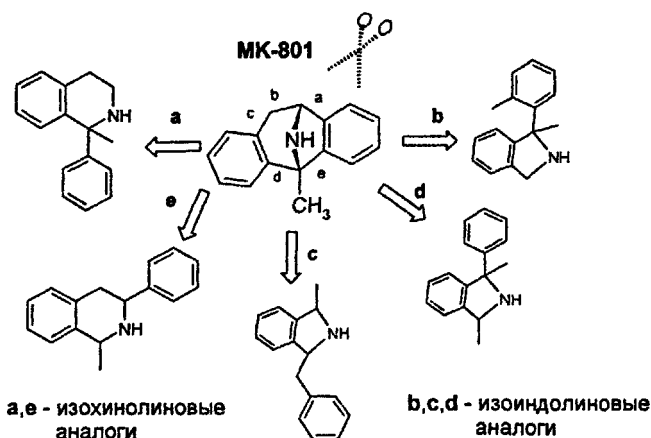


Рис- 2. Выделение из структуры МК-801 изохинолинового и изоиндолинового рядов.

Первый тип включает в себя 2 группы соединений: изохинолиновый и изоиндолиновый ряды (рис. 2). Структура этих молекул очень близка структуре МК-801, и некоторые из соединений, такие как FR-115427 (см. рис. 1), проявляют свойства высокоаффинного блокатора кальциевого канала и связанные с этим побочные эффекты.

При дальнейшем размыкании изохинолинового и изоиндолинового циклов получают 4 типа подструктур, которые являются полностью разомкнутыми аналогами МК-801: монобензиламинный, бензгидриламинный, фенетиламинный и дибензиламинный ряды (рис.3).

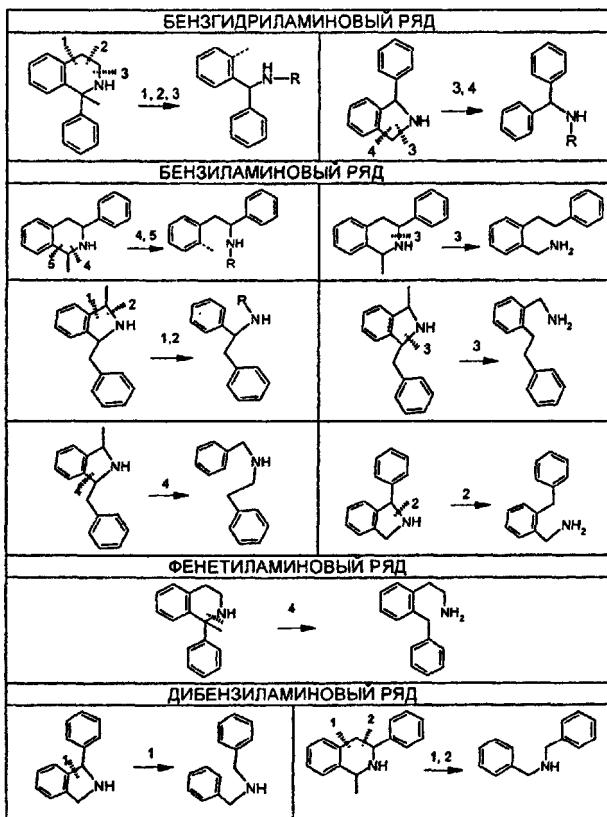


Рис. 3. Полностью разомкнутые и конформационно-подвижные аналоги МК-801.

Функциональные вариации в каждом ряду заключаются в изменениях «вокруг» выбранных подструктур (введение заместителей в арильные и/или алкильные заместители и биоизостерную замену фенильного заместителя), но не включают изменение подструктуры (например, введение новых циклов). В качестве объектов исследования были выбраны соединения дибензиламинового ряда: как сами дибензиламины, так и ациклические и циклические производные изотиомочевины, полученные на их основе.



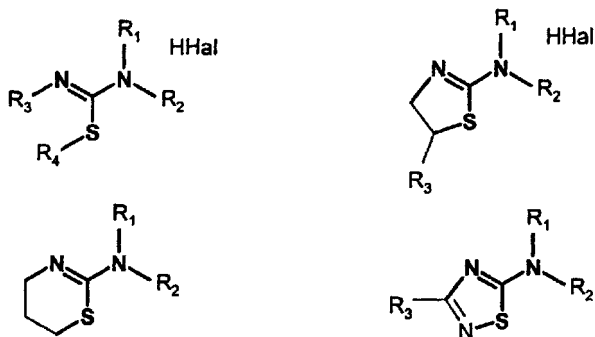
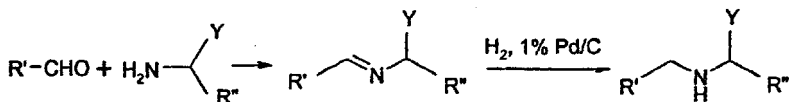


Рис 4. Общие структуры синтезированных производных изотиомочевины, 2-аминотиазолина, 2-амино-5,6-дигидро-1,3-тиазина и 5-амино[1,2,4]тиадиазола.

В главе 3 описаны методы синтеза дибензиламинов и ациклических производных изотиомочевины.

Для создания библиотеки синтезированных веществ разработаны новые методы синтеза, с помощью которых было получено свыше 50 исходных вторичных аминов («дибензиламинов»), содержащих липофильные фрагменты (в том числе 30 оптически активных):



где:

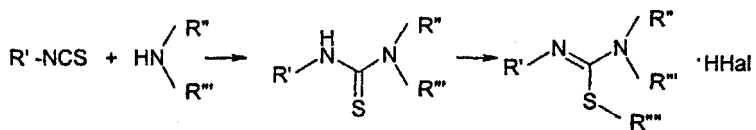
**Y** = H, CH<sub>3</sub>,

**R'** = замещенный фенил, пиридил, циклогекс-3-енил, тиенил, замещенный фурил,

**R''** = замещенный фенил, пиридил, тиенил, фурил, циклогекс-2-енилметил, замещенный бензил, N-морфолинометил, N-морфолиноэтил, N-[1,3]-имидазолоэтил.

Следует отметить, что используемый нами 1%-й Pd/C-катализатор позволил количественно восстанавливать альдимины до дибензиламинов в отличие от 10%-ного Pd/C-катализатора, традиционно применяемого для снятия бензильной группы.

Новые N,S-замещенные N'-1-(гет)арилалкил-N''-(гет)арилметилизотиомочевины, в том числе и их соли с фармакологически приемлемыми кислотами, а также отдельные оптические изомеры указанных соединений были получены в результате реакции аминов с изотиоцианатами с последующим алкилированием подходящим реагентом:



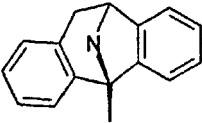
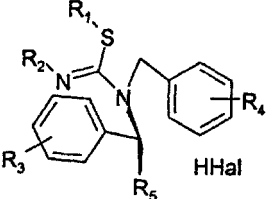
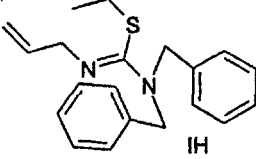
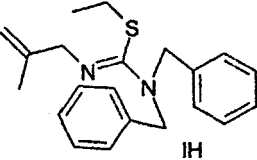
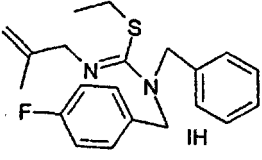
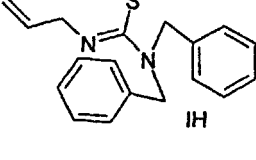
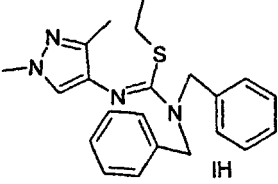
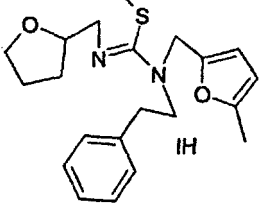
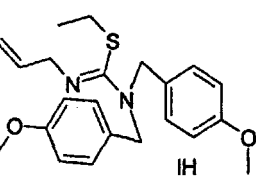
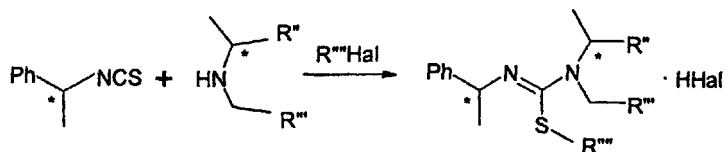
<p><b>MK-801</b></p> 	<p><b>Общая структура</b></p> 	<p><b>IP-5051</b></p> 
<p><b>IP-9152</b></p> 	<p><b>IP-9165</b></p> 	<p><b>IP-5015</b></p> 
<p><b>IP-9166</b></p> 	<p><b>IP-9181</b></p> 	<p><b>IP-9169</b></p> 

Рис. 5. Общая структура и наиболее активные производные дибензиламинового ряда.

В процессе работы были синтезированы некоторые оригинальные изотиоцианаты, в том числе оптически активные, что позволило получить изотиомочевины с двумя хиральными атомами (рис. 6).



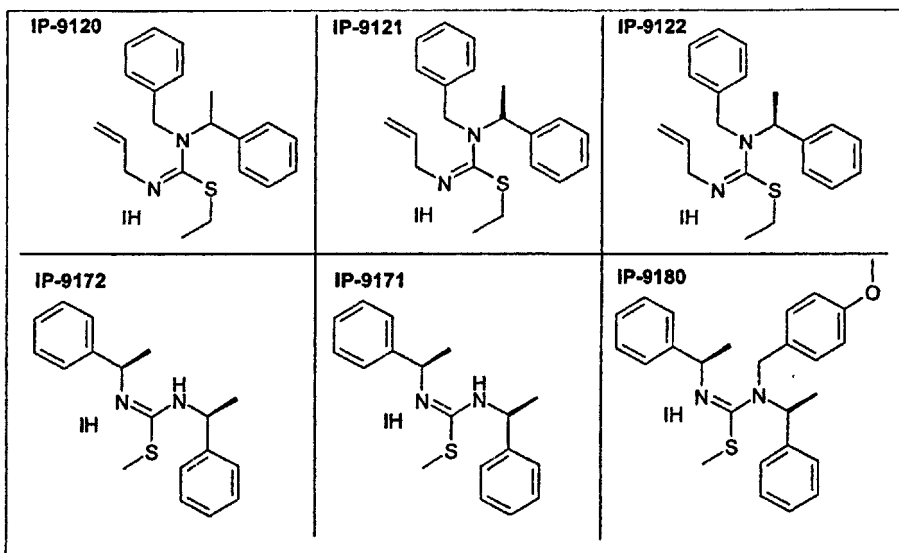
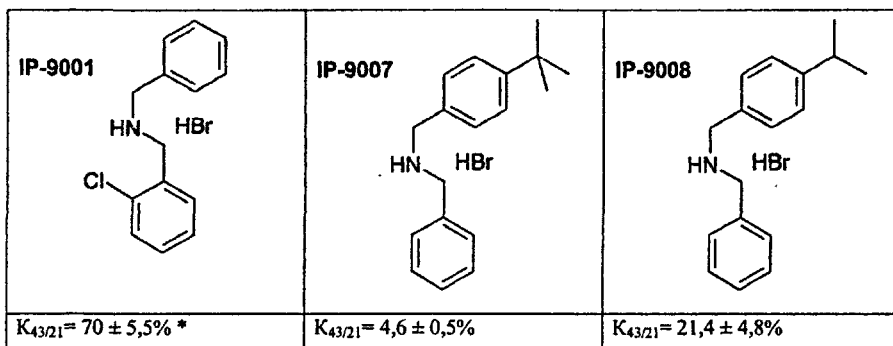


Рис. 6. Некоторые синтезированные хиральные и рацемические производные дибензиламинового ряда.

Первичный скрининг показал высокую активность некоторых из впервые синтезированных дибензиламинов (рис. 7).



\*  $K_{43/21}$  - параметр, характеризующий влияние соединения на глутамат-индуцированный захват ионов  $Ca^{2+}$  (чем он ниже, тем сильнее ингибирование захвата ионов  $Ca^{2+}$ ).

Рис. 7. Кальций-блокирующая активность некоторых дибензиламинов.

В главе 4 описаны методы синтеза циклических аналогов изотиомочевин.

Из N-аллилтиомочевин были получены новые производные изотиомочевины в ряду N,N-дизамещенных 2-аминотиазолинов с различными заместителями в пятом положении (рис.8).

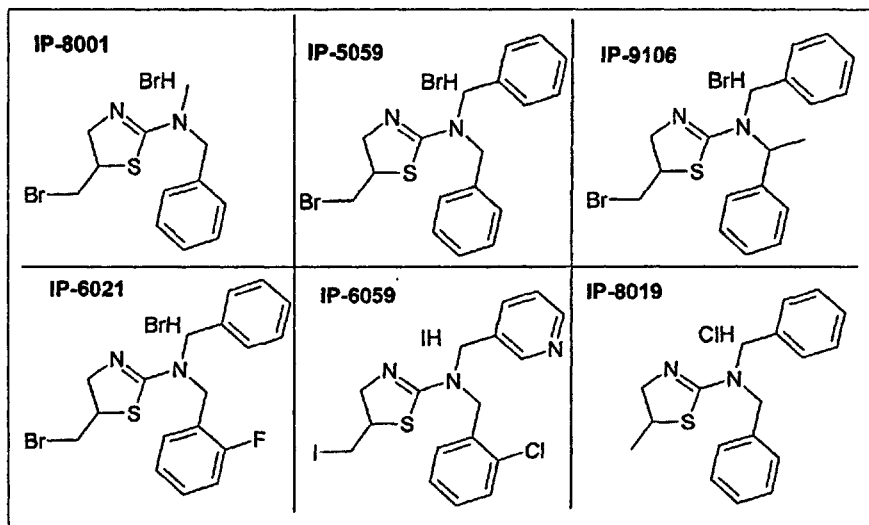
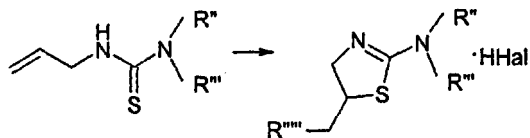
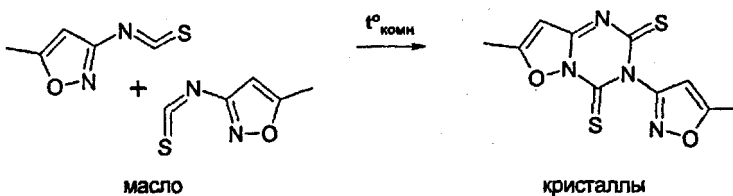
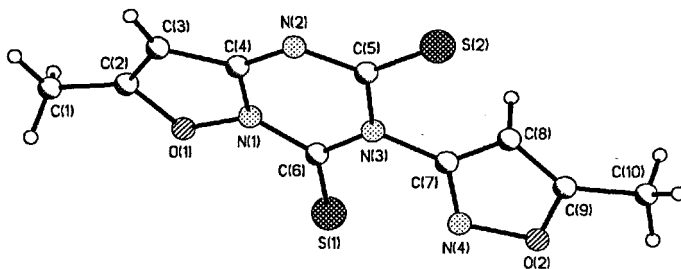


Рис. 8. Некоторые синтезированные производные тиазолинового ряда.

Поиск активных соединений среди циклических аналогов изотиомочевины был продолжен в ряду 5-амино-[1,2,4]-тиадиазола, и предложен новый подход к синтезу 5-(дизамещенных)-амино-3-(2-оксопропил)-[1,2,4]-тиадиазолов на основе впервые полученного 5-метилизоксазол-3-изотиоцианата:



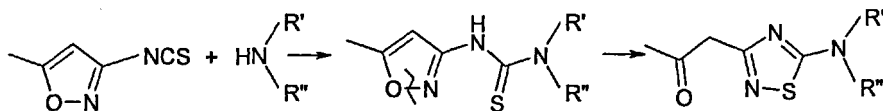
5-Метилизоксазол-3-изоотиоцианат представляет собой светло-желтую жидкость, которая при комнатной температуре постепенно закристалливается в соединение кирпично-красного цвета. Его исследование методами ЯМР, масс-спектрологии и рентгеноструктурного анализа позволило установить структуру образующегося димера:



**Рис. 9.** Общий вид молекулы димера 5-метилизоксазол-3-изоотиоцианата.

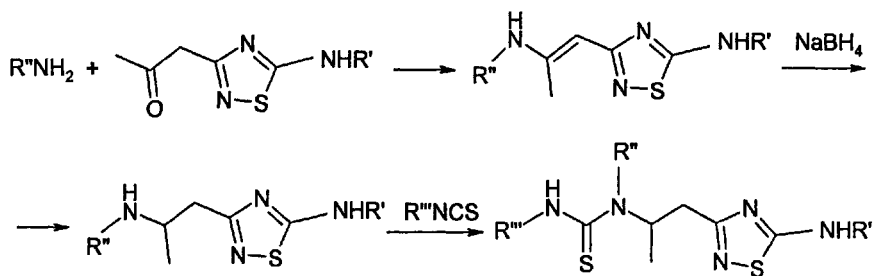
*Данные РСтА были получены в лаборатории рентгеноструктурных исследований ИНЭОС РАН канд хим наук Стариковой З А*

При реакции 5-метилизоксазол-3-изоотиоцианата с вторичными аминами происходит рециклизация промежуточных тиомочевин в тиадиазольное кольцо за счет атаки нуклеофильной тиокарбонильной группой связи N-0 изоксазольного цикла:



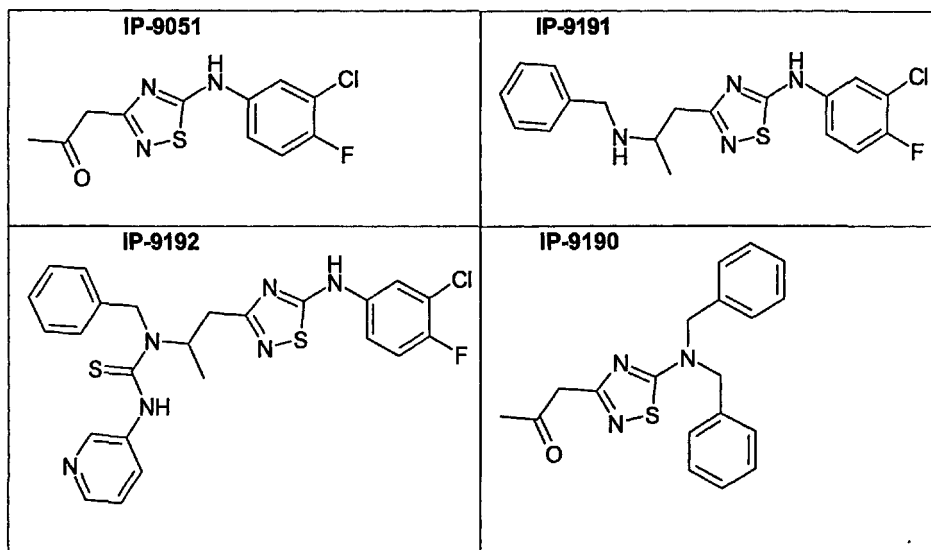
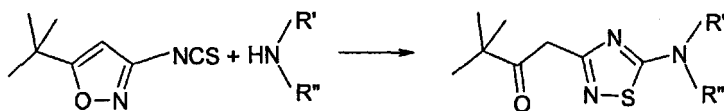
Этот метод позволил нам получить более 10 ранее неописанных 2-оксoproпил-2-добензиламино-1,4,2-тиадиазолов.

Структура 5-амино-3-(2-оксoproпил)-[1,2,4]-тиадиазола, содержащая легко модифицируемую кетогруппу, позволяет включить небольшой [1,2,4]-тиадиазольный цикл в более сложные молекулы, что представляется весьма перспективным с учетом широкого спектра физиологической активности тиадиазолов:



Так, из N-монозамещенных 5-аминотиазолов был синтезирован ряд енаминовых производных, из которых после их восстановления получали тиомочевины (рис. 10).

На основе впервые полученного 5-трет-бутилизоксазол-3-изотиоцианата были синтезированы неописанные в литературе соединения ряда 5-амино-3-(2-оксо-3,3-диметил-бутил)-[1,2,4]-тиадиазола:



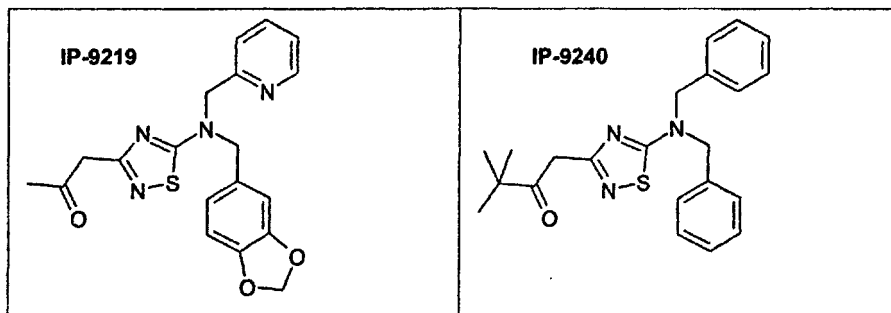


Рис. 10. Некоторые синтезированные производные тиадиазольного ряда.

Для получения 6-членных циклических производных изотиомочевины были синтезированы липофильные 2-замещенные amino-5,6-дигидро-1,3-тиазины из N-метоксипропилтиомочевин (рис. 11). Для исходного 3-метоксипропилизотиоцианата была разработана методика его синтеза без применения тиофосгена, отличающаяся от традиционной высоким выходом:

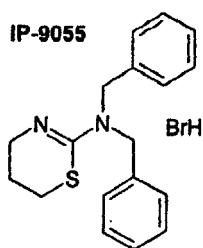
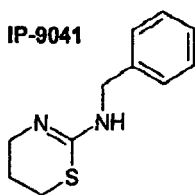
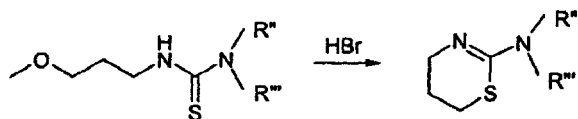


Рис. 11. Некоторые синтезированные производные тиазинового ряда.

Глава 5 посвящена описанию результатов исследований физико-химических и биологических свойств вновь синтезированных соединений, а именно:

- первичного скрининга синтезированных соединений;
- их физико-химических свойств;
- моделирования молекулярного взаимодействия наиболее активных соединений со связывающими центрами NMDA- и AMPA-рецепторов;
- когнитивно-стимулирующих свойств соединений IP-5051 и IP-9040 в поведенческих тестах.

На первой стадии исследований для оценки физиологической активности полученных соединений определялась способность каждого соединения ингибировать глутамат-зависимый захват  $\text{Ca}^{2+}$  (на синапсах мозга крысы) и проявляемая анти-NMDA активность. Это позволило значительно ограничить общее число испытываемых соединений, выбрав из них наиболее перспективные.

На второй стадии исследования веществ, отобранных по указанным выше критериям, т. е. "соединений-лидеров", изучались их нейропротекторные и когнитивно-стимулирующие свойства в тесте на животных, моделирующим деменцию альцгеймеровского типа.

Все синтезированные соединения были протестированы в лаборатории нейробиологии ИФАВ РАН на способность ингибировать глутамат-индуцированный захват  $\text{Ca}^{2+}$ . Для всех соединений радиометрическим методом определялся показатель  $K_{4321}$ , равный отношению разностей входа изотопа  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  в присутствии и в отсутствие глутамата при концентрации вещества 100 мкМ. Для активных веществ вычислялась концентрация ( $\text{IC}_{50}$ ), при которой наблюдалось 50%-е ингибирование захвата  $\text{Ca}^{2+}$ . 36 соединений, наиболее активных в предыдущем тесте, были проверены на анти-MMOA-активность. Результаты, полученные для соединений-лидеров, приведены в таблице 1.

Таблица 1. Физиологическая активность соединений-лидеров.

Шифр соединения	$\text{IC}_{50}$ , мМ	$\text{ED}_{50}$ , мг/кг *	$\text{EC}_{100}$ , мкМ **
МК-801	22,9	0,2	—
IP-5051	30,0	10,0	20,0
IP-9040	2,8	1	0,5
IP-9007	20,0	25	—
IP-9143	8,0	5,0	12,0
IP-9152	12,0	—	5,0

\* доза вещества в эксперименте *in vivo*, при которой ответ NMDA-рецептора ослабляется на 50%.

\*\* концентрация, при которой ответ AMPA-рецептора в эксперименте *in vitro* усиливается на 100%.



Анализ взаимосвязи «структура-активность» в рядах этих соединений (см. рис.5 на стр.10; общая структура тетразамещенных изотиомочевин) позволил обнаружить некоторые закономерности:

- для  $R_1$  предпочтительны короткие алкильные заместители или заместители с двойной связью;
- соединения, где  $R_2=Ar$ , неактивны; активность возрастает в ряду  $Ar < CH_2Ar < CH_2CH_2Ar \leq Alk \leq Alkenyl$ ; оптимальная длина алкильной цепочки - три-четыре атома углерода;
- наличие двойной связи, как и в случае  $R_1$ , активность соединения не снижает;
- возможно введение в структуру изотиомочевины гетероциклов;
- для радикалов  $R_3$  и  $R_4$  четких закономерностей не обнаружено; введение в структуру соединения атома фтора или метоксигруппы оставляет его активность примерно на том же уровне или незначительно снижает её; можно также указать на предпочтительность замещения в пара-положение.

Максимальную активность проявляет соединение IP-5051 (гидроидид S-ЭТИЛ-N-аллил-N',N'-дибензилизотиомочевин), где  $R_1=Et$ ,  $R_2=All$ ,  $R_3,R_4,R_5=H$ ,  $Hal=I$  (см. рис.5 на стр.10).

«Соединения-лидеры» (таблица 1) демонстрируют высокие кальций-блокирующую и анти-NMDA-активности. Согласно этим результатам была выбрана наиболее перспективная группа веществ для исследования их фармакологических свойств на расширенных поведенческих тестах. Параллельно проводилось сравнительное докинг-исследование по связыванию этих соединений с NMDA- и AMPA-рецепторами для выяснения возможного механизма их действия.

Таблица 2. Физиологическая активность хиральных и рацемических изотиомочевин.

Шифр соединения	$K_{43/21}$ , %	$IC_{50}$ , мкМ	$EC_{100}$ , мкМ	$[\alpha]_D^{25}$ *
IP-9180	$101.3 \pm 4.0$	—	—	+3
IP-9122	$3.0 \pm 1.2$	26.3	8-9	-120
IP-9121	$2.3 \pm 0.2$	20.4	8-9	+117
IP-9120	$5.9 \pm 1.55$	19.1	10	—
IP-9171	$91.4 \pm 2.7$	—	—	-178
IP-9172	$73.6 \pm 7.3$	—	—	-2

\*оптическая активность соединений измерялась в ЕЮН при концентрации 1% при 25С.

Физиологическая активность синтезированных хиральных и рацемических изотиомочевин подчиняется закономерностям, перечисленным выше. Результаты, полученные для некоторых изученных изотиомочевин, включая самые активные, приведены в таблице 2.

Циклические изотиомочевины в целом показали не очень высокую активность в первичном тесте (таблица 3.)-

Таблица 3. Кальций-блокирующая активность некоторых впервые синтезированных циклических изотиомочевин.

<b>Шифр соединения</b>	<b>K<sub>4321</sub>, %</b>	<b>IC<sub>50</sub>, мкМ</b>
IP-8001	92.5 ± 5.9	—
IP-5059	25.4 ± 3.6	67.6
IP-9106	10.7 ± 7.3	56.2
IP-6021	17.5 ± 4.6	49.0
IP-6059	63.5 ± 0.1	126.0
IP-8019	54.3 ± 2.5	100.0
IP-9051	14.0 ± 2.5	41.7
IP-9191	28.1 ± 11.1	64.6
IP-9192	101.7 ± 6.7	—
IP-9190	146.5 ± 10.4	—
IP-9041	75.8 ± 4.2	—
IP-9055	85.8 ± 9.1	—

Состав и структуры полученных соединений определялись на основе анализа данных элементного анализа и ЯМР-спектроскопии. Для объяснения различия в поведенческих тестах разных анионных форм наиболее активных соединений было проведено рентгеноструктурное исследование полученных кристаллов и определена липофильность этих веществ.

Липофильность - один из основных факторов, управляющих фармакокинетикой и фармакодинамикой вещества, его проникновением через гематоэнцефалический барьер и способностью опознавать биомишень и связываться с ней. Таким образом, величина данного параметра является весьма существенной для препаратов, которые действуют на ЦНС. В связи с этим было проведено сравнение результатов теоретического и экспериментального определения коэффициентов распределения исследуемых веществ в системах «октанол-вода» (logP) и «октанол-буфер (pH=7.4)» (logD) (табл.4).

Расчитанные коэффициенты распределения наиболее активных соединений (ClogP, табл. 4) значительно превосходят экспериментально определенные значения (logP, logD), что указывает на недостаточную применимость существующих расчетных методов для предсказания липофильных свойств сложных сопряженных систем типа изотиомочевин. Надо отметить, что экспериментально определенные значения, в отличие от расчетных, подчиняются «правилу пяти» Липински. Это позволяет охарактеризовать данный класс соединений как «drag-like compounds», поскольку выполняются и другие критерии вышеупомянутого правила.

Таблица 4. Коэффициенты распределения для наиболее активных веществ.

Шифр соединения	ClogP <sub>(расчет)</sub> <sup>*</sup>	logP <sub>(эксп)</sub> <sup>**</sup>	logD (pH=7.4) <sub>(эксп)</sub> <sup>**</sup>
IP-9152	6.27	1.95	2.48
IP-9040	6.71	2.54	3.18
IP-9007	5.15	—	2.65
IP-9143	7.07	2.39	2.54
IP-5051_йодид	6.21	2.74	2.94
IP-5051_хлорид	6.21	2.74	2.00
IP-5051_бромид	6.21	2.74	2.16
(H <sub>2</sub> N) <sub>2</sub> CSCSH <sub>3</sub> NI	0.23	—	-0.73
n-BuNCS	—	3.07 (2.91)***	—

*\* Расчет проводился с помощью программы EPI Suite v3.11 (<http://www.epa.gov/oppt/exposure/docs/episuite/dl.htm>).*

*\*\* Экспериментальное определение коэффициентов logP и logD выполнено доктором хим. наук А.Н. Турановым в ИФТГ РАН методом атомно-эмиссионной спектрометрии (ICAP-61).*

*\*\*\* Литературные данные (Я.И.Коренман, Коэффициенты распределения органических соединений. Воронеж, изд-во ВГУ, 1992, с.63).*

Отметим более предпочтительное по абсолютной величине значение коэффициента logD=2.94 для соединения IP-5051 в форме иодида по сравнению с logD=2.00 для его «хлоридной» формы. Этот факт, по-видимому, и служит причиной заметных различий фармакологических свойств этих двух форм в поведенческих тестах на животных.

В группе канд. хим. наук В.В. Палюлина (МГУ) было проведено компьютерное моделирование молекулярного взаимодействия наиболее активных соединений со связывающими центрами NMDA-рецептора для выяснения механизма возникновения физиологической активности.

Согласно расчетам соединение МК-801 образует 2 водородные связи с карбонильными кислородами аминокислот Asn616 и Leu615, а 2 дополнительные водородные связи образуются с амидной группой Asn616. В то же время одно из бензольных

кольцо соединения МК-801 расположено в узком «кармане», который образован гидрофобной спиралью. Столь сильное взаимодействие данного лиганда с участком связывания NMDA-рецептора и приводит к полному блокированию канала.

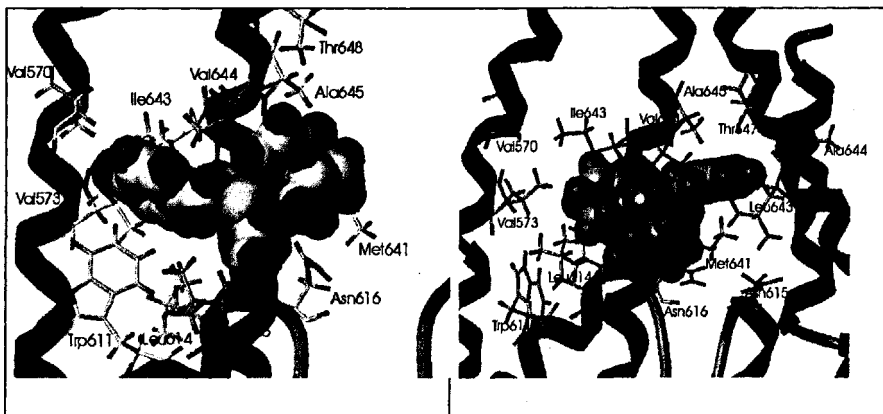


Рис 12. Результаты моделирования связывания IP-5051 и IP-9040 на внутриканальном участке NMDA -рецептора.

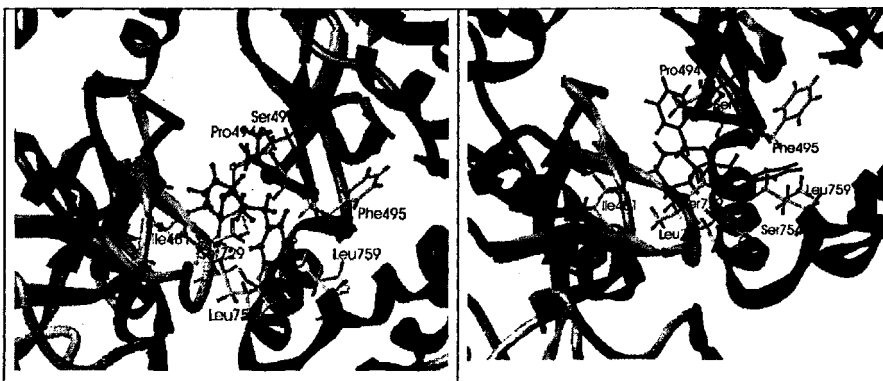


Рис. 13. Результаты моделирования связывания IP-5051 и IP-9040 с AMPA-рецептором.

Результаты моделирования связывания соединения IP-5051 с тем же рецептором позволили предположить, что, по-видимому, IP-5051 способен связываться с тем же гидрофобным карманом, что и МК-801 (рис. 12). Однако в отличие от МК-801 соединение

IP-5051 обладает существенно большей информационной подвижностью и, кроме того, связывается с рецептором только одной водородной связью, в результате чего молекула связанного лиганда приобретает дополнительные степени свободы. А взаимодействие гидрофобной части молекулы IP-5051 и с другими неспецифическими субъединицами рецептора приводит к уменьшению прочности специфического лиганд-рецепторного комплекса, т. е. ускоряет скорость открытия-закрытия кальциевого канала.

Результаты проведенного компьютерного анализа (рис. 12, 13) дают основания предполагать, что место связывания активных производных изотиомочевины может располагаться в кармане связывания модуляторов AMPA-рецептора и в участке связывания блокаторов NMDA-рецептора.

Сравнительное изучение когнитивно-стимулирующих свойств соединений-лидеров IP-5051, IP-9040 к модельным препаратам Мемантин и Арисепт, применяемых для лечения БА, были проведены в лаборатории нейрохимии ИФАВ РАН. Болезнь Альцгеймера моделировалась на крысах путем инъекций нейротоксина AF64A, вызывающего селективное разрушение ацетилхолиновых синаптических окончаний с последующей дегенерацией нейронов.

Пероральное введение IP-5051 восстанавливало когнитивные функции, которые ухудшались после инъекции AF64A как в обучающем тесте, так и в тесте запоминания (рис. 14). Соединение IP-5051 вызывает статистически значимый эффект повышения памяти в дозах вещества в интервале от 0.5 до 5.0 мг/кг (перорально).

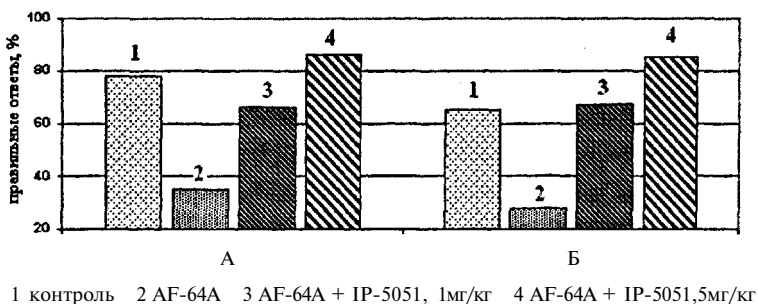


Рис. 14. Когнитивно-стимулирующий эффект IP-5051.

А. Обучающий тест. Б. Тест на запоминание.

В случае введения экспериментальным животным соединений Мемантин и IP-5051 найдено статистически значимое улучшение способности к обучению, которое сравнимо с результатами для контрольной группы животных или даже превосходит его. Кроме того, соединения IP-9040, IP-5051 и Мемантин продемонстрировали устойчивый пролонгированный эффект, наблюдаемый после прекращения инъекций. Этот факт позволил предположить, что данные соединения влияют на регенеративные и/или компенсаторные процессы в мозгу.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что соединения IP-9040 и IP-5051 • повышают способность к обучению крыс с частичной хронической потерей холинергических функций в задаче нахождения невидимой платформы и демонстрируют длительный эффект по сохранению выработанного навыка по окончании обучения и инъекций соединения (рис. 15).

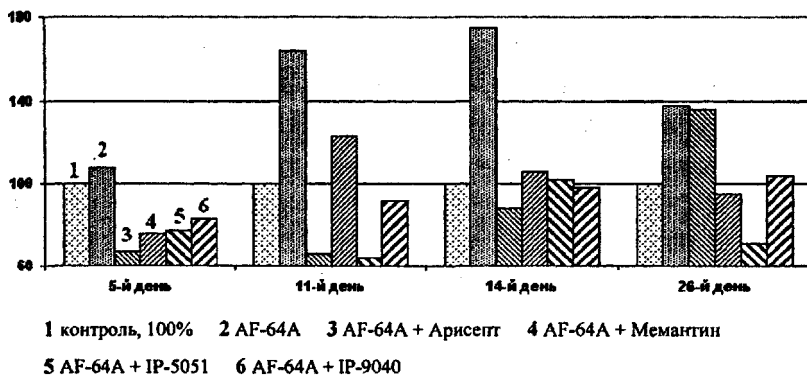


Рис. 15. Относительное время (%) поиска платформы крысами.

Результаты, полученные на животных при введении соединений IP-5051 или IP-9040 к окончанию эксперимента (26-й день), близки к аналогичным данным для контрольной группы и группы животных, получавших Мемантин.

Также было проведено сравнительное изучение действия соединений IP-5051 и МК-801 в различных дозах на локомоторную активность крыс. Обнаружено, что МК-801 в дозах от 0.1 мг/кг вызывает у животных значительный побочный психогенический эффект, проявляющийся в стереотипичном поведении (I), атаксии (II) и гиперактивности (III) (таблица 5).

Таблица 5. Психогеническое действие МК-801 и IP-5051.

МК-801, ED <sub>50</sub> = 0.2 мг/кг				IP-5051, ED <sub>50</sub> = 10 мг/кг			
Доза, мг/кг	I	II	III	Доза, мг/кг	I	II	III
0.1	нет	нет	+	0.5	нет	нет	нет
0.2	+	+	++	1	нет	нет	нет
0.4	+	++	+++	5	нет	нет	нет
0.8	+++	+++	+++	10	нет	нет	нет
1.0	++++	++++	++++	50	нет	нет	+

В случае соединения IP-5051 никаких побочных эффектов, типичных для МК-801, обнаружено не было. При этом важно отметить, что отсутствие побочных эффектов установлено для широкого интервала доз от 0.5 до 50 мг/кг, полностью совпадающего с интервалом его неврологической активности. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что IP-5051 характеризуется спектром поведенческой активности, радикально отличающимся от действия МК-801. В частности, это соединение не дает психотомиметических побочных эффектов в интервалах доз, даже превышающих терапевтически значимые.

Таким образом, соединение-лидер IP-5051 обладает многообещающим фармакологическим профилем:

- способностью ингибировать глутамат-индуцированный захват Ca<sup>2+</sup> (IC<sub>50</sub>=30 μM);
- **высокой анти-NMDA-активностью** (ED<sub>50</sub>≈10 мг/кг);
- позитивной модуляцией AMPA-рецепторов (EC<sub>300</sub>≈20 μM);
- когнитивно-стимулирующими свойствами в тестах деменции альцгеймеровского типа (ED<sub>50</sub>≈1 мг/кг), что нашло подтверждение в экспериментах и на интактных животных;
- низкой токсичностью (LD<sub>50</sub>>1000 мг/кг); кроме того, у данного соединения наблюдается отсутствие МК-801—подобных психотомиметических побочных эффектов, а также отсутствие седативного воздействия.

## **Выводы**

1. Разработан новый метод синтеза *N*-(гет)арилалкил-*N*-(гет)арипметиламинов на основе восстановления оснований Шиффа, с помощью которого было впервые синтезировано более 50 дибензиламинов, в том числе более 30 оптически активных.

2. Разработаны методы синтеза *N*-(гет)арилметил-*N*-(гет)арилалкилтиомочевин, изотиомочевин и изотиурониевых солей и их циклических производных. На их основе впервые синтезировано более 80 ациклических производных, содержащих дибензиламиновый фрагмент, и 40 циклических аналогов изотиомочевин, в том числе производные ряда тиазолинов, тиазинов и тиadiaзолов.

3. Предложен новый подход к синтезу труднодоступных 5-(дизамещенных)-амино-[1,2,4]-тиадиазолов на основе впервые полученных 5-метилизоксазолил-3-изотиоцианата и 5-трет-бутилизоксазолил-3-изотиоцианата.

4. Разработан метод введения 3-(алк-2-ил)-5-амино-[1,2,4]-тиадиазольного фрагмента в молекулы с аминогруппой.

5. Для всех соединений рассчитаны значения коэффициентов распределения «октанол-вода» ( $ClogP$ ), а для семи наиболее активных веществ коэффициенты распределения  $\log P$  и  $\log D(pH 7.4)$  определены экспериментально. Сравнение этих данных указывает на недостаточную точность современных расчетных методов предсказания коэффициентов липофильности для сложных сопряженных систем типа изотиомочевин.

6. Первичным скринингом обнаружена высокая фармакологическая перспективность липофильных производных изотиомочевин. Показано, что циклические соединения имеют более низкую активность в первичных тестах, чем их разомкнутые аналоги.

7. Выявлены соединения-лидеры (IP-5051 и IP-9040) с уникальным спектром нейропротекторных и когнитивно-стимулирующих свойств. Данные соединения предложены для проведения дальнейших преклинических испытаний.



Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях

1. S Bachunn, V Gngonev, O Drany, A Proshin, S Tkachenko, Isothiouonium dervative potentiates AMPA/kaimte-Induced currents in rat cerebellar Purkinje neurons, *J Neurochem*, 1999, 73, Suppl4S, S143D
2. S Tkachenko, S Bachunn, A Proshm, A Ustinov, L Petrova, N Zefirov, Synthesis and neurochemical properties of substituted tnbzylamines (open analogs of MK-801) as potent NMDA-receptor linked ion channel blockers, *Restorative Neurology and Neurosaence*, 2000, Vol 16, No 1, P 72-73
3. S Bachunn, S Tkachenko, I Baskin, N Lermontova, L Petrova, A Ustinov, A Proshin, V Gngonev, N Lukoyanov, V Palyulin, N Zefirov, Neuroprotective and cognition enhancing properties of MK-801 flexible analogs Structure-activity relationships, *Annals NY Acad Sci*, 2001, Vol 939, P 219-236
4. S Tkachenko, S Bachunn, T Muhma, L Petrova, M Dminev, A Ustinov, A Proshm, K Balakin, Focused synthesis of open-chain analogs of MK-801 as potent neuroprotectors and the use of neural network modeling procedures for lead finding and optimization, *Drug Fut*, 2002, 27, Supp A, P 525
5. S Tkachenko, E Kiselyova, A Afanas'ev, A Ustinov, S Klochkov, S Bachunn, T Serova, A Proshin, K Balakin, Synthesis and structure-activity relationships of novel antitumor pyndinium and quinohnnium hophilic cations, *Drug Fut*, 2002, Vol 27, Suppl A, P 527
6. Ю Я Иванов, С Е Ткаченко, А Н Прошин, А К Устинов, С О Бачурин, М-Холинэргические свойства производных 2-амино-2-тиазолина, *Хим -Форм Журн* 2002, Т 36 №11, С 8-9
7. Ю Я Иванов, С Е Ткаченко, А Н Прошин, С О Бачурин, Производные 2-амино-2-тиазолина - новый хемотип, обладающий мускариноподобным действием, *Биомедицинская химия*, 2003, Т 49, №1, С 92-95
8. С Е Ткаченко, А Н Прошин, С О Бачурин, Л Н Петрова, Н С Зефилов, Производные Ы<sub>1</sub>,5-замещенных Ы<sup>Г</sup>-1-[(гет)арилалкил]-К<sup>Г</sup>-[(гет)арилметилзотиомочевин или их солей с фармакотогически приемлемыми кислотами НХ, способы получения их солей и оснований, фармацевтическая композиция, способ лечения и способ изучения глутаматэргической системы, *Патент РФ*, №2223952, приоритет от 04 06 2001
9. С Е Ткаченко, А Н Прошин, М Э Дмитриев, Н Н Лермонтова, В В Григорьев, С О Бачурин, Н С Зефилов, S-Замещенные Н-1-[(гетеро)арил]алкил-Ы<sup>Г</sup>-[(гетеро)арил]алкилзотиомочевины, способ их получения, физиологически активные S-замещенные N-1-

[(гетеро)арил]алкил-Ы\*-[гетеро)арил]алкилизотиомочевины, фармацевтическая композиция и способ лечения, заявка на Патент РФ, №2002132699, приоритет от 5.12.2002.

10. S.E. Tkachenko, T.M. Serova, V.A. Palyulin, A.N. Proshin, N.V. Averina, L.N. Petrova, L.S. Solyakov, S.O. Bachurin, N.S. Zefirov, Structure-Activity Relationships of a Series of Polycyclic and Bridged Compounds Affecting on Ca<sup>+2</sup> Homeostasis, *XIII Intern. Symp. Medicinal Chemistry*, Paris, 1994.

11. С.Е. Ткаченко, А.Н. Прошин, А.К. Устинов, Е.В. Кулиш, Т.П. Трофимова, С.О. Бачурин, В.М. Федосеев, Н.С. Зефирова, «Пролекарства» и «липофильные» производные циклических изотиомочевин — перспективные радио- и нейропротекторы, *Всероссийская конференция «Проблемы радиационной защиты»*, Москва, 1998.

12. A. V. Popov, E. L. Luzina, A. N. Pushin, V. E. Baulin, A. N. Proshin, and A. V. Shastin, Syntheses Starting from Octafluoroisobutene, *XII European Symposium on Fluorine Chemistry*, Berlin, Germany, 1998, PII-72.

13. С.Е. Ткаченко, А.Н. Прошин, А.Н. Путин, Л.Н. Петрова, С.О. Бачурин, Н.С. Зефирова, Региоконтроль в дегидрогалогенировании изомерных циклических р-галогенизотиомочевин и физиологическая активность продуктов реакций, *XX Всероссийская конференция по химии и технологии органических соединений серы*, Казань, 1999.

14. S. Bachurin, S. Tkachenko, I. Baskin, N. Lermontova, L. Petrova, A. Ustinov, A. Proshin, V. Grigoriev, N. Lukoyanov, V. Palyulin, N. Zefirov, Neuroprotective and cognition enhancing properties of MK-801 flexible analogs. Structure-activity relationships, *5<sup>th</sup> International Conference on Neuroprotective Agents*, Lake Tahoe, CA, 2000, Abstr, Tu06.

15. Т.В. Мухина, С.О. Бачурин, С.Е. Ткаченко, Л.Н. Петрова, А.Н. Прошин, А.К. Устинов, И.И. Баскин, Н.В. Артеменко, Н.М. Гальберштам, В.А. Палюлин, Н.С. Зефирова, Применение методологии искусственных нейронных сетей для анализа количественной связи структура-активность в ряду аналогов МК-801, *Международная школа-семинар по компьютерной автоматизации и информатизации «ACS-2000»*, Москва, 2000, С.49-50.

16. С.Е. Ткаченко, Т.П. Трофимова, А.Н. Прошин, М.Э. Дмитриев, Л.Н. Петрова, С.О. Бачурин, А.А. Мандругин, В.М. Федосеев, Г.В. Донцова, М.М. Константинова, Радиозащитная и нейропротекторная активность новых производных циклических изотиомочевин, *IV Съезд по радиационным исследованиям*, Москва, 2001, Т.2, С.436.

17. S. Bachurin, S. Tkachenko, I. Baskin, A. Proshin, V. Grigoriev, N. Lermontova, V. Palyulin, N. Zefirov, Focused Design and Study of Novel Neuroprotectors and Cognition-Enhancers in Series of Glutamate Receptors Ligands, *X International Symposium "The New Frontiers of Neurochemistry and Biophysics on Diagnosis and Treatment of Neurological Diseases"*, Firenze, Italy, 2001, P.24-25.

18. S Bachunn, I Baskm, A Proshn, V Palyulm, I Tikhonova, N Zefirov, Rational design of novel neuroprotectors and cognition-enhancer in a series of glutamate receptors hgands, *Second Joint French-Swiss Meeting on Medicinal Chemistry*, Beaune, France, 2003

19. T P Trofimova, A N Pushin, A N Proshn, A A Mandrugin, V M Fedoseev, S E Tkachenko, Convenient "Cautious" Method of 5-Hydroxymethyl-2-amino-2-thiazolmes Synthesis, *International Symposium "Advances in Synthetic, Combinatorial and Medicinal Chemistry"*, Moscow, 2004, Vol 2, P 186







ЛР№ 020055 от 31.12.96 г.

Сдано в печать 10.09.04 г.  
Формат 60х84/16  
Тираж 100 экз.

Офсетная печать

Заказ № 179

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ СЕРВИСА  
141220, М.О., Пушкинский район, пос. Черкизово, ул. Главная, 99

**№ 17339**

РНБ Русский фонд

2005-4

12508