

На правах рукописи

МАРЬЯСОВ МАКСИМ АНДРЕЕВИЧ

**РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСНОГО ПОДХОДА К ДИЗАЙНУ НОВЫХ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СУБСТАНЦИЙ НА ОСНОВЕ
НИТРИЛСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук**

Самара - 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»

Научный консультант:

доктор химических наук, профессор

Насакин Олег Евгеньевич

Официальные оппоненты:

Игидов Назим Мусабекович, доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра общей и органической химии, профессор кафедры

Пурыгин Петр Петрович, доктор химических наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева», кафедра неорганической химии, профессор кафедры

Клен Елена Эдмундовна, доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии, заведующий кафедрой

Ведущая организация: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань

Защита диссертации состоится «__» _____ 2022 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета 21.2.061.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. Карла Маркса, 165Б).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171) и на сайте (<http://www.samsmu.ru/scientists/science/referats/>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук, доцент

Жданова Алина Валитовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Всемирной организацией здравоохранения в 2018 году зарегистрировано 18,1 млн новых случаев онкологических заболеваний, смертность от которых составила 9,6 млн человек (WHO, Int. Agency Res. Cancer Press-release 263, 2018). Современная химиотерапия этих заболеваний характеризуется низкой эффективностью и высокой токсичностью применяемых препаратов (Okunaka M., Kano D., Matsui R. et al., 2021; Campelj D.G., Timpani C.A., Cree T. et al., 2021; Okunaka M., Kano D., Matsui R. et al., 2021; Dessouki F.B.A., Kukreja R.C.; Singla D. K., 2020; Costa D.V.S., Costa D.V.S., Sousa C.N.S. et al., 2020; Saleh M.A., Antar S.A., Hazem R.M., El-Azab M.F., 2020; Hilmi M., Ederhy S., Waintraub X. et al., 2020; Adhikari A., Asdaq S.M.B., Hawaj M.A.A. et al., 2021).

В связи с этим получение новых противоопухолевых лекарственных средств – важнейшая задача для ученых всего мира. Однако создание новых лекарственных средств сопряжено с определенными трудностями (Moscicki R.A., Tandon P.K., N. Engl. J. Med., 2017). Во-первых – значительные финансовые затраты. По данным Американской Медицинской Ассоциации, стоимость разработки и выведения на рынок нового лекарства в среднем составляет приблизительно 1 млрд долл., в то время как противоопухолевого препарата - более 2,7 млрд долл. (2,0–5,3 млрд долл.) (Wouters O.J., McKee M., Luyten J., 2020). Во-вторых – длительность проводимых исследований (10 лет и более), которые включают синтез разнообразных соединений, доклинические и клинические испытания, разработку технологического регламента и т.д.

Традиционно в получении новых лекарственных препаратов применяются два подхода:

1) модификация известных препаратов – синтез разнообразных структур с уже известными фармакофорными группами и скрининг для выявления «веществ-лидеров». Этот путь позволяет повысить избирательность действия, снизить побочные эффекты, но приводит к увеличению цены препарата и, как следствие, – существенному росту курсовой стоимости лечения;

2) поиск новых структур, не похожих на известные биоактивные соединения, среди малоизученных и вновь получаемых классов органических соединений. В этом случае появляется шанс найти соединения, обладающие более выраженным биологическим действием на опухолевые клетки, но с бюджетом в среднем 3,65 млрд долл. является практически недостижимым в сложившейся экономической ситуации.

В последние годы активно развивается новое направление в разработке лекарственных препаратов – виртуальный скрининг (Maia E.H.B., Assis L.C., de Oliveira T.A et al, Front. Chem., 2020; Kontoyianni M., Methods Mol. Biol., 2017). Этот новый путь позволяет существенно сократить затраты на разработку новых биологически активных соединений и, следовательно, значительно ускорить создание лекарственного препарата.

На наш взгляд, внедрение данного подхода с выходом на принципиально иную область исследований – первостепенная задача как медицинской и фармацевтической химии, так и современного здравоохранения. Он включает в себя элементы молекулярного дизайна биоактивных субстанций, исследование их взаимодействия с различными биологическими мишенями с применением компьютерных программ, построение количественных моделей «структура – активность» и направленный синтез соединений. Однако существует проблема доставки вновь получаемых соединений к клеткам-мишеням и проникновения в них для

специфического связывания с субстратом. Для решения этой проблемы активно изучаются различные системы доставки, включая применение наноносителей – липосом, наночастиц. В настоящее время все больше внимания уделяется углеродным наночастицам. Бесспорным лидером среди них являются наноалмазы, которые, будучи биологически индифферентными, и благодаря способности проникать внутрь клеток являются практически идеальными наноносителями для лекарственных препаратов (Tsai L.-W., Lin Yu-C., Perevedentseva E. et al., *Int. J. Mol. Sci.*, 2017). Это было продемонстрировано на примере известных лекарственных препаратов, в том числе доксорубина – противоопухолевого антибиотика макролида (идентификатор в банке данных Национального института онкологии США SID 301181).

На химико-фармацевтическом факультете Чувашского государственного университета уже более 40 лет активно ведутся работы по синтезу и химии полицианосодержащих органических соединений. Отмечено, что некоторые структурные комбинации, содержащие разное число карбонитрильных групп, имеют выраженную противоопухолевую активность. В пользу этого говорят и отдельные сообщения различных исследовательских групп в зарубежной литературе. Самым ярким примером является нитрилсодержащее производное доксорубина, чья активность на порядок выше (SID 581624). В то же время биологическая активность нитрилсодержащих соединений долгое время целенаправленно не изучалась, а была второстепенным предметом исследований химиков-синтетиков. Интерес к медицинскому применению нитрилов возрос в течение последних 10 лет, что подтверждается увеличением числа публикаций по данной теме.

В связи с этим в настоящем диссертационном исследовании разработан комплексный подход к дизайну новых биологически активных субстанций на платформе поликарбонитрильных соединений, включающий изучение связи «структура – активность», применение технологий моделирования взаимодействий «лиганд – белок» (молекулярный докинг), построение моделей биологической активности, а также использование инновационных систем доставки лекарственных препаратов к биомишеням – наноалмазов. Он основан, с одной стороны, на уникальной реакционной способности карбонитрильной группы, возможности синтеза большого разнообразия сложных, необычных структур, а с другой – на известных цитотоксических свойствах карбонитрильных соединений, их способности встраиваться в биохимические процессы клеток.

Одна из причин противоопухолевой активности нитрилсодержащих соединений – их способность встраиваться в процессы синтеза белка и регуляции метаболизма клеток. Другими словами, карбонитрилы участвуют в процессах биосинтеза различных соединений в живых системах. Это было продемонстрировано в работах Дж. Д. Сазерленда, который разработал концепцию «цианосульфидной» протометаболической системы и показал пути образования важнейших природных соединений – аминокислот и активированных пиримидин-рибонуклеотидов через серию промежуточных нитрилсодержащих соединений (Powner M. W., Gerland B., Sutherland J. D., *Nature*, 2009; Ritson D., Sutherland J. D., *Nature Chem.*, 2012; Ritson D., Sutherland J. D., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013).

Таким образом, можно говорить об избирательных противоопухолевых свойствах соединений, содержащих карбонитрильные группы.

Предложенный подход дизайна нитрилсодержащих биологически активных субстанций позволяет получить соединения, обладающие известными и новыми механизмами биологического действия на опухолевые клетки. Мы считаем, что это одно из приоритетных направлений тонкого органического синтеза, медицинской химии и фармации.

Следует отметить, что благодаря своим биологическим свойствам нитрилсодержащие соединения уже нашли применение в народном хозяйстве и медицине, в качестве инсектицидов, гербицидов и противовирусных («Рилпивирин», «Этравирин», «Доравирин», «Ремдесивир»), противомикробных («Цефметазол», «Финафлоксацин»), противогрибковых («Исавуконазол», «Луликоназол»), противодиабетических («Алоглиптин», «Вилдаглиптин», «Саксаглиптин»), иммуносупрессивных («Терифлуномид») и иммуномодулирующих («Озанимод») средств; препаратов для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы («Милринон», «Финеренон», «Верапамил», «Левосимендан»). Известно порядка 60 соединений с доказанной клинической эффективностью.

Нитрилсодержащие соединения применяются и для лечения ряда онкологических заболеваний: злокачественных новообразований молочной железы («Летрозол», «Анастрозол», «Трилостан», «Нератиниб»), предстательной железы («Бикалутамид», «Энзалутамид», «Апалутамид», «Даролутамид»), почек («Белзутифан»), немелкоклеточного рака легких («Алектиниб», «Лорлатиниб», «Тепотиниб», «Сельперкатиниб»), хронического миелоидного лейкоза («Бозутиниб»), острого миелоидного лейкоза («Гласдегиб», «Ивосидениб»). Недостатком данных препаратов является высокая курсовая стоимость, поскольку они являются импортными. В результате диссертационного исследования будет создана платформа для разработки новых отечественных эффективных противоопухолевых средств на основе нитрилсодержащих соединений.

Таким образом, создание комплексного подхода к дизайну новых биологически активных субстанций для получения лекарственных препаратов на наноалмазах, в первую очередь цитостатиков, на основе нитрилсодержащих соединений является актуальной проблемой.

Степень разработанности проблемы.

В настоящее время, согласно открытой базе данных DrugBank, известно 60 нитрилсодержащих соединений с доказанной клинической эффективностью и около 170 субстанций, находящихся на разных этапах исследований. В последние годы арсенал нитрилсодержащих препаратов пополнился такими карбонитрильными соединениями как тофацитиниб, финафлоксацин, барицитиниб и др.

Данные соединения были получены введением карбонитрильной группы в уже известные фармакофоры, а не путем направленного синтеза на основе нитрилсодержащей биологически активной платформы. При этом комплексного исследования с использованием физико-химических дескрипторов, молекулярного докинга, моделей биологической активности для направленного синтеза биоактивных нитрилсодержащих субстанций до настоящего времени не проводилось.

Ранее в медицинскую практику было внедрено порядка 30 нитрилсодержащих препаратов. Было показано, что карбонитрилы во многих случаях имитируют функциональность, присутствующую в субстратах для ферментов, играя ключевую роль в качестве акцепторов водородных связей между нитрильным азотом и аминокислотой или молекулой воды, которая в свою очередь связана с белковой цепью (Fleming F.F. et al., 2010).

Отмечено, что карбонитрильная группа не разрушается при прохождении через ферментные системы, метаболизм протекает по другим участкам молекулы. Большинство известных нитрилсодержащих фармацевтических препаратов – ароматические, при этом количество алифатических, алкен- и азотсодержащих карбонитрилов существенно меньше.

Цель исследования - разработка комплексного подхода к дизайну биологически активных субстанций на основе нитрилсодержащих соединений для создания новых противоопухолевых препаратов.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Проанализировать существующую базу данных о биологической активности нитрилсодержащих соединений и определить наиболее перспективные классы для разработки биологически активных субстанций.

2. Осуществить синтез и установить структуру ароматических нитрилов, содержащих цикл пиррола, пирана, хромена, хинолина, анилина, трех-, четырех- и шестичленных циклических нитрилов, алифатических нитрилов – мероцианинов (полиметинов), а также внутренних солей – пиридиinium этанидов.

3. Создать банк данных биологической активности нитрилсодержащих соединений на основе исследования антипролиферативной, противомикробной, анальгетической активности, и установить взаимосвязь «структура – активность» для полученных соединений.

4. Изучить взаимодействие и определить показатели эффективности связывания нитрилсодержащих соединений с биомишенями, обеспечивающими исследуемые виды активности, методом молекулярного докинга.

5. Построить модели антипролиферативной активности нитрилсодержащих соединений по уравнениям регрессии среднего процента ингибирования от показателей эффективности связывания с биомишенями.

6. Разработать метод нековалентной иммобилизации нитрилсодержащих соединений на немодифицированных наноалмазах для получения лекарственных субстанций и создания новых противоопухолевых лекарственных препаратов с высокой биодоступностью.

7. Провести виртуальный скрининг нитрилсодержащих соединений с использованием моделей активности по прогнозируемому среднему проценту ингибирования роста для отбора «соединений-лидеров», осуществить их синтез и иммобилизацию на поверхности наноалмазов.

8. Изучить антипролиферативную активность субстанций на основе нитрилсодержащих соединений, иммобилизованных на поверхности наноалмазов.

9. Сформулировать положения комплексного подхода к разработке биологически активных субстанций на основе нитрилсодержащих соединений.

Научная новизна. В результате обзора биологической активности и применения нитрилсодержащих соединений определены классы перспективные для разработки биологически активных субстанций.

На основе разработанного и запатентованного метода синтеза 4-циано-5-(дицианометилен)пиррол-2-карбоксилатов (патент на изобретение РФ) найдена новая перегруппировка и получены соединения-аналоги известных донорно-акцепторных хромофоров. Данные соединения представляют интерес в качестве люминесцентных сенсорных меток при исследовании метаболизма и распределения лекарственных средств в живых клетках, жидкостях организма.

Впервые проведена реакция Дильса – Альдера с участием тетрацианоэтилена и N,N-диметил-, фенилгидразонов, тиосемикарбазидов α,β -непредельных альдегидов. При этом обнаружено нестандартное протекание взаимодействия, приводящее к образованию циклобутан-1,1,2,2-тетракарбонитрилов. Для изучения причин образования продуктов [2+2] циклоприсоединения проведены квантовые расчеты энергий всех возможных переходных состояний, которые показали, что аддукт [4+2] - это кинетический продукт, который

сохраняется в равновесии с π -комплексом, в то время как аддукт [2+2] – термодинамический продукт, в котором реакция заканчивается в заданное время. Строение синтезированных соединений установлено комплексом физических и физико-химических методов, включая метод РСА.

Исследована биологическая активность синтезированных соединений, а также соединений, полученных ранее коллективом Чувашского государственного университета: антипролиферативная – у 84 соединений, анальгетическая – у 24, а также 47 испытаний жаропонижающей, антимикробной, гипогликемической и иммуотропной активности. Проведен анализ «структура – активность» в ряду производных 2-амино-4*H*-пиран-3-карбонитрила, хромен-3,3,4(2*H*,4*aH*)-трикарбонитрила, циклопропан-1,1,2,2-тетракарбонитрила, хинолин-3,3,4,4-тетракарбонитрила, циклобутан-1,1,2,2-тетракарбонитрила, 3-цианокумарина, нафтиридин-3-карбонитрила.

Проведен молекулярный докинг нитрилсодержащих соединений по биомишеням антипролиферативной, анальгетической и противовоспалительной активности. По оценочным функциям определены наиболее вероятные мишени для нитрилсодержащих соединений в развитии цитотоксического действия. Установлена более высокая селективность в отношении изоферментов циклооксигеназы по сравнению с референтным лигандом – мелоксикамом, что свидетельствует о низкой вероятности побочных эффектов потенциальных противовоспалительных субстанций. Составлены модели антипролиферативной активности в отношении клеточных линий злокачественных новообразований костного мозга (лейкоз), кожи (меланома), легких, почек, молочной железы, основанные на параметрах эффективности лигандов, что позволяет проводить виртуальный скрининг разрабатываемых противоопухолевых соединений.

Проведено исследование адсорбции карбонитрильных соединений на детонационных наноалмазах. Показано, что процент иммобилизации нитрилсодержащих соединений в среднем выше, чем у других органических соединений, что является преимуществом при разработке лекарственных субстанций на наноалмазах.

Теоретическая значимость результатов исследования

Теоретическая значимость результатов исследования заключается в формулировании методологических принципов комплексного подхода разработки биологически активных субстанций на основе нитрилсодержащих соединений. Ключевым моментом предложенной методологии является отбор «соединений-лидеров» для синтеза и направленного изучения с помощью моделей биологической активности на основе физико-химических дескрипторов и оценочных функций, полученных молекулярным докингом.

На основе анализа литературы и результатов испытаний синтезированных соединений создан банк данных о биологической активности различных классов нитрилсодержащих соединений, позволяющий проводить отбор наиболее перспективных структур.

Сформулированные методологические принципы и сформированный банк данных об активности являются теоретической основой для конструирования потенциально активных структур, виртуального скрининга и направленного синтеза биологически активных субстанций.

Практическая значимость и внедрение результатов исследования

В ходе диссертационного исследования разработан комплексный подход к дизайну биологически активных субстанций на основе нитрилсодержащих соединений, позволяющий с

меньшими затратами проводить разработку новых отечественных лекарственных препаратов, прежде всего цитостатиков.

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс и научно-исследовательскую работу химико-фармацевтического и медицинского факультетов ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», научно-исследовательскую работу научно-образовательного центра фармацевтики ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», а также в программу подготовки специалистов на кафедре биоэкологии и химии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный педагогический университет им. И.Я. Яковлева», что подтверждается актами внедрения.

Синтезировано 108 новых соединений как с неспецифической (циклобутан-1,1,2,2-тетракарбонитрилы, гексагидрохинолин-3,3,4,4-тетракарбонитрилы), так и с селективной антипролиферативной активностью в отношении отдельных клеточных линий (хромен-3,3,4-трикарбонитрилы); соединения с выраженной иммуносупрессивной активностью (метил 5-цианопиран-2-карбоксилаты), а также соединения с анальгетическим, жаропонижающим действием.

Разработан эффективный метод синтеза производных ацилпировиноградных кислот с тетрацианоэтиленом, позволяющий получать с хорошими выходами соответствующие метил 3-ацил-4-циано-5-(дицианометилен)-2-гидрокси-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-2-карбоксилаты, обладающие частичной растворимостью в воде и в полярных органических растворителях и содержащие неизвестное ранее сочетание функциональных групп – карбонитрильных, сложноэфирной, гидроксильной и др.

При получении циклобутан-1,1,2,2-тетракарбонитрилов проведена реакция Дильса – Альдера с участием тетрацианоэтилена и *N,N*-диметил-, фенилгидразонов, тиосемикарбазидов α,β -непредельных альдегидов. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) установлено, что реакция протекает как в прямом, так и в обратном направлении (ретро-синтез), и что исходные, промежуточные и конечные соединения находятся в смеси в строгом стехиометрическом соотношении.

Разработан новый простой метод получения метилированных четвертичных аммониевых солей – метилдицианоацетатов, значительно превосходящих исходные амины по растворимости и подвижности в растворах электролитов. Метод успешно апробирован на серии производных пиридина, изоникотиновой кислоты и ряда фармацевтических субстанций.

Оптимизированы методы синтеза карбонитрилов, содержащих циклы пирана, хромена, циклопропана, хинолина, циклогексена, анилина с иммуносупрессивной, антипролиферативной, анальгетической, жаропонижающей активностью.

Составлены модели антипролиферативной активности нитрилсодержащих соединений, позволяющие прогнозировать средний процент ингибирования роста клеточных линий злокачественных новообразований костного мозга (лейкоз), легких (НМРЛ), кожи (меланома), почек и молочной железы. Данные модели могут применяться для проведения виртуального скрининга при разработке новых отечественных противоопухолевых лекарственных препаратов.

Разработан метод нековалентной посадки карбонитрильных соединений на немодифицированных наноалмазах, позволяющий получать субстанции на наноносителе с высоким процентом иммобилизации (до 35%), что не только решает проблему применения нерастворимых в водной среде лекарственных средств, но и повышает адресность их доставки, снижает дозировку и токсичность.

В результате диссертационного исследования получены две субстанции на наноалмазах, рекомендованные для дальнейших доклинических испытаний.

Личный вклад автора состоит в формировании направления, активном участии во всех этапах исследования, постановке конкретных задач и их экспериментальном решении, обсуждении и интерпретации полученных данных, формулировании выводов, написании и оформлении статей, патента и тезисов докладов. Большая часть экспериментальных результатов получена автором лично или при его непосредственном участии. Под руководством автора разработаны и внедрены в образовательный процесс и научно-исследовательскую работу методологические алгоритмы поиска биологически активных субстанций с применением молекулярного докинга, количественных моделей «структура – активность» и методики синтеза отдельных классов карбонитрильных соединений.

Связь задач исследования с планом научно-исследовательской работы. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательской работы ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова» «Органические тетракарбонитрилы - универсальные исходные соединения и новый фармакофор в синтезе лекарств» (регистрационный номер 115070610031).

Публикации. Основные результаты диссертации изложены в 49 работах, из которых 16 статей в рецензируемых научных изданиях ВАК, входящих в международные базы цитирования WoS и Scopus, 2 статьи в зарубежных изданиях 1 и 2 квартилей. Получен 1 патент РФ на изобретение (Патент RU 2700928, «Способ получения метил 3-ацил-4-циано-5-(дицианометилен)-2-гидрокси-2,5-дигидро-1Н-пиррол-2-карбоксилатов» опубликовано 24.09.2019 Бюл. № 27).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия. Направление исследований – «Получение и исследование биологически активных соединений синтетического и природного происхождения и выявление связей и закономерностей между строением и свойствами веществ».

Методология и методы исследования. Методологическая основа исследования заключалась в разработке и обосновании принципов направленного синтеза нитрилсодержащих биологически активных соединений с применением моделирования и виртуального скрининга. При выполнении диссертационного исследования были использованы методы установления структуры соединений: тонкослойной хроматографии, ИК-спектроскопии, ЯМР-¹H- и ЯМР-¹³C-спектроскопии, УФ-спектрофотометрии, масс-спектроскопии, рентгеноструктурного анализа.

Биологическая активность соединений исследована согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Миронов А.И.). Статистическая обработка полученных результатов проведена согласно ОФС 1.1.0014.15 «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами» (Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание).

Исследование взаимодействий нитрилсодержащих соединений с биологическими мишенями проводили методом молекулярного докинга с помощью программного пакета AutoDock 4.2.6 программой AutoDock Vina. При проведении докинга использованы кристаллографические копии ферментов, полученные из базы данных Protein Data Bank. Прогноз биологической активности соединений выполнен программой PASS online. Оценка токсических рисков и расчет logP, PSA выполнены при помощи системы OSIRIS в программе

DataWarrior v5.5.0. Корреляционный и регрессионный анализ и составление моделей «структура – активность» проводили с использованием пакета «Анализ данных» в MS Excel программного комплекса MS Office 2010.

Положения, выносимые на защиту.

1. Результаты анализа существующей базы данных о биологической активности нитрилсодержащих соединений.

2. Методы синтеза метил 3-ацил-4-циано-5-(дицианометилен)-2-гидрокси-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-2-карбоксилатов, метил 6-амино-3-ацил-5-циано-4-арил-4*H*-пиран-2-карбоксилатов, 10-иминотетрагидро-8а,4-(эпоксиметано)хромен-3,3,4(2*H*,4а*H*)-трикарбонитрилов, 1,2,5,6,7,8-гексагидрохиолин-3,3,4,4-тетракарбонитрилов, 2-аминобензополикакарбонитрилов, 3-арилциклопропан-1,1,2,2-тетракарбонитрилов, циклобутан-1,1,2,2-тетракарбонитрилов, циклогекс-4-ен-1,1,2,2-тетракарбонитрилов, нитрилсодержащих полиметинов, солей метилдицианоацетатов и пентацианопропенидов.

3. Данные исследований строения, биологической активности и анализа «структура – активность» полученных соединений, а также 5,6-дигидропиридин-3,3,4(1*H*)-трикарбонитрилов, 2,4-диамино-5-арил-5,6,7,8,9,10-гексагидро-бензо[*b*][1,8]нафтиридин-3-карбонитрилов, 3-цианокумаринов, ароил- и 2-гетероил-1,1,3,3-тетрацианопроп-2-ен-1-идов.

4. Результаты молекулярного докинга нитрилсодержащих соединений с биомишенями – топоизомеразой 1 и 2, тирозинкиназой, рецепторами эпидермального и сосудистого эндотелиального факторов роста, дигидрофолатредуктазой, рибонуклеотидредуктазой, тубулином, циклооксигеназой 1 и 2.

5. Модели «структура – антипролиферативная активность» для клеточных линий злокачественных новообразований костного мозга (лейкоз), кожи (меланома), легких, почек, молочной железы, составленные на основе показателей эффективности связывания исследуемых соединений с биомишенями.

6. Методика нековалентной иммобилизации нитрилсодержащих соединений на немодифицированных наноалмазах для получения лекарственных субстанций и создания новых противоопухолевых лекарственных препаратов с высокой биодоступностью.

7. Результаты скрининга нитрилсодержащих соединений с использованием моделей активности.

8. Данные исследования антипролиферативной активности полученных субстанций на основе нитрилсодержащих соединений, иммобилизованных на немодифицированных наноалмазах.

9. Положения комплексного подхода к дизайну биологически активных субстанций на основе нитрилсодержащих соединений.

Степень достоверности научных положений. Достоверность полученных данных подтверждается проведенными экспериментальными исследованиями с применением современных физико-химических, биологических, математических методов, статистической обработкой результатов. Сформулированные в диссертации положения и выводы согласуются с литературными данными, логически обоснованы и следуют из полученных результатов исследования, четко аргументированы.

Апробация результатов. Материалы диссертационного исследования представлены на V Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы химической науки и фармации» (Чебоксары, 2016); IV Всероссийской конференции с международным участием «Химия и современность» (Чебоксары, 2016); II Международной

научной конференции «Современная химия: успехи и достижения» (Чита, 2016), Всероссийской конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Томск, 2016); XX и XXI Менделеевских съездах по общей и прикладной химии (Екатеринбург, 2016; Санкт-Петербург, 2019); XIV Международной научно-практической конференции «Актуальные направления фундаментальных и прикладных исследований» (North Charleston, 2017); XIII Международной научно-практической конференции «21 Century: Fundamental science and technology XIII» (North Charleston, 2017); XIII Международной (XXII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2018); Международной научно-практической конференции «Инновационные внедрения в области медицины и фармакологии» (Москва, 2018); 7-й Международной научно-методической конференции «Фармобразование –2018» (Воронеж, 2018); XXV Международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Topical issues of new drugs development» (Харьков, 2018); 71-й Всероссийской научно-технической конференции студентов, магистрантов и аспирантов высших учебных заведений с международным участием (Ярославль, 2018); XIII Международной молодежной научной конференции по естественнонаучным и техническим дисциплинам «Научному прогрессу – творчество молодых» (Йошкар-Ола, 2018); XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2018); VII и VIII Всероссийских конференциях с международным участием «Актуальные вопросы химической технологии и защиты окружающей среды» (Чебоксары, 2018; Чебоксары, 2020).

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 367 страницах компьютерного текста, состоит из введения, семи глав собственных исследований, заключения, общих выводов, библиографического списка и приложений. Содержит 99 схем, 137 рисунков и 65 таблиц. Библиографический список состоит из 412 источников, в том числе 354 на иностранных языках.

Во **введении** обоснована актуальность темы, определены цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость.

В **главе 1** представлен обзор литературы по распространению, свойствам, применению нитрилсодержащих соединений. Рассмотрены основные методы и реагенты в синтезе циклических карбонитрилов.

В **главе 2** изложены методологические основы комплексного подхода к разработке биологически активных субстанций. Приведен прогноз биологической активности основных классов нитрилсодержащих соединений.

Глава 3 включает в себя описание объектов и методов, используемых при проведении экспериментальных исследований.

В **главе 4** приведены основные результаты исследований, включая синтез различных классов нитрилсодержащих соединений, характеристика строения, исследования биологической активности.

Глава 5 посвящена исследованию взаимодействий полученных нитрилсодержащих соединений с биологическими мишенями – ферментами и рецепторами, играющими ключевую роль в развитии антипролиферативной, анальгетической, противовоспалительной активности методом молекулярного докинга.

В **главе 6** представлена разработка количественных моделей антипролиферативной активности нитрилсодержащих соединений на основе физико-химических дескрипторов,

полученных в результате молекулярного докинга оценочных функций и рассчитанных на их основе комплексных параметров – липофильности, зависящей от эффективности лиганда (LELP) и индекса эффективности поверхностного связывания (SEI).

В главе 7 приведено исследование по иммобилизации полинитрильных соединений на детонационных наноалмазах как перспективных средствах доставки к биомишеням, а также получение субстанций с наноалмазами на основе соединений-лидеров и их антипролиферативная активность.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Биологическая активность карбонитрилов и основные подходы к их получению

Согласно открытой базе данных DrugBank, в настоящее время известно 60 нитрилсодержащих соединений с доказанной клинической эффективностью и около 170 субстанций, находящихся на разных этапах исследований. В основном данные соединения обладают противоопухолевой активностью. Большинство нитрилсодержащих фармацевтических препаратов являются ароматическими, при этом алифатические, алкен- и азотсодержащие нитрилы встречаются реже. Хороший потенциал медицинского применения имеют енаминотрилы, среди которых получены соединения с цитотоксическим, противоопухолевым, антибактериальным и инсектицидным действием.

В настоящее время существуют различные методы получения нитрилсодержащих соединений. Анализ литературных источников показывает, что на протяжении последних 10 лет наиболее удобными и часто применяемыми синтетическими платформами являются малонитрил, производные димера малонитрила, тетрацианоэтилен и 4-оксоалкан-1,1,2,2-тетракарбонитрилы. Основными методами получения циклических соединений – конденсация Кнёвенагеля, присоединение по Михаэлю, реакции Видеквиста, Дильса-Альдера и др.

2. Этапы комплексного подхода разработки биологически активных соединений

На современном этапе развития фармацевтической отрасли создание новых лекарственных препаратов характеризуется направленным конструированием молекулы потенциального биологически активного соединения. Для сокращения затрат на разработку таких соединений все чаще применяется основанный на комплексном подходе метод виртуального скрининга.

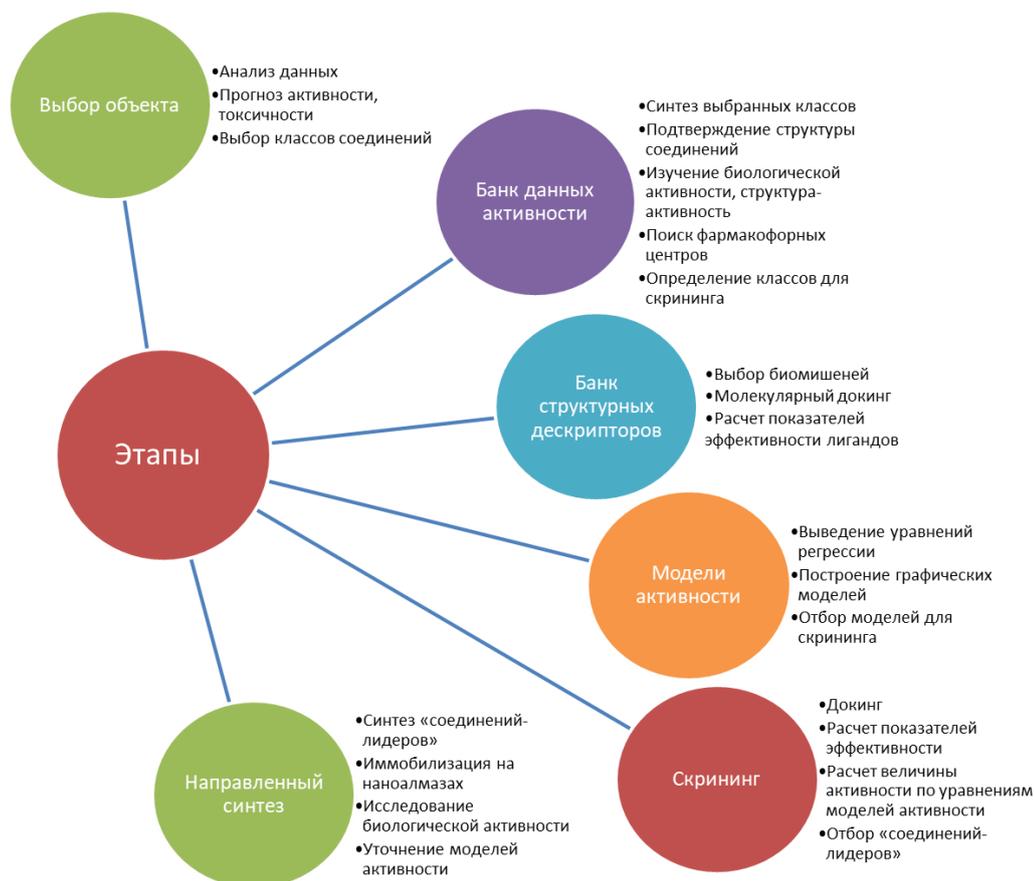
Данный метод базируется как на знании пространственного строения биомишени, так и на знании строения лигандов к молекуле-мишени. Центральное место в виртуальном скрининге занимает процедура молекулярного докинга, позволяющая смоделировать комплекс «лиганд – белок» и рассчитать константу связывания (аффинность). Для этого необходимо иметь представление о спектре возможной биологической активности соединений, а также данные их пространственного строения на основе рентгеноструктурного исследования.

Анализ данных литературы показал, что исследования биологической активности карбонитрилов носят ненаправленный, единичный характер и проводятся в дополнение к основным темам. Большая часть существующих нитрилсодержащих соединений не рассматривается как основа для разработки медицинских препаратов, что создает проблему для формирования базы данных об их биологической активности. Решить данную проблему возможно при направленном изучении возможной биологической активности нитрилсодержащих соединений для подтверждения ее наличия у определенных классов.

Таким образом, перед нами стояла задача выяснить, какие классы нитрилсодержащих соединений представляют наибольший интерес для разработки лекарственных субстанций.

Другая проблема при создании лекарственных субстанций – их доставка к клеткам-мишеням. Для ее решения в фармацевтическую и медицинскую практику активно вводятся инновационные системы доставки, наиболее перспективной из которых являются наноалмазы. Поэтому одним из элементов комплексного подхода к дизайну биологически активных субстанций является исследование иммобилизации нитрилсодержащих соединений на немодифицированные наноалмазы.

Таким образом, комплексный подход к дизайну биологически активных субстанций включает в себя шесть этапов:



Выбор объекта – анализ литературных данных по активности соединений, поиск их аналогов среди известных либо изучаемых лекарственных препаратов, выявление наиболее перспективных синтетических платформ.

Формирование *банка данных активности* выбранных классов, изучение связи «структура – активность», выявление фармакофорных центров – синтез выбранных классов, изучение их биологической активности.

Создание *банка структурных дескрипторов* – квантово-химические расчеты, докинг наиболее активных соединений по биологическим мишеням, расчет показателей эффективности связывания лигандов.

Построение *модели биологической активности* – регрессионный анализ активности соединений по показателям эффективности лигандов. При этом каждая получаемая модель анализируется на степень достоверности.

Виртуальный *скрининг* – на основе банка дескрипторов и полученных моделей активности проводится дизайн молекул и отбор «соединений-лидеров» для направленного синтеза биологически активных соединений.

Направленный синтез биологически активных соединений, иммобилизация на наноалмазах и углубленное исследование биологической активности нитрилсодержащих субстанций на наноалмазах.

3. Синтез и биологическая активность циклических поликарбонитрилов

Для определения наиболее перспективных классов карбонитрилов была проанализирована возможная биологическая активность различных нитрилсодержащих структур по системе PASS. При выборе соединений учитывались характер карбонитрильной группы и функциональное окружение.

В связи с вероятностью выделения синильной кислоты при метаболизме изучаемых соединений были исключены соединения с алифатической несопряженной карбонитрильной группой и рассматривались соединения с сопряженной, ароматической либо группой при четвертичном атоме углерода. Также не рассматривались соединения, имеющие плоскую структуру, так как взаимодействие с биологической мишенью предполагает гибкость молекулы лиганда. Кроме того, были рассмотрены представители классов соединений, содержащих карбо- и гетероциклы различного размера и напряженности – шести-, пяти-, четырех- и трехчленные.

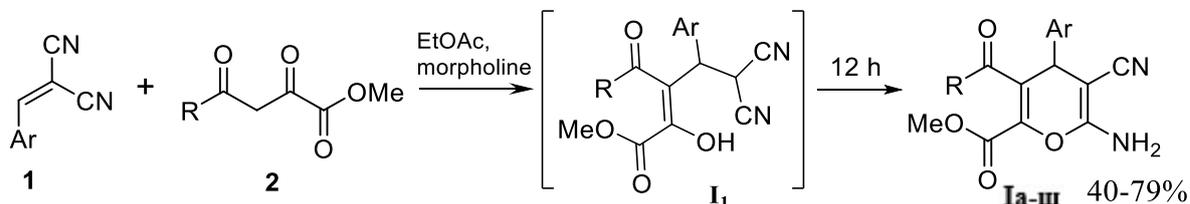
При определении потенциала соединений в первую очередь учитывалась противоопухолевая, антипролиферативная, антинеопластическая, а также анальгетическая, жаропонижающая, противомикробная, иммуностропная, гипогликемическая активность.

В результате были выбраны 14 наиболее перспективных классов для получения биологически активных нитрилсодержащих соединений.

3.1. Синтез и активность метил 6-амино-3-ацил-5-циано-4-арил-4*H*-пиран-2-карбоксилатов

Производные 2-амино-4*H*-пиран-3-карбонитрила обладают широким спектром биологического действия. Известны соединения с противораковой, противомикробной, антидепрессивной, ферментингибирующей, противодиабетической, противотуберкулезной, антиоксидантной и противомаларийной активностью.

С целью построения соединений, содержащих пирановый цикл, разработана эффективная методика на основе реакции арилиденмалонитрилов (АРМ) и метиловых эфиров ацилпириновинных кислот, позволяющая получать целевые продукты с высоким выходом (40-79%).



R = CH₃, 4-CH₃Ph, 4-CH₃OPh, 4-BrPh, 3-NO₂Ph, 3,4-(CH₃O)₂Ph, 2-Fu, 2-Thien
 Ar = 4-CH₃OPh, 4-CH₃OOCPh, 3,4,5-(CH₃O)₃Ph, 4-CH₃Ph, 2-F-6ClPh

Достоинством этого метода является чрезвычайная доступность исходных соединений **1,2**. На протекание реакции существенно оказывает влияние характер заместителей в кольце АРМ. Более интенсивно образование пиранов происходит в случае ОН, ОСН₃ замещенных соединений, однако выход целевых продуктов выше в случае *para*- и *ortho*-

галогенсодержащих АРМ, что объясняется их меньшей растворимостью и, следовательно, меньшими потерями при перекристаллизации.

Прогноз биологической активности данных структур показал, что полученные соединения могут обладать противовоспалительным, иммунотропным, противоопухолевым действием.

Фармакологическое изучение потенциального нестероидного противовоспалительного препарата включает оценку его основных терапевтических (противовоспалительного, анальгетического и жаропонижающего) свойств.

Оценку влияния соединений на восприятие термической соматической боли животных проводили методом "горячая пластинка" (hot plate) на белых мышах массой 16-22 г. Проведенные исследования выявили умеренное анальгетическое действие (табл. 1).

Таблица 1 - Анальгетическая активность пиранов I

Соединение	Доза мг/кг, внутрибрюшинно	Время оборонительного рефлекса	
		через 1 ч	через 2 ч
Контроль, 2%-я крахмальная слизь		14.0 ± 0.2	10.8 ± 1.6
Метамизол натрия	93 (ЕД ₅₀)	16.0 ± 1.0	16.3 ± 3.0
Диклофенак	50	-	30.8
Кеторолак	10	-	15.0
Кетопрофен	5	-	19.2
Морфин	5	-	29.1
Иб	50	-	15.0 ± 1.1
Иг	50	-	14.8 ± 0.9
Иж	50	-	19.0 ± 0.5
Ин	50	-	14.5 ± 0.5
Ис	50	-	14.0 ± 0.7
Иц	50	-	13.8 ± 0.6

Жаропонижающее действие оценивали по уменьшению гипертермии через 30 мин, 1, 2 и 3 часа после введения исследуемого вещества. Исследования проводили на беспородных белых крысах обоего пола, массой 220-280 г, лихорадочную реакцию вызывали внутримышечным введением пирогенала в дозе 400 мг/кг. В качестве препарата сравнения использовали ацетилсалициловую кислоту при внутрибрюшинном введении (табл. 2). Испытанные субстанции проявили активность на уровне эталонного препарата.

Таблица 2 - Жаропонижающая активность соединений I

Шифр	Доза, мг/кг	Исходная температура, °С	Температура при лихорадочной реакции, °С	Изменение температуры под влиянием изучаемых веществ, °С			
				30 мин	1 ч	2 ч	3 ч
Иб	50	36.8 ± 0.7	37.4 ± 0.6	37.0 ± 0.1	37.2 ± 0.2	37.7 ± 0.1	38.3 ± 0.5
Иг	50	37.1 ± 0.1	37.6 ± 0.2	37.2 ± 0.2	37.6 ± 0.4	38.1 ± 0.4	38.6 ± 0.4
Иж	50	37.3 ± 0.4	37.6 ± 0.4	37.4 ± 0.7	37.6 ± 0.8	38.6 ± 0.5	39.2 ± 0.3
Ин	50	36.5 ± 0.6	37.5 ± 0.2	37.4 ± 0.6	37.7 ± 0.3	38.3 ± 0.6	38.8 ± 0.5
Ис	50	37.4 ± 0.2	38.2 ± 0.4	37.6 ± 0.1	37.7 ± 0.1	37.8 ± 0.1	38.1 ± 0.1
Иц	50	36.7 ± 0.3	37.5 ± 0.6	37.1 ± 0.4	37.2 ± 0.4	38.2 ± 0.3	38.4 ± 0.2
Контроль		37.8 ± 0.3	38.7 ± 0.1	39.3 ± 0.2	39.4 ± 0.2	39.5 ± 0.4	39.4 ± 0.3
АСК	50	37.1 ± 0.3	37.8 ± 0.4	37.6 ± 0.3	37.7 ± 0.6	38.3 ± 0.8	38.6 ± 0.2

Антимикробную активность метил 6-амино-3-ацил-5-циано-4-арил-4*H*-пиран-2-карбоксилатов I определяли методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде. Бактериостатическую активность соединений оценивали по величине минимальной подавляющей концентрации (МПК) в мкг/мл, которая задерживала рост бактериальных культур. В тестах на кишечной палочке и золотистом стафилококке данные нитрилы проявляют низкую бактериостатическую активность (МПК 1000 мкг/мл).

Оценку влияния препаратов на гуморальный иммунный ответ изучали путем определения количества АОК в селезенке мышей после иммунизации эритроцитами барана методике Ерне – Нордина. Количество зон гемолиза, каждая из которых соответствует одной IgM-АОК, подсчитывали при боковом освещении. Результаты, учитывая log-нормальное распределение данных, выражали в виде log₁₀ АОК на весь орган. При анализе влияния соединений на количество АОК было обнаружено статистически значимое угнетающее влияние на количество антителообразующих клеток в селезенке мышей у соединений **Iб, Iг, Iж и Iн** (табл. 3):

Таблица 3 - Влияние соединений I на количество АОК

Соединение	Количество АОК в селезенке, млн/орг
контроль	56098,72
Iб	12783,2
Iг	10860,53
Iж	14153,28
Iн	9350
Iс	33349,33
Iц	34619,4

Таким образом, пираны **Iб, Iг, Iж и Iн** снижают выраженность антителогенеза и угнетают гуморальный иммунный ответ. Соединения **Iс и Iц**, содержащие остатки фурана и тиофена в боковой цепи заместителя в положении 3 пирана, на выраженность гуморального иммунного ответа практически не влияли. Следовательно, характер заместителя в положении 3 играет ключевую роль в проявлении активности. Соединения **Iб, Iг, Iж и Iн** рекомендованы для изучения их влияния на другие звенья иммунитета.

Для изучения антипролиферативной активности карбонитрилов были проведены исследования соединений полученных классов. В качестве метода для первичной оценки цитотоксического действия был использован МТТ-тест для линий опухолевых клеток человека из коллекции АТСС (табл. 4).

Таблица 4 - Результаты исследования антипролиферативной активности соединений I в концентрации 10⁻⁵ моль/л (по программе One-Dose Screen)

Соединение	Ингибирование роста клеточных линий злокачественных новообразований, %								
	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	легких (НМРЛ) (9 линий)	толстого кишечника (7 линий)	головного мозга (6 линий)	кожи (меланома) (9 линий)	яичников (7 линий)	почек (7 линий)	представительной железы (2 линии)	молочной железы (6 линий)
Дакарбазин	36.2 ± 2.0	20.8 ± 1.6	3.4 ± 1.4	6.9 ± 1.2	12.6 ± 1.7	14.5 ± 1.4	26.3 ± 1.8	5.7 ± 1.2	15.0 ± 3.3
Бусульфан	-	-	-	-	18.80 ± 1.98	-	-	-	-
Цисплатин	-	32.1 ± 2.2	-	13.9 ± 1.3	14.2 ± 1.1	26.9 ± 1.9	18.1 ± 1.7	19.9 ± 2.1	10.9 ± 1.0
Доксорубин	110.2 ± 9.8	103.4 ± 19.0	110.4 ± 25.1	122.6 ± 30.2	143.2 ± 31.7	104.0 ± 29.7	103.6 ± 18.6	92.8 ± 10.8	126.3 ± 40.0
Iи	-	7.5 ± 3.8	-	-	5.9 ± 2.0	-	7.9 ± 4.4	-	-
Iм	-	8.2 ± 3.9	-	-	-	-	5.9 ± 2.1	-	-
Iю	-	7.1 ± 3.2	-	6.0 ± 2.6	-	-	6.4 ± 3.2	-	-
Iр	-	-	-	7.4 ± 4.1	-	-	7.0 ± 3.1	-	-
Iц (Ar = 3,4,5-CH ₃ O) ₃ C ₆ H ₂ R = CH ₃)	-	6.0 ± 2.3	-	6.7 ± 4.3	5.8 ± 1.8	-	-	-	-

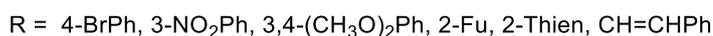
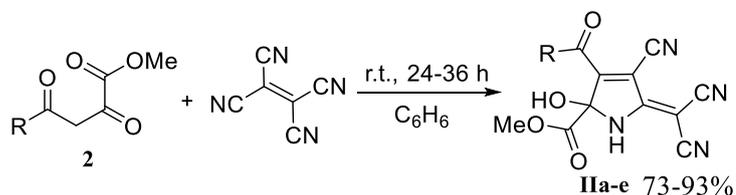
По результатам испытаний видно, что пираны **I** оказывают слабое ингибирующее пролиферацию клеток действие.

Таким образом, метил 6-амино-3-ацил-5-циано-4-арил-4*H*-пиран-2-карбоксилаты представляют интерес для разработки препаратов иммуностропного действия.

3.2. Синтез и активность метил 3-ацил-4-циано-5-(дицианометилен)-2-гидрокси-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-2-карбоксилатов

Известно, что многие биологически активные соединения содержат в составе азотсодержащие гетероциклы. Производные пиррола признаны ингибиторами обратной транскриптазы (ВИЧ-1) и протеинкиназ клеточной ДНК-полимеразы. Они проявляют широкий спектр биологической активности – противораковую, антибактериальную, противовирусную, противогрибковую, противовоспалительную.

В ходе проведенного исследования был разработан метод получения метил 3-ацил-4-циано-5-(дицианометилен)-2-гидрокси-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-2-карбоксилатов **II** на основе реакции эфиров ацилпировиноградных кислот с ТЦЭ. Установлено, что при выдерживании их смеси в бензоле при комнатной температуре образуются метил-3-ацил-4-циано-5-(дицианометилен)-2-гидрокси-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-2-карбоксилаты (**IIa-e**). Контроль над ходом реакции и чистотой синтезированных соединений осуществляли методом тонкослойной хроматографии на пластинках Sorbfil (элюент – этилацетат, проявление в УФ-свете, параами йода и термическим разложением).



Пирролы **II** обладают уникальными характеристиками – растворимы в воде и в полярных органических растворителях (ацетон, ацетонитрил, этилацетат, ДМСО, ДМФА, этанол, хлороформ и др.), содержат неизвестное ранее сочетание разнообразных функциональных групп – CN, C=C, COOCH₃, C=O, OH, NH.

Структура метил-4-циано-5-(дицианометилен)-2-гидрокси-3-(фуран-2-карбонил)-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-2-карбоксилата (**IIб**) однозначно установлена методом РСА (данные кристаллографии находятся в базе Кембриджского кристаллографического центра, CCDC 1506201). Исследование антипролиферативной активности пирролов **II** показало, соединения проявляют слабую активность.

Анализ структуры соединений **II** показал, что полученные дицианометилен-2,5-дигидро-1*H*-пирролы – аналоги известных донорно-акцепторных хромофоров и которые представляют интерес в качестве люминесцентных сенсорных меток при исследовании метаболизма и распределения лекарственных средств в живых клетках, жидкостях организма.

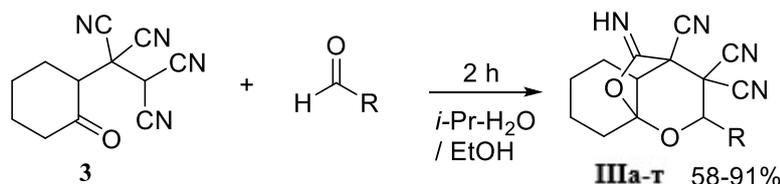
Таким образом, предложенные структуры представляют интерес для разработки фармацевтических субстанций для биомедицинских исследований.

3.3. Синтез и активность 2-замещенных 10-иминотетрагидро-8*a*,4-(эпоксиметано)хромен-3,3,4(2*H*,4*aH*)-трикарбонитрилов

Известно, что хромены представляют биологически важный класс органических соединений. Они широко распространены в природе и способны взаимодействовать с множеством биомолекул, как правило, с высоким терапевтическим индексом. Значительную роль хромены играют при разработке препаратов для лечения онкологических заболеваний. 4*H*-хромены обладают сильной цитотоксичностью в отношении раковых клеток человека,

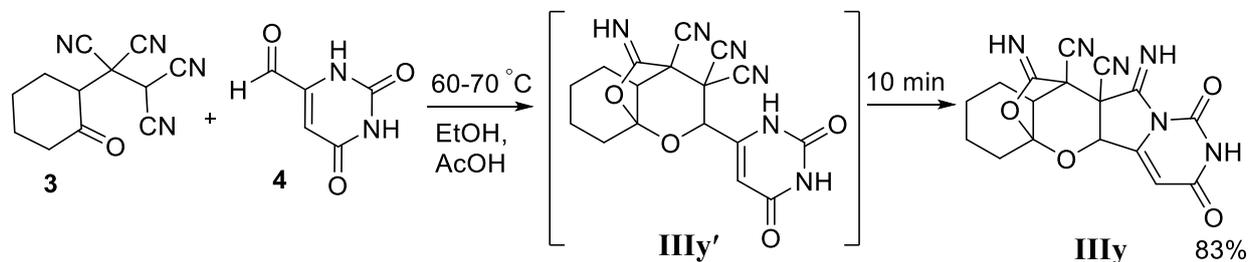
вызывая деполаризацию микротрубочек веретена деления и разрушение сосудистой сети опухоли (например «Кролибулин» и др.).

Поэтому представляло интерес получение соединений, содержащих ядро хромен-3,3,4(2*H*,4*aH*)-трикарбонитрила. С этой целью была использована реакция 1-(2-оксоциклогексил)этан-1,1,2,2-тетракарбонитрила **3** с ароматическими и α,β -непредельными альдегидами. В результате непрерывного перемешивания реагентов в среде пропан-2-ол – вода или этаноле в течение 2 ч получены с хорошими выходами соответствующие 10-иминотетрагидро-8*a*,4-(эпоксиметано)хромен-3,3,4(2*H*,4*aH*)-трикарбонитрилы (**IIIa-г**) (58-91%):



R = 4-НОPh, 4-(СН₃)₂Ph, 2-НООСPh, 4-СН₃ООСPh, 3-СН₃Ph, 3-NO₂Ph, 4-ОН-3-СН₃OPh, 2-*F*-6-СlPh, 3,4,5-(СН₃О)₃Ph, СН=СНСН₃, СН=СНPh, С≡СPh, С≡СС₄Н₉, 5-NO₂-Fu-2-yl, 6-*F*-4-oxo-4*H*-chromen-3-yl, (4+6)-(СН₃)₂С-cyclohex-1-en-1-yl, СН=С(СН₃)(СН₂)₂С=С(СН₃)₂

При введении в реакцию оротового альдегида (**4**), взаимодействие не прекращается на стадии иминодиоксатрицикла (**IIIy'**). Дальнейшие превращения протекают по свободной цианогруппе в положении 8 и имидной группе пиримидина с образованием необычного полициклического соединения – 11,13-диимино-1,3-диоксо-1,2,3,4*b*,7,8,9,9*a*-октагидро-5*a*,10-(эпоксиметано)хромено[2',3':3,4]пирроло[1,2-*c*]пиримидин-10,10*a*(6*H*,11*H*)-дикарбонитрила **IIIy**, растворимого в этаноле при нагревании, этилацетате и ацетоне.



Строение полученных хроменов **III** доказано данными ИК, ЯМР-¹H, ¹³C и масс-спектров, а также РСА (рис. 1–4).

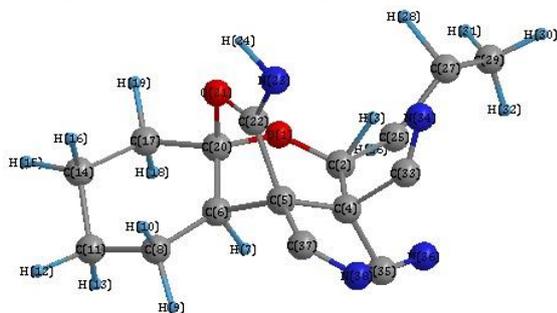


Рисунок 1. Молекулярная структура 10-имино-2-(проп-1-ен-1-ил)тетрагидро-8*a*,4-(эпоксиметано)-хромен-3,3,4(2*H*,4*aH*)-трикарбонитрила – **IIIк** (CCDC 1862746).

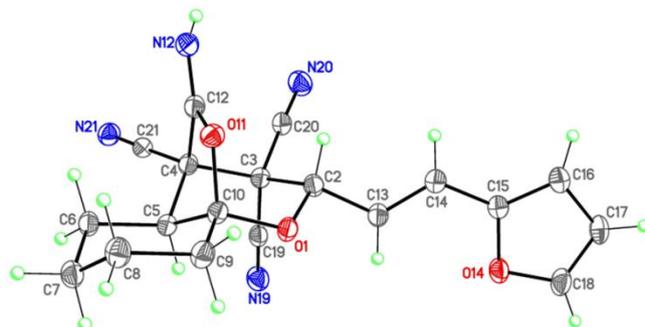


Рисунок 2. Молекулярная структура 10-имино-2-(2-(фуран-2-ил)винил)-гексагидро-8*a*,4-(эпоксиметано)-хромен-3,3,4(2*H*)-трикарбонитрила – **IIIм** (CCDC 1862710).

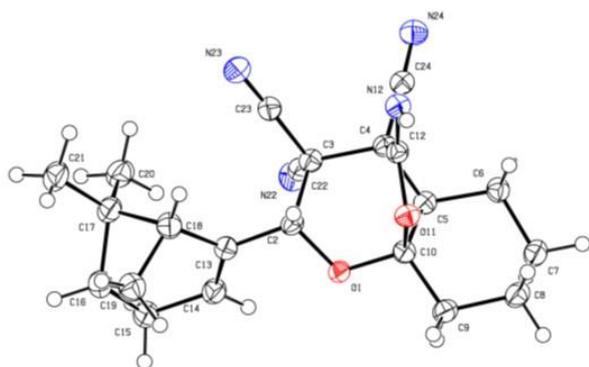


Рисунок 3. Молекулярная структура 10-имино -2-(6,6-диметилбикакло[3.1.1]гепт-2-ен-2-ил)-гексагидро-8а,4-(эпоксиметано)хромен-3,3,4(2H)-трикарбонитрила – I (CCDC 1862711).

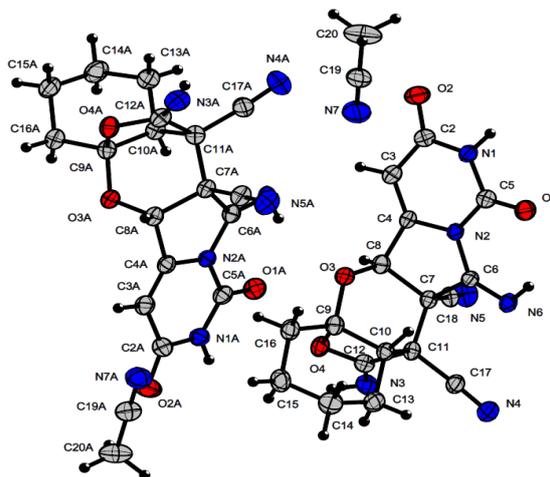


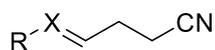
Рисунок 4. Молекулярная структура соединения III. Две независимые молекулы сольватированы с двумя молекулами растворителя ацетонитрила. (CCDC 2041681).

Анализ структур программой PASS показал, что полученные соединения потенциально обладают противовоспалительным и противоопухолевым действием. Как и для пиранов I, проведено исследование анальгетической и антипролиферативной активности (таблицы 5, 6).

Таблица 5 - Анальгетическая активность соединений III

Соединение	Доза мг/кг, внутривенно	Время оборонительного рефлекса	
		через 1 ч	через 2 ч
Контроль, 2%-я крахмальная слизь		14.0 ± 0.2	10.8 ± 1.6
Метамизол натрия	93 (ЕД ₅₀)	16.0 ± 1.0	16.3 ± 3.0
Диклофенак	50	-	30.8
Кеторолак	10	-	15.0
Кетопрофен	5	-	19.2
Морфин	5	-	29.1
IIIв	50	-	19.2 ± 0.9
IIIж	50	-	19.1 ± 0.5
IIIи	50	-	20.7 ± 1.1
IIIф (R = 4-CH ₃ OC ₆ H ₄)	50	-	18.8 ± 1.4
IIIх (R = 2-C ₄ H ₉ O)	50	-	19.6 ± 0.6

Результаты измерения антиноцицептивного действия показывают, что данные субстанции не уступают по силе эффекта известным НПВП – анальгину, кеторолаку, кетопрофену и полностью превосходят нитрилы I. Это связано, по-видимому, с наличием определенного фармакофорного центра. При анализе активности в других рядах нитрилов (IV, V) и сравнении строения соединений-лидеров установлена вероятная структура фармакофора



X = N, O; R = H, Alk, Aryl

Таблица 6 - Результаты исследования антипролиферативной активности соединений III в концентрации 10^{-5} моль/л (по программе One-Dose Screen)

Соединение	Ингибирование роста клеточных линий злокачественных новообразований, %								
	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	легких (НМРЛ) (9 линий)	толстого кишечника (7 линий)	головного мозга (6 линий)	кожи (меланома) (9 линий)	яичников (7 линий)	почек (7 линий)	предстательной железы (2 линии)	молочной железы (6 линий)
Дакарбазин	36.2 ± 2.0	20.8 ± 1.6	3.4 ± 1.4	6.9 ± 1.2	12.6 ± 1.7	14.5 ± 1.4	26.3 ± 1.8	5.7 ± 1.2	15.0 ± 3.3
Бусульфан	-	-	-	-	18.8 ± 2.0	-	-	-	-
Цисплатин	-	32.1 ± 2.2	-	13.9 ± 1.3	14.2 ± 1.1	26.9 ± 1.9	18.1 ± 1.7	19.9 ± 2.1	10.9 ± 1.0
Доксорубин	110.2 ± 9.8	103.4 ± 19.0	110.4 ± 25.1	122.6 ± 30.2	143.2 ± 31.7	104.0 ± 29.7	103.6 ± 18.6	92.8 ± 10.8	126.3 ± 40.0
Шб	6.4 ± 3.5	6.5 ± 2.4	-	-	6.6 ± 3.7	-	-	-	6.2 ± 3.1
Шв	6.4 ± 3.6	6.0 ± 2.2	-	-	7.8 ± 3.2	-	-	-	9.2 ± 6.6
Шж	8.3 ± 3.6	6.7 ± 2.6	-	6.1 ± 2.7	-	-	6.9 ± 4.5	-	7.6 ± 3.8
Ши	10.4 ± 4.8	5.9 ± 2.1	-	7.3 ± 3.9	6.3 ± 3.0	-	6.4 ± 3.3	-	9.8 ± 3.8
Шм	12.5 ± 1.0	14.9 ± 1.2	-	-	13.4 ± 1.4	-	-	-	15.4 ± 1.8
Шо	18.5 ± 1.8	11.5 ± 1.5	11.2 ± 1.5	16.3 ± 1.3	15.9 ± 1.8	12.7 ± 1.9	36.8 ± 1.1	13.2 ± 1.9	13.7 ± 1.2
Шп	16.0 ± 1.3	29.4 ± 1.9	-	-	-	-	-	21.6 ± 1.5	14.9 ± 1.1
Шр	14.7 ± 1.2	-	-	-	10.7 ± 1.2	-	-	-	16.8 ± 1.8
Шс	31.8 ± 2.0	12.1 ± 1.5	-	-	12.2 ± 1.2	-	-	10.8 ± 1.8	-
Шт	21.1 ± 1.0	23.5 ± 1.5	12.0 ± 1.7	12.5 ± 1.0	19.2 ± 1.2	14.5 ± 1.5	-	19.0 ± 1.9	11.6 ± 1.6
Шу	18.4 ± 1.2	26.0 ± 1.0	-	-	12.3 ± 1.6	-	-	-	11.3 ± 1.5

При анализе активности хромен-3,3,4(2*H*,4*aH*)-трикарбонитрилов III установлена сильная зависимость от характера заместителя в положении 2. Данный заместитель влияет на таргетность действия соединений в отношении клеточных линий злокачественных новообразований, что связано, по-видимому, с узнаванием участка молекулы и транспортом внутрь клетки. Так, специфичными маркерами могут быть остатки терпенов (миртеналь – Шо, рак почек), 5-нитрофурана (Шп, рак легких, предстательной железы), илиденпроизводных (Шс,т – лейкоз). Данное предположение косвенно подтверждается наличием активности других соединений с остатком миртеняля (VIг, VIз, VIи).

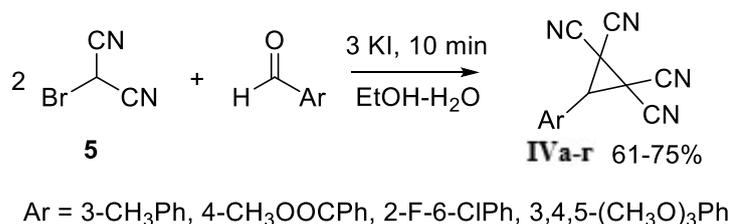
Следовательно, разработка противораковых препаратов этой группы возможна, но необходима соответствующая модификация структуры.

Слабая противомикробная активность у соединений III обнаружена в отношении культур: *St. aureus* 65338P ATCC и *E. coli* 25922 ATCC (МПК 500-1000 мкг/мл).

3.4. Синтез и активность 3-арилциклопропан-1,1,2,2-тетракарбонитрилов

В продолжение поиска новых фармакофорных центров было необходимо получить соединения с циклоалканполикарбонитрильным фрагментом. В литературе практически отсутствуют исследования биологической активности циклопропантетракарбонитрилов.

Взаимодействием броммалонитрила 5 с ароматическими альдегидами были получены соответствующие циклопропан-1,1,2,2-тетракарбонитрилы (IVа-г) (61-75%).

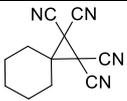
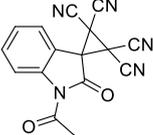
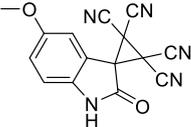


Установлено, что целевые соединения **IV** образуются с большими выходами при использовании свежеприготовленного броммалонитрила и соотношении реагентов альдегид – броммалонитрил – KI 1:2:3. Оптимальное время перемешивания составляет 10–15 мин, так как при более длительном проведении реакции возможно осмоление реакционной смеси

Несмотря на небольшое количество исследований активности циклопропан-тетракарбонитрилов, спектр их прогнозируемого биологического действия достаточно широк – антиноцицептивное, противовоспалительное, противоопухолевое т.д.

Нами установлено, что 3-арилциклопропан-1,1,2,2-тетракарбонитрилы **IV** оказывают выраженное антиноцицептивное действие (табл. 7).

Таблица 7 - Анальгетическая активность соединений **IV**

Соединение	Доза, мг/кг, внутрибрюшинно	Время оборонительного рефлекса	
		через 1 ч	через 2 ч
Контроль, 2%-я крахмальная слизь		14.0 ± 0.2	10.8 ± 1.6
Метамизол натрия	93 (ED ₅₀)	16.0 ± 1.0	16.3 ± 3.0
Диклофенак	50	-	30.8
Кеторолак	10	-	15.0
Кетопрофен	5	-	19.2
Морфин	5	-	29.1
IVa	50	-	20.1 ± 1.5
IVб	50	-	23.8 ± 0.9
IVв	50	-	21.4 ± 0.7
IVг	50	-	19.3 ± 0.5
IVд (Ar = 4-CH ₃ OC ₆ H ₄)	50	-	19.0 ± 1.0
IVе (Ar = 2-C ₄ H ₃ O)	50	18.0 ± 1.4	19.4 ± 1.1
	50	19.2 ± 1.2	20.6 ± 1.2
	50	17.6 ± 1.1	19.7 ± 1.2
	50	19.4 ± 0.7	21.2 ± 1.7

Учитывая, способность нитрильных групп к образованию водородных связей и наличие достоверно подтвержденной активности практически всех исследованных соединений, можно предположить, что механизм снижения возбудимости рецепторов состоит в связывании субстанций с субстратом по донорно-акцепторному типу через карбонитрильную группу.

Соединения ряда 3-арилциклопропан-1,1,2,2-тетракарбонитрилов (**IV**) показали стабильный уровень анальгетической активности, что позволяет рассматривать их как наиболее перспективный класс для разработки лекарственных субстанций. Для оценки их безопасности были отобраны три соединения для исследования острой токсичности.

Острую токсичность соединений определяли на нелинейных белых мышах массой 20-25 г по экспресс-методу В.Б Прозоровского. Проведенные исследования показали, что изученные соединения по классификации К.К. Сидорова относятся к 5-му классу токсичности и являются

практически нетоксичными соединениями. Токсичность (LD₅₀) соединений **IVб**, **IVв**, **IVд** составляет соответственно 2000, 1500, 3000 мг/кг.

При оценке противомикробных свойств полученных циклопропанов, установлено, что субстанции, содержащие циклопропан-1,1,2,2-тетракарбонитрильный фрагмент, обладают средней ингибирующей активностью в отношении грамположительного мезитилрезистентного золотистого стафилококка при наличии спиросочленения в структуре (МПК 62.5-250 мкг/мл).

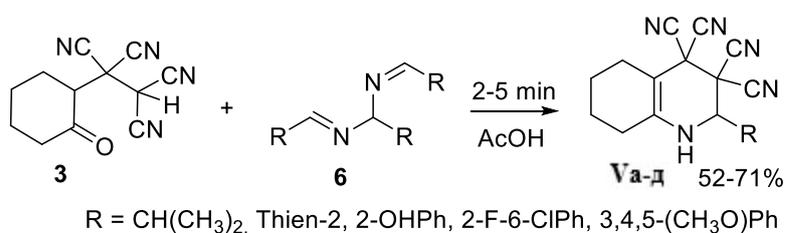
Таким образом, циклопропан-1,1,2,2-тетракарбонитрилы можно рассматривать и как потенциальные противомикробные субстанции.

3.5. Синтез и активность 2-замещенных 1,2,5,6,7,8-гексагидрохинолин-3,3,4,4-тетракарбонитрилов

Одним из трендов в синтезе фармакологически активных субстанций является уход от плоских структур за счет гетероциклов или спиросочленения. С этой точки зрения большой потенциал имеют гидрированные хинолины.

Соединения на основе хинолина представляют собой важный класс гетероциклических соединений, они присутствуют во многих натуральных и синтетических продуктах. Фармакологические исследования показывают, что хинолиновая кольцевая система имеет широкий диапазон биологической активности, в том числе противоопухолевую, противовирусную, антибактериальную, противогрибковую, противовоспалительную и антитромбоцитарную.

Для получения соединений данного класса была использована реакция 1,3,5-замещенных 2,4-диазепентадиенов-1,4 **6** с 1-(2-оксоциклогексил)этан-1,1,2,2-тетракарбонитрилом **3**. При кратковременном перемешивании реагентов в ледяной уксусной кислоте получены соответствующие 2-замещенные 1,2,5,6,7,8-гексагидрохинолин-3,3,4,4-тетракарбонитрилы (**Va-d**) (52-71%).



Строение подтверждено спектральными методами. Молекулярная структура 2-(2-хлор-6-фторфенил)-1,2,5,6,7,8-гексагидрохинолин-3,3,4,4-тетракарбонитрила (**Vг**) подтверждена методом PCA (CCDC 1506765).

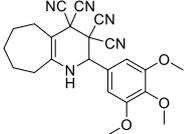
Проведенные исследования показали, что хинолины **V** представляют интерес для разработки препаратов анальгетического действия, так как испытанное в тесте «горячая пластинка» соединение **Ve** (R = 4-CH₃OC₆H₄) увеличивает латентный период оборонительного рефлекса животных. Противомикробная активность протестированных хинолинов составила 500-1000 мкг/мл.

Антипролиферативная активность полученных 1,2,5,6,7,8-гексагидрохинолин-3,3,4,4-тетракарбонитрилов изучена в серии независимых опытов по программе One-Dose Screen в Национальном институте онкологии (США) и на базе НОЦ фармацевтики при Казанском (Приволжском) федеральном университете (табл. 8 и 9).

Таблица 8 - Результаты исследования антипролиферативной активности соединений V в концентрации 10^{-5} моль/л (по программе One-Dose Screen)

Соединение	Ингибирование роста клеточных линий злокачественных новообразований, %								
	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	костного мозга (лейкоз) (6 линий)
Дакарбазин	36.2 ± 2.0	20.8 ± 1.6	3.4 ± 1.4	6.9 ± 1.2	12.6 ± 1.7	14.5 ± 1.4	26.3 ± 1.8	5.7 ± 1.2	15.0 ± 3.3
Бусульфан	-	-	-	-	18.8 ± 2.0	-	-	-	-
Цисплатин	-	32.1 ± 2.2	-	13.9 ± 1.3	14.2 ± 1.1	26.9 ± 1.9	18.1 ± 1.7	19.9 ± 2.1	10.9 ± 1.0
Доксорубин	110.2 ± 9.8	103.4 ± 19.0	110.4 ± 25.1	122.6 ± 30.2	143.2 ± 31.7	104.0 ± 29.7	103.6 ± 18.6	92.8 ± 10.8	126.3 ± 40.0
Va	9.0 ± 1.1	14.0 ± 3.0	8.2 ± 3.7	7.2 ± 3.6	11.1 ± 2.2	6.2 ± 2.9	9.3 ± 2.3	-	25.4 ± 5.4
Vб	50.6 ± 9.6	13.1 ± 2.2	19.9 ± 11.6	-	8.2 ± 3.6	10.9 ± 2.1	20.2 ± 6.2	-	17.3 ± 6.6
Vг	62.4 ± 9.6	22.9 ± 13.0	28.7 ± 12.0	19.8 ± 13.6	39.5 ± 9.5	17.5 ± 6.4	11.2 ± 5.1	-	45.4 ± 18.8
Ve	74.8 ± 14.8	13.7 ± 2.0	32.2 ± 9.4	17.2 ± 3.5	10.4 ± 3.8	13.7 ± 8.6	22.5 ± 5.9	-	35.6 ± 9.8

Таблица 9 - Концентрации полумаксимального ингибирования роста клеток IC₅₀ соединений V, мкМ

Шифр	Клеточные линии									
	MCF-7	HSF	M-14	PC-3	NCI-H322M	SNB-19	A-498	HCT-116	MDA-MB 231	OVCAR-4
Доксорубин	0.13 ± 0.05	0.8 ± 0.01	0.14 ± 0.09	0.1 ± 0.06	0.15 ± 0.07	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.00	0.08 ± 0.03	0.2 ± 0.10	0.15 ± 0.07
Vг	58.0 ± 11.0	93.0 ± 1.3	44.0 ± 1.9	44.0 ± 3.5	98.0 ± 1.0	77.0 ± 3.8	82.0 ± 2.3	45.0 ± 0.9	55.0 ± 7.3	79.0 ± 0.6
Ve	24.0 ± 14.0	24.0 ± 4.0	14.0 ± 3.0	27.0 ± 4.0	69.0 ± 4.0	70.0 ± 13.0	-	47.0 ± 16.0	-	29.0 ± 6.0
	31.0 ± 1.0	48.0 ± 11.0	39.0 ± 4.0	50.0 ± 3.0	70.0 ± 3.0	184.0 ± 36.0	-	26.0 ± 8.0	-	55.0 ± 17.0

При анализе полученных данных антипролиферативной активности установлено влияние заместителей на интенсивность цитостатического действия.

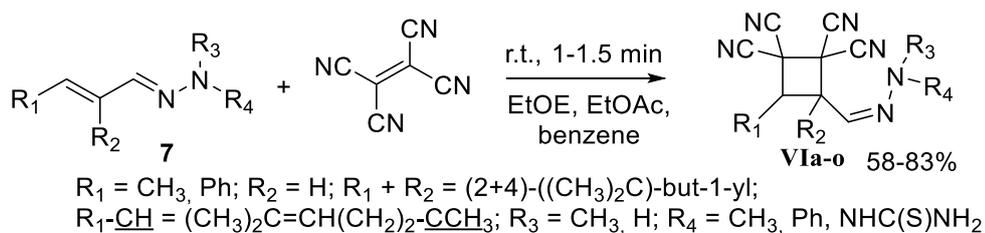
Ядро хинолин-3,3,4,4-тетракарбонитрила является специфическим фармакофорным центром антипролиферативного действия в отношении клеточных линий лейкоза (Vг, Ve, XVж). В отношении остальных клеток для проявления активности необходимо присутствие арильного заместителя в положении 2 (Vг, Ve). При этом, внутримолекулярная циклизация с образованием системы 2,7-дизабицикло[3.2.1]окт-3-ена (XVз) приводит к падению активности. Количество карбонитрильных групп, по-видимому, не оказывает существенного действия (XVж).

3.6. Синтез и активность циклобутан-1,1,2,2-тетракарбонитрилов и 3,6-дизамещенных циклогекс-4-ен-1,1,2,2-тетракарбонитрилов

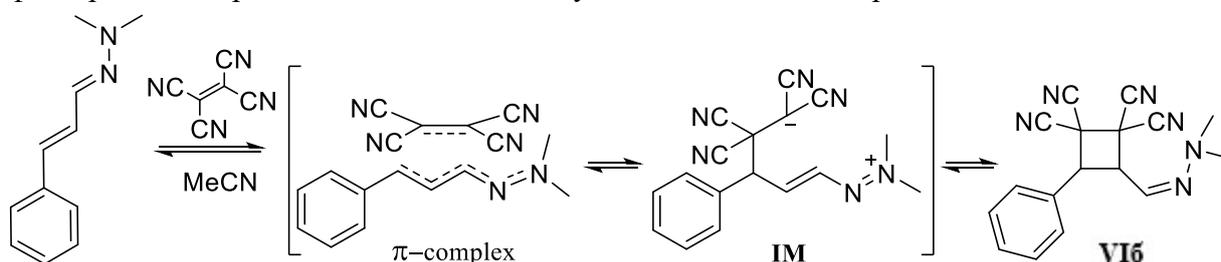
В продолжение изучения биологической активности циклоалканкарбонитрилов перед нами стояла задача получения соединений, содержащих карбонитрилзамещенные четырех- и шестичленные циклы – циклобутан- и циклогексентетракарбонитрилы.

Циклобутан-1,1,2,2-тетракарбонитрилы образуются в реакциях [2+2] циклоприсоединения ТЦЭ с непредельными соединениями.

При изучении реакции ТЦЭ с гидразонами α,β -непредельных альдегидов 7 (кротоновый, кориичный, цитраль, миртеналь) вместо ожидаемых продуктов [4+2] циклоприсоединения (аддуктов ДА) – циклогексенкарбонитрилов были получены 1,2-дизамещенные циклобутан-1,1,2,2-тетракарбонитрилы (VIa-o) (58-83%).



Для установления причин нетипичного протекания реакции и ее схемы механизма было проведено разделение реакционной смеси N,N-диметилгидразона коричневого альдегида и ТЦЭ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием (подвижная фаза – ацетонитрил марки «для хроматографии»). При анализе хроматограммы установлено, что в смеси помимо исходных гидразона, ТЦЭ, π -комплекса ТЦЭ с ароматическим кольцом и продукта [2+2] циклоприсоединения присутствует в незначительных количествах соединение, которое предположительно является промежуточным продуктом – интермедиатом (**IM**), зафиксированное приблизительно на 5-й минуте от момента ввода пробы.



При анализе УФ-спектров установлено, что гидразон, ТЦЭ, π -комплекс и интермедиат имеют интенсивное поглощение. Максимумы поглощения регистрируются в области 285-397 нм в том числе при 285 нм (**IM**), 297 нм (ТЦЭ), 327 нм (гидразон), 394 нм (π -комплекс).

Для изучения возможных причин нетипичного протекания реакции были проведены квантовые расчеты энергий всех возможных переходных состояний. Для теоретического изучения были смоделированы реакции N,N-диметил- и N,N-дифенилгидразона коричневого альдегида с ТЦЭ в среде неполярного растворителя – бензола. Были проанализированы как цис- так и транс- конформации изучаемых гидразонов (рис. 5).

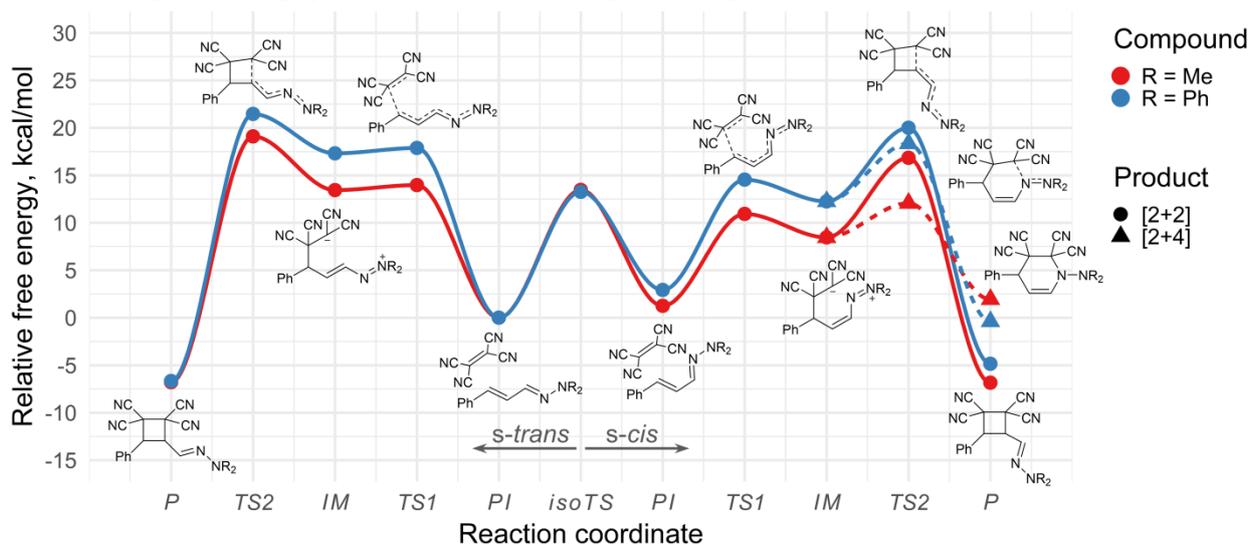


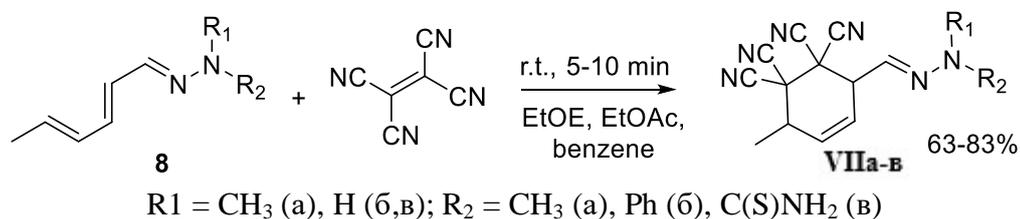
Рисунок 5. Относительные свободные энергии по путям реакций ТЦЭ с N,N-диметил- (красный) или N,N-дифенил- (синий) гидразонами; рассчитанные значения показаны в виде круглых и треугольных точек и соединены линиями

Расчеты показали, что цвиттер-ионный промежуточный **IM** достаточно стабилен, чтобы предотвратить образование связи C–N синхронно с первой, но недостаточно, чтобы быть

единственным продуктом реакции. Продукт циклоприсоединения [2+2], содержащий две новые связи С–С, оказывается более стабильным, чем продукт [4+2] циклизации с вновь образованными связями С–С и С– (рис. 5), и последний имеет практически ту же энергию, что и исходный π -комплекс, поэтому разрыв связи С–N, приводящий к переходу в промежуточное соединение, возможен.

Таким образом, согласно расчетам, P-[4+2] - это кинетический продукт, который сохраняется в равновесии с π -комплексом, в то время как P-[2+2] – термодинамический продукт, в котором реакция заканчивается в заданное время. N,N-диметилгидразон имеет более низкие энергетические барьеры активации, чем N,N-дифенил, что можно объяснить стерическими затруднениями фенильных групп.

Циклогекс-4-ен-1,1,2,2-тетракарбонитрилы являются продуктами классической реакции ДА – [4+2] циклоприсоединения – ТЦЭ и сопряженных диенов. При введении в реакцию гидразонов сорбинового альдегида **8** были получены соответствующие 3-метил-6-((2-R-гидразоно)метил)циклогекс-4-ен-1,1,2,2-тетракарбонитрилы (**VIIa-в**).



Строение соединений **VI-VII** доказано данными ИК, ЯМР-¹H, ¹³C и масс-спектров, а также РСА (рис. 6–9)

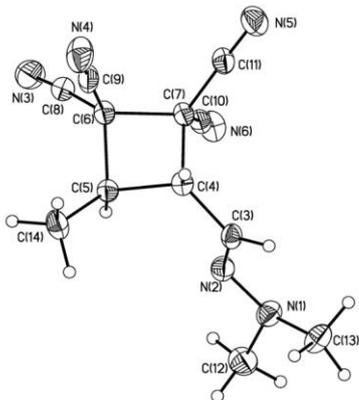


Рисунок 6. Молекулярная структура 3-((2,2-диметилгидразоно)метил)-4-метилциклобутан-1,1,2,2-тетракарбонитрила (VIa, CCDC 1881779)

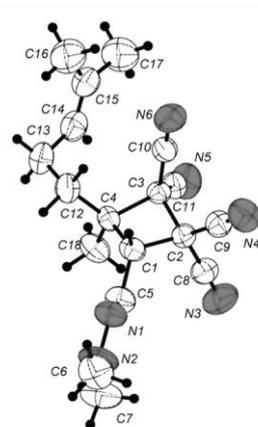


Рисунок 7. Молекулярная структура 4-((2,2-мителигидразоно)метил)-3-метил-3-(4-метилпент-3-ен-1-ил)циклобутан-1,1,2,2-тетракарбонитрила (VIb, CCDC 1479581)

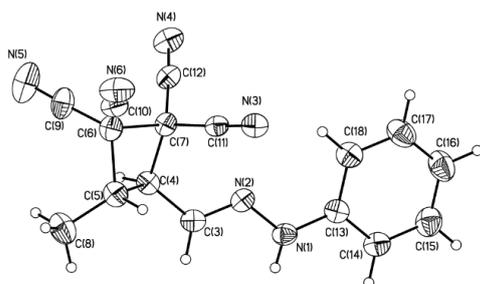


Рисунок 8. Молекулярная структура 3-метил-4-((2-фенилгидразоно)метил)циклобутан-1,1,2,2-тетракарбонитрила (VIc, CCDC 1881778)

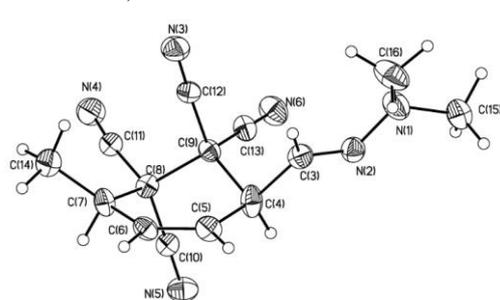


Рисунок 9. Молекулярная структура 3-((2,2-диметилгидразоно)метил)-6-метилциклогекс-4-ен-1,1,2,2-тетракарбонитрила (VIIa, CCDC 1881780)

Исследование антипролиферативной активности синтезированных соединений показало, что циклобутан-1,1,2,2-тетракарбонитрилы **VI** являются наиболее перспективной группой нитрилов для разработки препаратов цитотоксического действия (табл. 10). Циклогекс-4-ен-1,1,2,2-тетракарбонитрилы существенно меньше подавляют рост тест-культур.

Таблица 10 - Результаты исследования антипролиферативной активности соединений **VI**, **VII** в концентрации 10^{-5} моль/л (по программе One-Dose Screen)

Соединение	Ингибирование роста клеточных линий злокачественных новообразований, %								
	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	костного мозга (лейкоз) (6 линий)
Дакарбазин	36.2 ± 2.0	20.8 ± 1.6	3.4 ± 1.4	6.9 ± 1.2	12.6 ± 1.7	14.5 ± 1.4	26.3 ± 1.8	5.7 ± 1.2	15.0 ± 3.3
Бусульфан	-	-	-	-	18.8 ± 2.0	-	-	-	-
Цисплатин	-	32.1 ± 2.2	-	13.9 ± 1.3	14.2 ± 1.1	26.9 ± 1.9	18.1 ± 1.7	19.9 ± 2.1	10.9 ± 1.0
Доксорубин	110.2 ± 9.8	103.4 ± 19.0	110.4 ± 25.1	122.6 ± 30.2	143.2 ± 31.7	104.0 ± 29.7	103.6 ± 18.6	92.8 ± 10.8	126.3 ± 40.0
VIa	-	11.2 ± 1.3	-	-	14.1 ± 1.6	-	15.6 ± 1.1	10.3 ± 1.2	-
VIг	14.2 ± 1.4	12.2 ± 1.1	-	-	-	-	14.1 ± 1.3	-	-
VIд	37.4 ± 5.8	25.3 ± 4.7	31.0 ± 4.5	27.0 ± 1.2	55.0 ± 3.6	23.9 ± 5.3	39.0 ± 3.0	22.2 ± 2.0	20.7 ± 2.8
VIе	71.2 ± 6.1	44.8 ± 5.9	52.5 ± 4.8	36.9 ± 4.8	49.4 ± 5.2	32.8 ± 2.4	43.1 ± 5.6	39.4 ± 4.3	41.3 ± 5.7
VIж	18.0 ± 1.2	12.5 ± 1.8	-	10.3 ± 1.4	18.7 ± 1.7	-	15.7 ± 2.0	20.7 ± 1.6	15.1 ± 1.9
VIз	13.8 ± 1.9	16.3 ± 1.5	15.8 ± 1.7	13.7 ± 1.5	35.2 ± 5.6	35.1 ± 6.3	24.4 ± 5.2	27.8 ± 6.4	25.8 ± 1.5
VIн	88.4 ± 2.0	71.9 ± 5.7	51.2 ± 6.8	17.9 ± 2.9	21.7 ± 4.8	34.9 ± 1.6	32.6 ± 4.4	23.4 ± 3.1	30.8 ± 5.9
VIIa	21.8 ± 4.4	35.0 ± 7.8	13.8 ± 1.1	19.8 ± 1.6	19.7 ± 1.8	15.0 ± 2.0	-	16.8 ± 3.6	19.3 ± 3.8
VIIб	23.8 ± 4.5	18.9 ± 4.1	20.3 ± 5.1	14.5 ± 1.7	24.9 ± 3.7	34.7 ± 4.9	27.5 ± 6.2	14.8 ± 2.6	24.4 ± 1.9

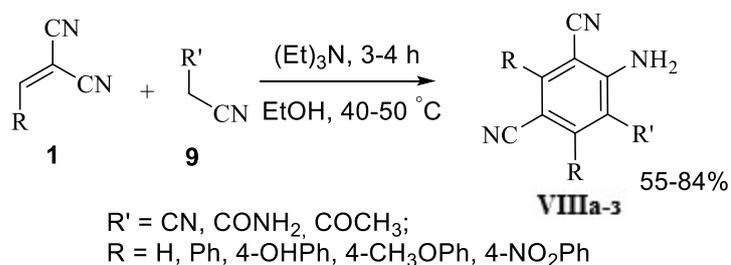
На активность циклобутан-1,1,2,2-тетракарбонитрилов влияет характер гидразонной части, а также число и характер заместителей в положениях 3 и 4. Более высокие значения цитостатического действия имеют циклобутаны **VI** с остатком фенилгидразина (**д,е**) и тиосемикарбазида (**н**). При этом важным условием является наличие C^4N -группы, так как ее полное замещение приводит к резкому падению активности (**ж**). Следует отметить, что замещение C^3N -группы способствует уменьшению активности в отношении клеток лейкоза, рака легких, толстого кишечника и головного мозга.

Таким образом, при разработке препаратов цитотоксического действия важным условием является неполное замещение циклобутанового кольца.

3.7. Синтез 2-аминобензополикарбонитрилов

Известно, что аминокбензополикарбонитрилы являются предшественниками ингибиторов или модуляторов активности протеинкиназы СК-2, которые используют для лечения опухолевых заболеваний, инфекций, дегенеративных процессов (болезней Альцгеймера и Паркинсона). Кроме того, они представляют интерес для разработки биологически активных веществ, оказывающих противовоспалительное, антимикробное действие.

В ходе исследования оптимизирован метод синтеза данных соединений. При непрерывном перемешивании илденых производных малонитрила **1** с цианосодержащими метиленактивными синтонами **9** (МН, метилцианоацетатом и цианацетамидом) в среде этанола при нагревании (40-50 °С) и в присутствии основания (триэтиламина) в течение 3-4 ч были получены соответствующие 2-аминобензо-3,5-ди- и 2-аминобензо-1,3,5-трикарбонитрилы (**VIIa-з**).



Строение полученных соединений подтверждено данными ИК-, ЯМР-¹H-, ЯМР-¹³C- и масс-спектров.

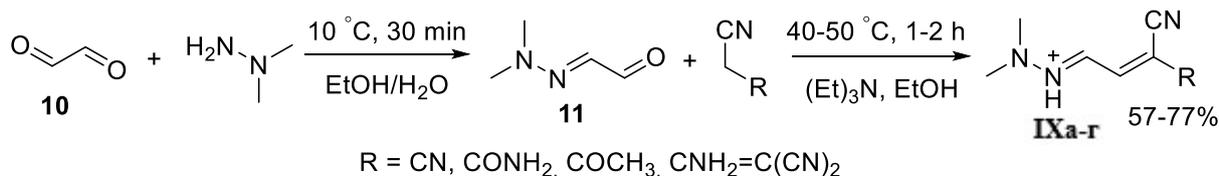
3.8. Синтез карбонитрилсодержащих полиметинов

Известно, что гидразоны как класс обладают разнообразными биологическими и фармакологическими свойствами, в том числе противомикробными, противотуберкулезными, противовирусными, противоопухолевыми, антиагрегантными, противомаларийными и др. Сочетание остатков замещенных гидразинов с другими функциональными группами приводит к образованию соединений с уникальными физико-химическими свойствами. Большие возможности для построения разнообразных циклических систем с биологической активностью дает комбинирование свойств гидразинов и карбонитрильных групп в составе карбонитрилсодержащих полииметиновых соединений – цианиновых красителей.

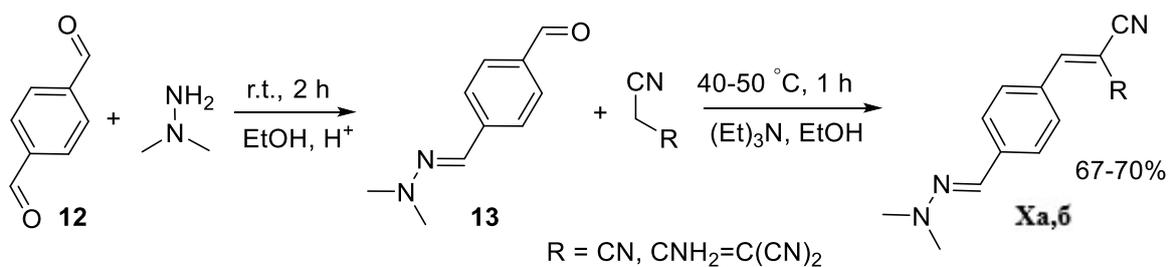
Мероцианиновые красители, будучи фотосенсибилизаторами, с успехом применяются в составе фотодинамической терапии раковых заболеваний. Также они способны выборочно инактивировать неопластические клетки (лейкоз, лимфома, клетки нейробластомы) в аутологичных трансплантатах костного мозга, а также патогенные вирусы в костном мозге и крови. Мероцианины локализуются в основном в плазматической мембране опухолевых клеток, и большая часть их фототоксичности связана с ее повреждением

В синтезе данных универсальных синтетических платформ применяют полифункциональные соединения, содержащие активированную метильную или легкоуходящую группу (анилинметиленовая, ацетанилидметиленовая, диметиламинную, дицианоэтиленовую) и карбонильные, карбоксильные, аминогруппы и т.д.

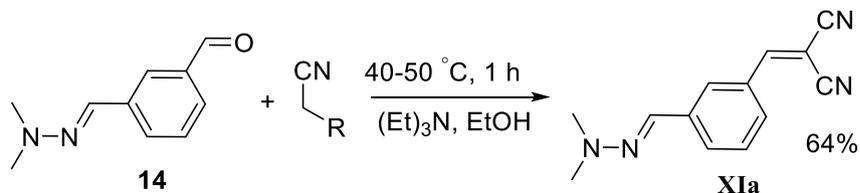
Для разработки метода получения таких синтонов была исследована реакционная способность диальдегида щавелевой кислоты – глиоксаля – с цианосодержащими метиленактивными соединениями (МН, метилцианоацетат, цианацетамид, 2-аминопроп-1-ен-1,1,3-трикарбонитрил). Глиоксаль **10** предварительно обрабатывался несимметричным N,N-гидразином для получения соответствующего гидразона **11**, при постоянном перемешивании которого с цианосодержащими метиленактивными соединениями в среде этанола образуются 1-(3,3-дицианоэтилиден)-2,2-диметилгидразин-1-иумы (**IXa-г**) (57-77%).



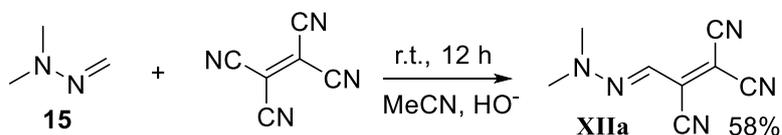
Аналогично получены 3-(4-((2,2-диметилгидразоно)метил)фенил)-акрилонитрилы **Xa,б** (67-70%) из N,N-диметилгидразона **13** терефталевого альдегида **12**.



В ходе реакции N,N-диметилгидразона изофталевого альдегида **14** с МН получен 2-(3-((2,2-диметилгидразоно)метил)бензилиден)малононитрил **XIa**



Реакцией N,N-диметилгидразона формальдегида **15** с ТЦЭ – 3-(2,2-диметилгидразоно)проп-1-ен-1,1,2-трикарбонитрил **XIIa** (58%).

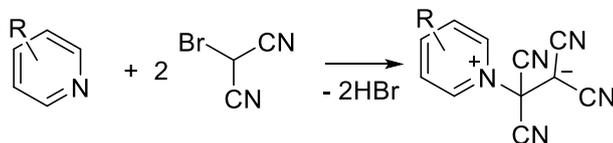


Строение полученных соединений подтверждено данными ИК-, ЯМР-¹H-, ¹³C- и масс-спектров. Молекулярная структура 3-(2,2-диметилгидразоно)проп-1-ен-1,1,2-трикарбонитрила (**XIIa**) подтверждена методом PCA (CCDC 1986196).

3.9. Синтез аддуктов этентетракарбонитрила с третичными аминами

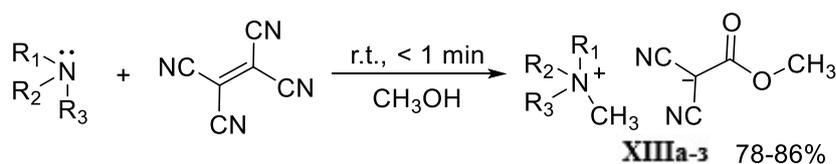
Большой интерес для разработки лекарственных препаратов имеют поликарбонитрильные соединения, содержащие кватернизированный атом азота. Данные соединения вследствие существования в ионной форме обладают улучшенными свойствами, подвижностью в растворах электролитов, гидрофильностью, меньшей токсичностью, антисептическими и дезинфицирующими свойствами и другими видами активности.

Примером подобных соединений являются аддукты ТЦЭ с третичными аминами. Известный метод получения таких аддуктов – косвенный, через последовательную конденсацию двух молекул броммалононитрила.

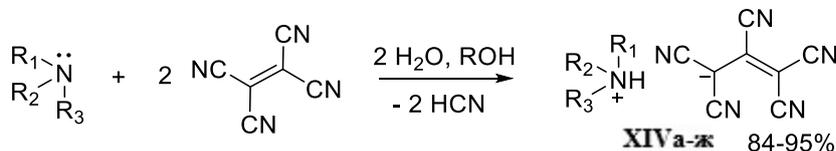


Подобные аддукты могут быть использованы для синтеза разнообразных циклических карбонитрилсодержащих соединений.

Для разработки препаративного метода получения 1,1,2,2-тетрациано-2-(R,R'-аммоний)этан-1-идов была изучена реакция ТЦЭ с третичными аминами в различных растворителях. В ходе исследований обнаружено, что при проведении реакции в метаноле образуются соли N-метилированных аминов и метилдицианоуксусной кислоты – метилдицианоацетаты (**XIIIa-3**).



Проведение реакции в водно-спиртовых растворах приводит к получению солей другого типа – пентацианопропенидов (**XIVa-ж**):

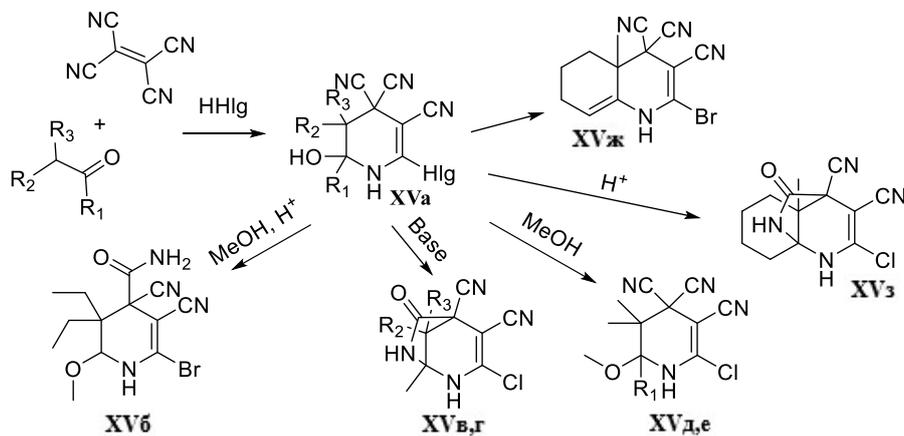


Строение полученных соединений установлено спектральными методами и РСА. Данные кристаллографии 1-метил-1,3,5,7-тетраазадамантан-1-иум 1,1-дициано-2-метокси-2-оксоэтан-1-ида **XIIIб**, 4-ацетил-1-метилпиридин-1-иум 1,1-дициано-2-метокси-2-оксоэтан-1-ида **XIIIе**, 4-карбамоил-1-метилпиридин-1-иум 1,1-дициано-2-метокси-2-оксоэтан-1-ида **XIIIж**, 1,3,5,7-тетраазадамантан-1-иум 1,1,2,3,3-пентацианопрор-2-ен-1-ида **XIVб**, 4-карбамоил-5-(3,3-диметилтриаз-1-ен-1-ил)-1*H*-имидазол-3-иум 1,1,2,3,3-пентацианопрор-2-ен-1-ида **XIVд** и 2-(4-амино-5-хлор-2-метоксибензамидо)-*N,N*-диэтилэтан-1-аминиум 1,1,2,3,3-пентацианопрор-2-ен-1-ида **XIVе** находятся в базе Кембриджского кристаллографического центра под номерами 1856517, 1856519, 1856516, 1856518, 1968147 и 1968148 соответственно.

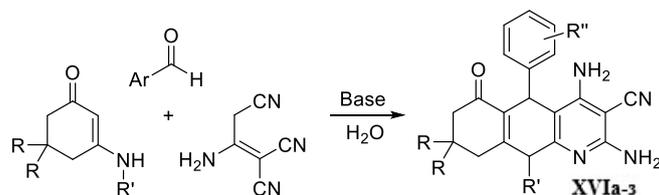
3.10. Биологическая активность нитрилов различного строения

Для более полной оценки потенциала поликарбонитрилов при направленной разработке биологически активных субстанций были проведены испытания активности нитрилсодержащих соединений, синтезированных ранее коллективом Чувашского государственного университета им. И.Н. Ульянова.

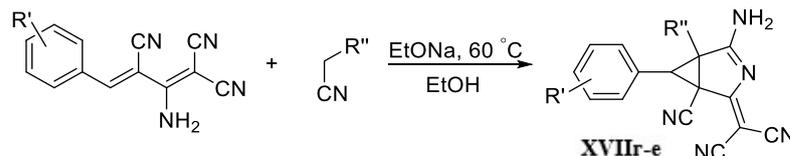
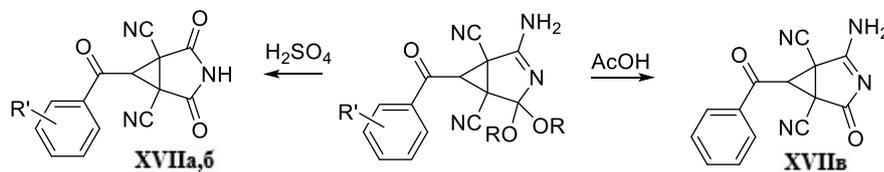
Для изучения антипролиферативной активности были отобраны наиболее перспективные ряды соединений, синтезированных ранее: 5,6-дигидропиридин-3,3,4(1*H*)-трикарбонитрилов (**XVa-e**), 4а,5,6,7-тетрагидрохиолин-3,4,4(1*H*)-трикарбонитрилов (**XVж-з**), *N*-замещенных 2,4-диамино-5-арил-5,6,7,8,9,10-гексагидробензо[*b*][1,8]нафтиридин-3-карбонитрилов (**XVIa-з**), 6-замещенных поликарбонитрильных производных 3-азабицикло[3.1.0]гексана (**XVIIa-e**), а также 4,7-дизамещенных 3-цианокумаринов (**XVIIIa-в**) и 2-аминохромен[2,3-*b*]пиридин-3-карбонитрилов (**XIXa-ж**), 2-ароил- и 2-гетероил-1,1,3,3-тетрацианопрор-2-ен-1-идов **XXa-к**. Наиболее значимые результаты испытаний представлены в таблицах 11-12.



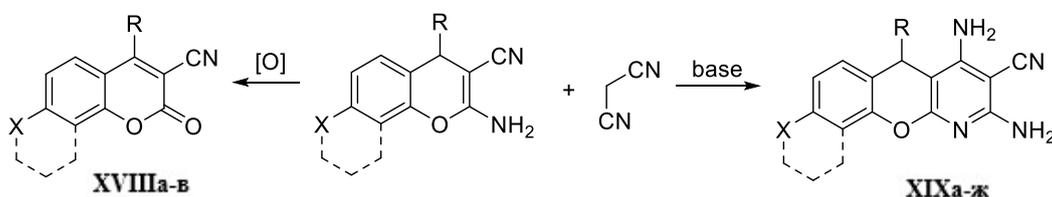
$R_1 = \text{H}$ (а, д), CH_3 (е); $R_2, R_3 = \text{H}$ (г), CH_3 (а, в)



R = H (a-г), CH₃ (д-з); R' = 3-сyano-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[*b*]thiophen-2-yl (a-e), NHC₆H₅ (ж), N(CH₃)₂ (з); R'' = 2-Cl (a,ж), 3,4,5-(CH₃O)₃ (б,е), 3,4-(CH₃O)₂ (в), 3-NO₂ (г), 3-Br (д), H (з).

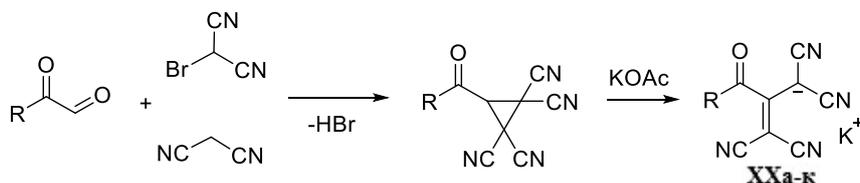


R' = H (a), 3,4-(CH₃O)₂ (б), 3,4,5-(CH₃O)₃ (г-е); R'' = CN (г), COOC₂H₅ (д), CONH₂ (е)



XVIII: R = 4-CH₃C₆H₄ (a), 4-CH₃OC₆H₄ (б), 2-ClC₆H₄ (в); X = OH (a,б), (CH₂)₄ (в);

XIX: R = *i*-C₃H₇ (a), *n*-C₃H₇ (б), *n*-C₅H₁₁ (в), 3,4,5-(CH₃O)₃C₆H₂ (г-ж); X = OH (a-г), (CH₂)₄ (д), CH₃O (е), NH₂ (ж).

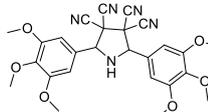


R = 4-CH₃C₆H₄ (a), 2-((CH₃)₂CHOOC)C₆H₄ (б), 3,4-(OCH₃)₂C₆H₃ (в), 4-NO₂C₆H₄ (г), 4-CH₃OC₆H₄ (д), 2-thienyl (е), 3-ClC₆H₄ (ж), 2-furyl (з), 4-BrC₆H₄ (и), Ph (к)

Таблица 11 - Результаты исследования антипролиферативной активности соединений XIV-XIX в концентрации 10⁻⁵ моль/л (по программе One-Dose Screen)

Соединение	Ингибирование роста клеточных линий злокачественных новообразований, %								
	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	костного мозга (лейкоз) (6 линий)	костного мозга (лейкоз) (6 линий)
Дакарбазин	36.2 ± 2.0	20.8 ± 1.6	3.4 ± 1.4	6.9 ± 1.2	12.6 ± 1.7	14.5 ± 1.4	26.3 ± 1.8	5.7 ± 1.2	15.0 ± 3.3
Бусульфан	-	-	-	-	18.8 ± 2.0	-	-	-	-
Цисплатин	-	32.1 ± 2.2	-	13.9 ± 1.3	14.2 ± 1.1	26.9 ± 1.9	18.1 ± 1.7	19.9 ± 2.1	10.9 ± 1.0
Доксорубин	110.2 ± 9.8	103.4 ± 19.0	110.4 ± 25.1	122.6 ± 30.2	143.2 ± 31.7	104.0 ± 29.7	103.6 ± 18.6	92.8 ± 10.8	126.3 ± 40.0
XIVд	36.7 ± 7.5	11.6 ± 2.7	4.4 ± 2.9	6.3 ± 2.2	22.0 ± 6.2	11.9 ± 2.5	11.9 ± 4.5	23.3 ± 7.6	3.9 ± 2.3
XVг	23.4 ± 4.7	-3.4 ± 1.4	-9.9 ± 1.5	-4.2 ± 1.0	-9.0 ± 0.9	-8.0 ± 0.8	-3.1 ± 1.1	-9.0 ± 2.9	-3.3 ± 0.6
XVж	35.7 ± 2.6	5.2 ± 1.0	-7.8 ± 1.9	0.9 ± 0.8	3.2 ± 0.8	-2.0 ± 1.1	-0.7 ± 1.0	-0.9 ± 1.6	9.2 ± 0.9
XVIб	3.3 ± 1.0	23.0 ± 1.3	17.0 ± 1.5	23.7 ± 2.2	10.6 ± 4.4	21.5 ± 1.9	16.1 ± 1.7	19.4 ± 5.5	22.0 ± 2.0
XVIе	61.0 ± 16.0	29.2 ± 2.1	42.0 ± 10.6	36.5 ± 1.5	36.8 ± 11.4	28.0 ± 1.7	39.0 ± 13.7	36.2 ± 4.6	40.6 ± 11.3
XVIз	21.3 ± 1.1	13.9 ± 3.0	5.7 ± 1.6	9.3 ± 2.4	1.5 ± 1.1	10.8 ± 2.8	11.7 ± 1.1	16.6 ± 2.8	13.9 ± 2.8
XVIIа	23.9 ± 1.2	9.4 ± 1.5	5.5 ± 1.4	-2.7 ± 1.9	13.1 ± 2.5	10.2 ± 3.6	12.7 ± 3.0	15.4 ± 11.1	3.2 ± 1.1
XVIIв	41.1 ± 1.1	27.8 ± 1.8	22.9 ± 1.3	14.1 ± 1.6	22.9 ± 1.7	15.8 ± 1.4	10.9 ± 1.0	25.7 ± 10.0	36.0 ± 2.3
XIXв	37.9 ± 1.5	20.5 ± 1.3	22.2 ± 1.3	15.2 ± 1.1	17.8 ± 1.7	15.8 ± 1.4	24.3 ± 1.7	14.4 ± 8.8	20.9 ± 1.3

Таблица 12 - Концентрации полумаксимального ингибирования роста клеток IC₅₀ соединений XX, мкМ

Шифр	Клеточные линии									
	MCF-7	HSF	M-14	PC-3	NCI-H322M	SNB-19	A-498	HCT-116	MDA-MB 231	OVCAR-4
Доксорубин	0.13 ± 0.05	0.8 ± 0.01	0.14 ± 0.09	0.1 ± 0.06	0.15 ± 0.07	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.00	0.08 ± 0.03	0.2 ± 0.10	0.15 ± 0.07
	29 ± 0.9	186.0 ± 44.0	48.0 ± 2.0	50.0 ± 3.0	74.0 ± 4.0	92.0 ± 19.0	-	30.0 ± 3.0	-	62.0 ± 2.0
XXa	35.0 ± 1.8	>250 ± 3.5	>250 ± 3.5	19.0 ± 0.4	192.0 ± 1.5	22.0 ± 0.3	28.0 ± 0.3	37.0 ± 0.4	12.0 ± 0.3	>250 ± 3.0
XXb	25.0 ± 0.7	>250 ± 3.0	168.0 ± 1.3	22.0 ± 0.5	34.0 ± 0.4	18.0 ± 0.4	23.0 ± 0.3	56.0 ± 0.5	15.0 ± 0.3	>250 ± 3.1
XXг	41.0 ± 1.4	>250 ± 3.1	191.0 ± 1.8	31.0 ± 0.5	29.0 ± 0.5	39.0 ± 0.5	22.0 ± 0.3	46.0 ± 0.3	31.0 ± 0.3	211.0 ± 2.1
XXи	32.0 ± 1.3	>250 ± 3.0	178.0 ± 1.2	27.0 ± 0.5	36.0 ± 0.5	66.0 ± 0.6	101.0 ± 0.9	128.0 ± 1.0	44.0 ± 0.3	>250 ± 3.1

При сравнении активности соединений (табл. 11, 12) была определена зависимость выраженности действия от заместителей в рядах соответствующих карбонитрилов.

Активность нафтиридин-3-карбонитрилов XVI зависит в большей степени от заместителя в положении 5, чем в положении 10, а также наличия двух метильных групп в положении 8. Так, заметное действие оказывают лишь соединения с 3,4,5-триметоксифенильным радикалом, что обусловлено, по-видимому, собственной фармакофорностью данного фрагмента – аффинностью к тубулину – белку, из которого построены микротрубочки веретена деления. Тубулин является мишенью для противоопухолевых препаратов («Таксол», «Доцетаксел», «Паклитаксел») и колхицина. Карбонитрильная группа, вероятно, не участвует в проявлении действия.

Анализ цитотоксического действия 3-цианокумаринов (XVIII) и хромен[2,3-*b*]пиридин-3-карбонитрилов (XIX) показал, что природа заместителя в положениях 4 и 5 соответственно почти не влияет на активность. Важную роль играет количество конденсированных циклов. Так, трициклические соединения (XVIIIb, XIXb) обладают более выраженным цитостатическим действием и, следовательно, представляют наибольший интерес для дальнейшей модификации при разработке лекарственных препаратов.

Тетрацианопрор-2-ен-1-иды XX представляют собой класс соединений с практически неизученной биологической активностью. Исследование их действия на отдельных клеточных линиях показало, что они являются безопасными в отношении условно-нормальных клеток – фибробластов – и относятся к классу малотоксичных. В то же время их средняя антипролиферативная активность колеблется в пределах концентраций 100-10 мкМ, что позволяет отнести их к цитотоксическим соединениям. Для оценки возможности их применения в качестве противоопухолевых препаратов необходимо более глубокое изучение влияния заместителей. Например, при сравнении активности дакарбазина и его пентацианопренидной соли XIVд видно, что собственное действие аниона практически отсутствует, т.е. введение цианогруппы в положение 2 приводит к потере активности 1,1,3,3-тетрацианопренида.

4. Молекулярное моделирование антипролиферативной и анальгетической активности нитрилсодержащих соединений

4.1. Молекулярный докинг антипролиферативной активности

В ходе прогноза биологической активности выбранных классов нитрилов было отмечено, что все они обладают потенциальным антинеопластическим, цитотоксическим, противоопухолевым действием. Проведенные исследования подтвердили, что изучаемые

классы соединений тормозят пролиферацию клеточных линий различных злокачественных новообразований.

В связи с отсутствием направленного систематического изучения антипролиферативной активности нитрилсодержащих соединений для определения конкретных биомишеней недостаточно данных.

Для решения этой проблемы была проанализирована существующая библиотека химиотерапевтических препаратов. Установлено, что в настоящее время все применяемые лекарственные препараты можно разделить на шесть основных групп:

- алкилирующие;
- антиметаболиты;
- ингибиторы топоизомераз;
- блокаторы тубулина;
- ингибиторы протеинкиназ;
- цитотоксические препараты.

На основании проведенного анализа были выбраны следующие биомишени для докинга антипролиферативной активности нитрилсодержащих соединений: топоизомераза 1 и 2 (TP1, TP2), тирозинкиназа (TyrK), рецепторы эпидермального и сосудистого эндотелиального факторов роста (EGFR, VEGFR₂), дигидрофолатредуктаза (DFolRed), рибонуклеотидредуктаза (RNRed), тубулин (Tub α).

Для молекулярного докинга были выбраны соединения, для которых имеется экспериментально установленное пространственное строение и данные об активности: **Пб, Шм, Шо, Шу, Vг, VIa, VIд, VIIa.**

В качестве референтного лиганда для топоизомеразы типа 1 был выбран топотекан (TTC). В результате были получены оценочные функции: энергия связывания, эффективность лиганда и константа ингибирования (табл. 13).

Таблица 13 - Рассчитанные значения оценочных функций докинга по TP1

Соединение	Энергия связывания, ккал/моль	Эффективность лиганда	Константа ингибирования, нМ
Топотекан	-9.3	0.3	155.5
Пб	-8.5	0.35	599.0
Шм	-9.4	0.35	131.4
Шо	-9.8	0.35	67.0
Шу	-10.3	0.38	28.8
Vг	-9.7	0.37	79.2
VIa	-7.5	0.42	3232.3
VIд	-8.5	0.39	599.0
VIIa	-7.6	0.38	2730.9

Анализ результатов моделирования показывает, что нитрилсодержащие соединения могут обладать активностью выше, чем у препарата сравнения, так как константа ингибирования ниже. Карбонитрильные группы участвуют в связывании с различными аминокислотными остатками сайта связывания: триптофаном (A416), глутаминовой кислотой (A356), аргинином (A364), глицином (A571), лизином (A374).

В качестве референтного лиганда для топоизомеразы типа 2 был выбран этопозид – синтетическое производное подофиллотоксина. В структуре белка имеется 2 участка связывания, поэтому было проведено два параллельных моделирования.

При докинге исследуемых соединений были получены соответствующие значения оценочных функций (табл. 14). Связывание нитрильных групп возможно по остаткам глутамина (A778), аргинина (B503), лизина (B456, B814), аспарагина (B525).

Таблица 14 - Рассчитанные значения оценочных функций докинга по $TP1_2$

Соединение	Энергия связывания, ккал/моль		Эффективность лиганда		Константа ингибирования, нМ	
	сайт 1	сайт 2	сайт 1	сайт 2	сайт 1	сайт 2
Этопозид	-14.6	-14.9	0.35	0.35	0.021	0.012
IIб	-8.8	-9.2	0.37	0.38	361.3	184.1
IIIм	-9.1	-9.7	0.34	0.36	217.9	79.2
IIIо	-8.8	-8.9	0.31	0.32	361.3	305.2
IIIу	-9.5	-9.9	0.35	0.37	111.0	56.6
Vг	-8.1	-8.4	0.31	0.32	1175.7	709.0
VIa	-7.2	-7.2	0.40	0.40	5359.7	5359.7
VIд	-8.5	-8.9	0.39	0.40	599.0	305.2
VIIa	-6.7	-6.6	0.34	0.33	12450.0	14735.8

Константы ингибирования нитрилсодержащих соединений существенно выше, чем у референтного препарата, следовательно, их предположительная активность гораздо ниже активность этопозид. Таким образом, рассмотренные классы карбонитрилов нецелесообразно рассматривать как ингибиторы $TP1_2$ при разработке лекарственных препаратов.

Для моделирования взаимодействия с тирозинкиназой был выбран файл комплекса тирозинкиназы с 5-гидроксиметил-2-(4метилпиперидин-1-ил)фениламидом 5-цианофуран-2-карбоновой кислоты (рег. номер в базе DrugBank DB07167).

Результаты докинга исследуемых соединений представлены в табл. 15.

Таблица 15 - Рассчитанные значения оценочных функций докинга по TyrK

Соединение	Энергия связывания, ккал/моль	Эффективность лиганда	Константа ингибирования, нМ
DB07167	-10.2	0.41	34.1
IIб	-7.7	0.32	2307.3
IIIм	-8.6	0.32	506.1
IIIо	-8.5	0.30	599.0
IIIу	-8.6	0.32	506.1
Vг	-8.2	0.32	993.3
VIa	-6.5	0.36	17442.4
VIд	-8.3	0.38	839.2
VIIa	-7.3	0.37	4528.2

Прогнозируемая активность исследуемых соединений существенно уступает активности референтного препарата, так как они имеют константу ингибирования на порядок выше. Карбонитрильная группа может связываться с остатками аргинина (A801), аспарагиновой кислоты (A670, A802).

Для моделирования взаимодействия с рецепторами EGFR был взят файл комплекса рецептора с известным ингибитором – гефитинибом.

При моделировании взаимодействий исследуемых соединений с EGFR выявлены остатки аминокислот, связывающиеся с карбонитрильной группой: метионин (A793), S-оксицистеин (A797). Рассчитанные значения энергий связывания, эффективности и константы ингибирования представлены в таблице 16.

Таблица 16 - Рассчитанные значения оценочных функций докинга по EGFR

Соединение	Энергия связывания, ккал/моль	Эффективность лиганда	Константа ингибирования, нМ
Гефитиниб	-8.5	0.27	599.0
IIб	-6.7	0.28	12450.0
IIIм	-8.2	0.30	993.3
IIIо	-8.9	0.32	305.2
IIIу	-8.2	0.30	993.3
Vг	-7.9	0.30	1647.0
VIa	-5.7	0.32	67178.9
VIд	-8.1	0.37	1175.7
VIIa	-6.2	0.31	28920.2

Как видно из таблицы, константы ингибирования исследуемых соединений выше, чем у гефитиниба, что потенциально говорит о более низкой активности. Учитывая незначительную роль нитрильной группы в связывании с рецептором, при разработке ингибиторов EGFR целесообразно ее вводить в уже известные фармакофоры как дополнительный участок связывания с активным сайтом.

В качестве референтного лиганда для VEGFR₂ был выбран ингибитор пазопаниб. Файл структуры комплекса VEGFR₂-пазопаниб получен из базы данных PDB.

При моделировании образования комплексов VEGFR₂-лиганд были определены аминокислоты, связывающиеся с нитрильными группами: аспарагин (A921), S-гидроксицистеин (A1043), и рассчитаны оценочные функции (табл. 17).

Таблица 17 - Рассчитанные значения оценочных функций докинга по VEGFR₂

Соединение	Энергия связывания, ккал/моль	Эффективность лиганда	Константа ингибирования, нМ
Пазопаниб	-8.3	0.27	839.2
IIб	-6.3	0.26	24434.0
IIIм	-7.7	0.29	2307.3
IIIо	-7.7	0.28	2307.3
IIIу	-8.1	0.30	1175.7
Vг	-7.8	0.30	1949.4
VIa	-5.6	0.31	79513.2
VIд	-7.8	0.35	1949.4
VIIa	-6.6	0.33	14735.8

Анализ полученных моделей показывает, что карбонитрильная группа практически не задействована в образовании комплексов белок – лиганд, следовательно, разработка ингибиторов VEGFR₂ на основе нитрилсодержащих соединений нецелесообразна.

Таблица 18 - Рассчитанные значения оценочных функций докинга по DfolRed

Соединение	Энергия связывания, ккал/моль	Эффективность лиганда	Константа ингибирования, нМ
GHW	-10.1	0.33	40.4
IIб	-8.5	0.35	599.0
IIIм	-9.4	0.35	131.4
IIIо	-10.8	0.39	12.4
IIIу	-10.6	0.39	17.4
Vг	-8.8	0.34	361.3
VIa	-6.8	0.38	10518.7
VIд	-9.1	0.41	217.9
VIIa	-7.6	0.38	2730.9

Результаты докинга нитрилов по DfolRed представлены в таблице 18. В качестве референтного лиганда был выбран N-(4-[2-амино-6-метил-4-оксо-3,4-дигидротиено[2,3-

d]пиримидин-5-ил)сульфанил]фенил} карбонил)-L-глутаминовая кислота (идентификатор в базе PDB – GHW).

Для соединений **Шо** и **Шу** возможна более высокая активность чем у референтного лиганда. Связывание карбонильной группы возможно по остаткам глицина (A116, A117), тирозина (A121), аланина (A9).

Из группы ингибиторов RNRed в качестве референтного лиганда был выбран 2-гидрокси-N'-[(Z)-(2-гидроксинафтален-1-ил)метилен]бензогидразид (идентификатор в базе PDB – 7LL).

Таблица 19 - Рассчитанные значения оценочных функций докинга по RNRed

Соединение	Энергия связывания, ккал/моль	Эффективность лиганда	Константа ингибирования, нМ
7LL	-7.5	0.33	3232.3
Пб	-8.3	0.35	839.2
Шм	-8.8	0.33	361.3
Шо	-8.9	0.32	305.2
Шу	-9.9	0.37	56.6
Vг	-7.6	0.29	2730.9
Vа	-6.2	0.34	28920.2
Vд	-7.3	0.33	4528.2
Vа	-7.0	0.35	7508.4

В случае соединений **Пб**, **Шм**, **Шо**, **Шу**, **Vг** константа ингибирования ниже чем у референтного лиганда (табл. 19). Наиболее выраженной активностью потенциально обладает соединение **Шу**. В образовании комплекса по нитрильным группам участвуют остатки серина (B202, B217, B606), аланина (B605), треонина (B604, B607), пролина (B603).

Для докинга по связыванию с Tubα в качестве основы для построения моделей был взят комплекс тубулина с ингибитором – паклитакселом (таксол). Согласно результатам докинга исследуемых нитрилов по тубулину, нитрильная группа в комплексе лиганд-белок связывается с остатками глутамина (B281), аргинина (B278, B284), треонина (B276), гистидина (B229).

Таблица 20 - Рассчитанные значения оценочных функций докинга по Tubα

Соединение	Энергия связывания, ккал/моль	Эффективность лиганда	Константа ингибирования, нМ
Паклитаксел	-8.9	0.14	305.2
Пб	-6.3	0.28	24434.0
Шм	-7.7	0.29	2307.3
Шо	-8.2	0.29	993.3
Шу	-8.0	0.30	1391.5
Vг	-7.3	0.28	4528.2
Vа	-5.4	0.30	111391.5
Vд	-6.9	0.31	8887.0
Vа	-5.7	0.29	67178.9

Анализ рассчитанных констант ингибирования (табл. 20) показывает прогнозируемую активность исследуемых нитрилов ниже чему паклитаксела, в основном на 1 порядок. Разработка лекарственных препаратов-блокаторов тубулина на основе нитрилсодержащих соединений возможна, с учетом активного участия нитрильной группы в образовании комплекса лиганд-белок.

Таким образом, нитрилсодержащие соединения представляют интерес для разработки ингибиторов топоизомеразы 1, тирозинкиназы, дигидрофолатредуктазы, рибонуклеотидредуктазы и блокаторов тубулина.

4.2. Молекулярный докинг анальгетической активности

Фармакологическое действие НПВС связано с угнетением синтеза ПГ путем ингибирования фермента простагландинсинтетазы (циклооксигеназы). Различают два изофермента циклооксигеназы – ЦОГ-1 и ЦОГ-2. Последний участвует в синтезе ПГ при воспалении и образуется под действием тканевых факторов (цитокины и др.), запускающих воспалительную реакцию, т.е. в здоровых тканях ЦОГ-2 отсутствует. ЦОГ-1 отвечает за выработку ПГ, участвующих в защите слизистой оболочки ЖКТ, регуляции функций тромбоцитов и почечного кровотока. Основным терапевтическим эффектом обуславливается ингибированием ЦОГ-2, а основные побочные эффекты циклооксигеназы 1. В то же время селективные ингибиторы ЦОГ-1 могут применяться для лечения нейровоспалений.

По результатам анализа прогноза биологической активности, наличие анальгетической и противовоспалительной активности характерно практически для всех рассмотренных классов нитрилсодержащих соединений. С целью оценки роли карбонитрильной группы в формировании комплекса лиганд – белок для молекулярного докинга были выбраны соединения классов 10-иминотетрагидро-8а,4-(эпоксиметано)хромен-3,3,4(2*H*,4*aH*)-трикарбонитрилов **III** (м, о, у) и 1,2,5,6,7,8-гексагидрохинолин-3,3,4,4-тетракарбонитрилов **V** (г).

В качестве референтного лиганда ЦОГ-1 и ЦОГ-2 был выбран неселективный ингибитор мелоксикам. Файлы комплексов мелоксикам – ЦОГ-1 и мелоксикам – ЦОГ-2 получены из базы данных PDB. Анализ строения комплексов показал, что существует два сайта связывания в обоих изоферментах.

При докинге исследуемых соединений получены рассчитанные значения эффективности лигандов и константы ингибирования (табл. 21, 22).

Таблица 21 - Значения оценочных функций докинга по COX₁

Соединение	Энергия связывания, ккал/моль		Эффективность лиганда		Константа ингибирования, нМ	
	сайт 1	сайт 2	сайт 1	сайт 2	сайт 1	сайт 2
Мелоксикам	-9.5	-9.4	0.41	0.41	111.0	131.4
IIIм	-5.4	-7.5	0.20	0.28	111391.5	3232.3
IIIо	-8.3	-9.7	0.29	0.35	839.2	79.2
IIIу	-6.4	-8.4	0.24	0.31	20643.7	709.0
Vг	-7.1	-8.1	0.27	0.31	6343.7	1175.7

Таблица 22 - Значения оценочных функций докинга по COX₂

Соединение	Энергия связывания, ккал/моль		Эффективность лиганда		Константа ингибирования, нМ	
	сайт 1	сайт 2	сайт 1	сайт 2	сайт 1	сайт 2
Мелоксикам	-10.5	-10.6	0.46	0.46	20.6	17.4
IIIм	-9.8	-8.5	0.36	0.31	67.0	599.0
IIIо	-6.4	-6.4	0.23	0.23	20643.7	20643.7
IIIу	-7.7	-7.4	0.29	0.27	2307.3	3825.8
Vг	-7.3	-7.4	0.28	0.28	4828.2	3825.8

Анализ диаграмм связывания показал, что карбонитрильная группа может связываться с остатками аргинина (A120, B97, B120), глутамина (B350), серина (A119, A353, B353), гистидина (A351, B351, B581), лизина (B97, B358), фенилаланина (B580). Константы ингибирования соединений в основном выше констант мелоксикама, но для соединений **IIIм** и **IIIо** разница по одному сайту (ЦОГ-2 и ЦОГ-1 соответственно) составляет меньше одного порядка, что говорит о сопоставимой возможной активности. При этом в отличие от мелоксикама для данных соединений характерна выраженная селективность. Так, **IIIо**

значительно больше угнетает ЦОГ-1 чем ЦОГ-2, а **III**, напротив, более избирательно ингибирует ЦОГ-2. Следовательно, 10-иминотетрагидро-8a,4-(эпоксиметано)хромен-3,3,4(2*H*,4a*H*)-трикарбонитрилы **III** являются перспективными для разработки селективных ингибиторов ЦОГ-1 и ЦОГ-2.

5. Разработка количественных моделей дизайна биологически активных субстанций на основе нитрилсодержащих соединений

Построение модели биологической активности – важный этап в направленной разработке лекарственного препарата. Данная модель не только учитывает характер и степень взаимодействия будущих биологически активных соединений с биомишенью, но и служит для прогнозирования конечного фармакологического эффекта.

В построении таких моделей широко применяется регрессионный анализ. Регрессионные уравнения зависимости активности от рассчитанных физико-химических дескрипторов и полученных в результате докинга оценочных функций позволяют проводить количественные исследования «структура – активность».

Ключевыми физико-химическими дескрипторами, применяемыми в построении моделей активности, являются коэффициент распределения ($\log P$) и константы диссоциации (pK_a , pK_b), а оценочными функциями – эффективность лиганда (LE) и константа ингибирования (pK_i).

На практике же, в основном, применяются более сложные параметры. В качестве переменных для получения регрессионных уравнений для антипролиферативной активности нитрилсодержащих соединений были выбраны липофильность, зависящая от эффективности лиганда, ($LELP = \log P/LE$) и индекс эффективности поверхностного связывания ($SEI = pK_i/(PSA/100)$).

Полученные значения физико-химических дескрипторов были использованы при расчете $LELP$ и SEI показателей для выявленных в ходе докинга наиболее вероятных мишеней ($TP11$, $TyrK$, $DFolRed$, $RNred$, $Tub\alpha$).

Корреляционный и регрессионный анализы проведены с использованием пакета «Анализ данных» в MS Excel программного комплекса MS Office 2010. Для случаев с низкой активностью было установлено пороговое значение 5%.

При выведении регрессии была использована совокупность параметров $LELP$ и SEI по различным биомишеням ($TP11$, $TyrK$, $DFolRed$, $RNRed$, $Tub\alpha$) для исследуемых соединений.

При построении модели антипролиферативной активности в отношении клеток лейкоза был использован метод множественной линейной регрессии. В результате было получены уравнения:

$$y_{LELP} = 9,77 + 22,26x_1 - 2,51x_2 + 38,71x_3 + 37,65x_4 - 76,64x_5, \quad (1)$$

$$y_{SEI} = -28,17 + 26,44x_1 + 9,38x_2 + 5,48x_3 - 26,78x_4 - 8,77x_5, \quad (2)$$

где y_{LELP} и y_{SEI} – средний процент ингибирования роста клеток, рассчитанный по показателю $LELP$ и SEI соответственно; x_1 , x_2 , x_3 , x_4 и x_5 – значения параметров $LELP$ и SEI для мишеней $TP11$, $TyrK$, $DFolRed$, $RNRed$ и $Tub\alpha$ соответственно. Коэффициенты детерминации предсказаний составили 0,938 и 0,62.

Для оценки качества модели, был построен график фактических и рассчитанных значений процента ингибирования роста клеток (рис. 10).

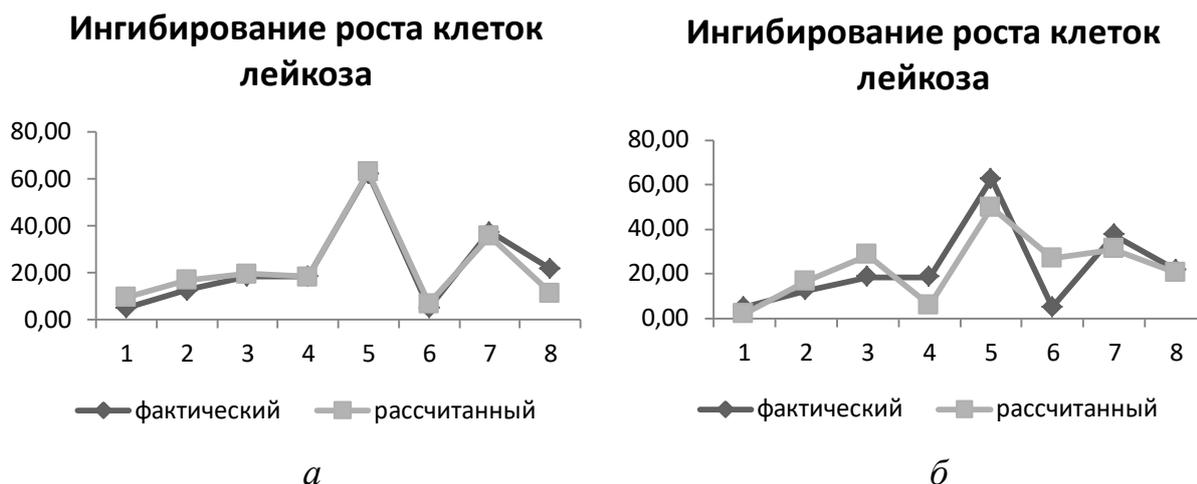


Рисунок 10. График регрессионных моделей активности исследуемых соединений: а – построенный по уравнению (1); б – построенный по уравнению (2)

Аналогичным образом были выведены уравнения множественной линейной регрессии для ингибирования роста клеток НМРЛ (уравнения 3, 4). Коэффициенты детерминации предсказаний составили 0,24 и 0,39.

$$y_{LELP} = 18,91 + 10,37x_1 - 17,274x_2 + 24,39x_3 - 4,77x_4 - 7,56x_5 \quad (3)$$

$$y_{SEI} = -47,96 + 8,73x_1 + 20,91x_2 + 11,61x_3 + 14,78x_4 - 50,71x_5 \quad (4)$$

С целью поиска более оптимальной модели были получены уравнения ($R^2 = 0,25$ и $0,27$) множественной степенной регрессии

$$y_{LELP} = 5,97(x_1^2)^{0,456}(x_2^2)^{-1,772}(x_3^2)^{-1,63}(x_4^2)^{0,966}(x_5^2)^{2,056} \quad (5)$$

$$y_{SEI} = 0,059(x_1^2)^{0,694}(x_2^2)^{1,803}(x_3^2)^{1,198}(x_4^2)^{0,549}(x_5^2)^{-2,811} \quad (6)$$

Качество полученных моделей активности в отношении клеточных линий НМРЛ удовлетворительное. Для создания оптимальных моделей необходимо увеличить выборку данных по активности.

Более точные модели получены в отношении ингибирования клеток меланомы (рис. 11) по уравнениям (7) и (8) при коэффициентах детерминации 0,88 и 0,83 соответственно.

$$y_{LELP} = 16,21 + 31,03x_1 - 31,23x_2 + 6,62x_3 + 7,94x_4 - 6,63x_5 \quad (7)$$

$$y_{SEI} = 53,18 - 10,23x_1 + 23,61x_2 + 11,75x_3 - 56,6x_4 + 27,95x_5 \quad (8)$$

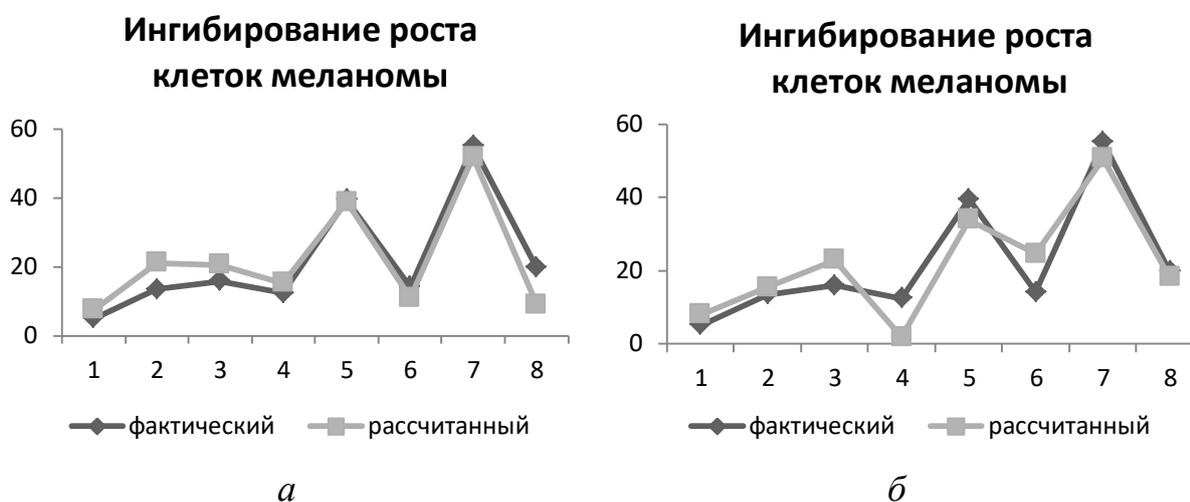


Рисунок 11. График регрессионных моделей активности исследуемых соединений: а – построенный по уравнению (7); б – построенный по уравнению (8)

Наиболее точные регрессионные модели получены для антипролиферативной активности в отношении клеток рака почек (рис. 12), составленные по уравнениям (9) ($R^2 = 0,9997$) и (10) ($R^2 = 0,95$).

$$y_{LELP} = 0,57 + 88,12x_1 + 9,1x_2 - 39,73x_3 + 49,78x_4 - 88,6x_5 \quad (9)$$

$$y_{SEI} = 57,31 - 12,9x_1 - 2,82x_2 + 41,16x_3 - 52,51x_4 + 16,67x_5 \quad (10)$$

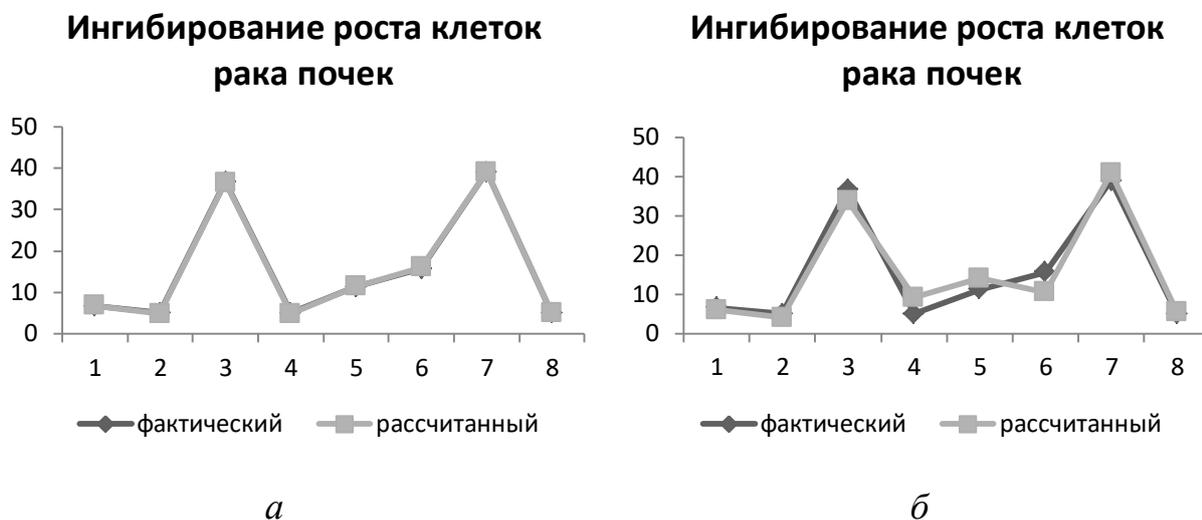


Рисунок 12. График регрессионных моделей активности исследуемых соединений: а – построенный по уравнению (9); б – построенный по уравнению (10)

Множественные линейные регрессионные модели получены также для антипролиферативной активности в отношении клеток злокачественных новообразований молочной железы (рис. 13). Полученные уравнения (11) и (12) позволяют рассчитать средний процент ингибирования при коэффициентах детерминации 0,94 и 0,69 соответственно.

$$y_{LELP} = 12,94 - 2,35x_1 + 0,39x_2 + 37,84x_3 + 9,55x_4 - 35,05x_5 \quad (11)$$

$$y_{SEI} = -45,36 + 18,06x_1 + 11,01x_2 - 8,08x_3 - 1,85x_4 - 8,09x_5 \quad (12)$$

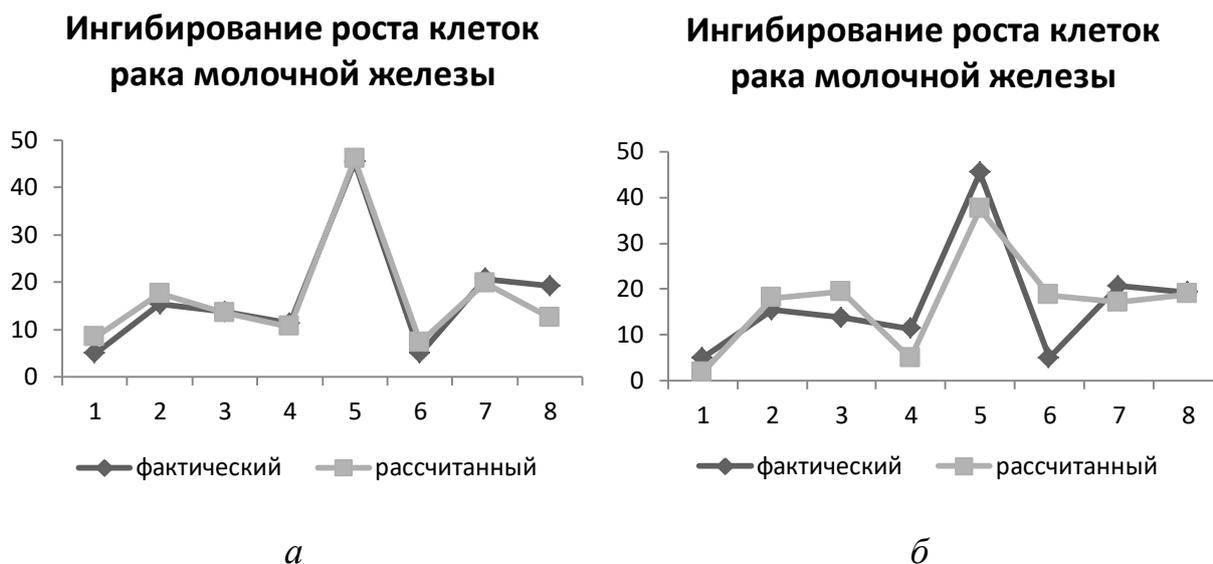


Рисунок 13. График регрессионных моделей активности исследуемых соединений: а – построенный по уравнению (11); б – построенный по уравнению (12)

Полученные модели позволяют проводить расчет антипролиферативной активности через комплексные показатели LELP и SEI для клеточных линий лейкоза, меланомы, рака легких, почек, молочной железы и могут применяться при проведении виртуального скрининга.

6. Разработка метода иммобилизации поликарбонитрильных соединений на наноалмазах

При разработке новых лекарственных препаратов важную роль играет выбор метода доставки лекарственных веществ к биомишеням. В последнее время все больше внимания уделяется углеродным наноносителям. Инновационными средствами доставки являются детонационные наноалмазы (ДНА). Многочисленные исследования показывают, что наноалмазы практически не обладают канцерогенными или мутагенными свойствами, нетоксичны и биосовместимы. Благодаря высокоразвитой поверхности ($S_{уд} = 250\text{--}350 \text{ м}^2/\text{г}$) и наличию функциональных групп ДНА обладают большой сорбционной ёмкостью, что делает их наиболее перспективными системами направленного (адресного) транспорта лекарственных средств. Распространенный метод получения ДНА – утилизация боеприпасов. При их детонации в охлаждающей среде происходит разрушение органических соединений до наночастиц с различным набором функциональных групп. Далее их подвергают очистке от неалмазной фракции углерода и неуглеродных примесей и выделяют ДНА в виде порошка или водной суспензии

Для исследования возможности применения ДНА как систем доставки поликарбонитрильных соединений была проведена серия опытов по их иммобилизации на коммерчески доступных немодифицированных ДНА (ФГУП СКТБ «Технолог», Санкт-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет). Для этого к суспензии ДНА в этаноле либо ацетоне добавляли раствор исследуемого соединения и встряхивали в течение 24-36 ч. Образующийся золь далее центрифугировали при 13 тыс. об/мин для разделения осадка и надосадочной жидкости. Полученный осадок сушили под вакуумом до постоянной массы. О степени адсорбции судили по разнице навески ДНА до и после иммобилизации. Адсорбция карбонитрилов составила в среднем 9,7%, а соединений сравнения – кофеина, ацетилсалициловой и аскорбиновой кислот, – 2,5%, 4,7% и 3,9% соответственно.

Склонность поверхности ДНА удерживать карбонитрилы по сравнению с другими органическими соединениями вероятнее всего связана с сильными адгезионными свойствами карбонитрильной группы и ее способностью к образованию донорно-акцепторных связей. Данная способность в том числе обуславливает механизм действия известных лекарственных препаратов. Кроме того, иммобилизация на ДНА часто придает потенциальной субстанции растворимость в воде.

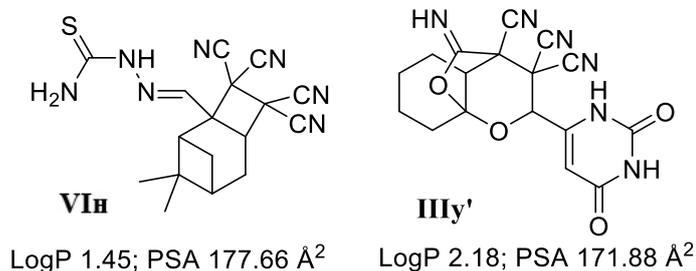
Таким образом, ДНА являются наиболее перспективными носителями поликарбонитрильных соединений, а разработанный метод позволяет получать нитрилсодержащие субстанции на наноалмазах, которые будут использоваться при создании лекарственных препаратов.

7. Направленный синтез нитрилсодержащих соединений и исследование антипролиферативной активности субстанций на наноалмазах

В ходе исследования были определены наиболее перспективные классы нитрилсодержащих соединений для получения препаратов-цитостатиков: 1,2,5,6,7,8-гексагидрохинолин-3,3,4,4-тетракарбонитрилы (V), циклобутан-1,1,2,2-тетракарбонитрилы (VI), а также 10-иминотетрагидро-8а,4-(эпоксиметано)хромен-3,3,4(2H,4aH)-трикарбонитрилы (III) при введении дополнительных фармакофоров.

Для определения структуры заместителей и отбора «соединений-лидеров» был проведен молекулярный докинг различных структур по восьми основным биомишеням

противоопухолевых препаратов, сделаны расчеты показателей LELP и SEI и рассчитаны теоретические значения среднего процента ингибирования роста клеточных линий (табл. 26). В результате были отобраны два соединения для направленного синтеза, иммобилизации на наноалмазах и изучения антипролиферативной активности.

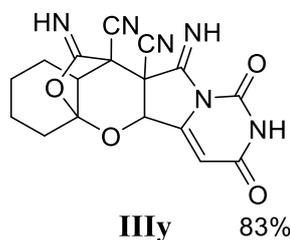


Расчет процента ингибирования роста клеток по предложенным моделям активности показал, что возможно выраженное ингибирование клеточных линий меланомы и рака почек (табл. 23).

Таблица 23 - Средний процент ингибирования клеточных линий, рассчитанный по составленным моделям активности

Соединение	Модель	Средний процент ингибирования клеточных линий, %				
		лейкоза	НМПЛ	меланомы	рака почек	рака молочной железы
VIh	LELP	23,53	12,93 19,41	21,89	9,73	19,92
	SEI	15,95	-5,84 4,87	42,53	42,83	-1,86
IIIy'	LELP	-1,91	16,65 33,22	40,42	-11,77	5,20
	SEI	25,31	18,39 1,75	40,75	36,53	9,74

Соединение **VIh** получено реакцией тиосемикарбазона миртеналя с ТЦЭ. При введении в реакцию с 1-(2-оксоциклогексил)этан-1,1,2,2-тетракарбонитрилом оротового альдегида, вместо ожидаемого продукта **IIIy'** был выделен 11,13-диимино-1,3-диоксо-1,2,3,4b,7,8,9,9a-октагидро-5a,10-(эпоксиметано)хромено-[2',3':3,4]пирроло[1,2-c]пиримидин-10,10a(6H,11H)-дикарбонитрил **IIIy**.



Затем соединения **VIh** и **IIIy** были адсорбированы на наноалмазы по разработанному методу, процент адсорбции составил 14,7 и 17,3 соответственно. У полученных субстанций была исследована антипролиферативная активность (табл. 24) в НОЦ Фармацевтики при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» в отношении клеточных линий MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), PC-3 (аденокарцинома предстательной железы), M-14 (меланома кожи), HSF (условно-нормальные фибробласты кожи).

Таблица 24 - Концентрации полумаксимального ингибирования роста клеток IC₅₀ полученных субстанций, мкМ

Соединение	Клеточные линии			
	HSF	MCF-7	PC-3	M-14
Шу	27	8.7	9.3	10.6
Шу (ДНА)	> 250	34.7	19	> 250
VI _H	> 250	34.7	42.5	223
VI _H (ДНА)	> 250	149	69	> 250

При приготовлении тестовых растворов соединений на наноалмазах учитывалась масса субстанции. Фактическое содержание соединений Шу и VI_H с учетом процента иммобилизации в конечном растворе было уменьшено по сравнению с растворами чистых соединений в 5,78 и 6,8 раза соответственно. При этом активность субстанций на наноалмазах уступала активности чистых соединений незначительно. Важно отметить, что активность в отношении условно-нормальных клеток (HSF) невысокая, что говорит о снижении цитотоксичности для здоровых клеток.

Данные субстанции рекомендованы для углубленного изучения фармакокинетики.

Таким образом, разработанный подход к дизайну биологически активных субстанций на основе нитрилсодержащих соединений можно применять для получения субстанций-цитостатиков на наноалмазах с высокой степенью селективности и безопасности.

Заключение

В результате проведенного исследования разработан комплексный подход к дизайну биологически активных субстанций на платформе нитрилсодержащих соединений, который предусматривает виртуальный скрининг потенциальных кандидатов в субстанции, его основой является определение физико-химических дескрипторов и оценочных функций связывания с биомишенью, отбор «соединений-лидеров», их направленный синтез и нековалентная иммобилизация на наноалмазах.

Основные положения предложенного подхода можно сформулировать следующим образом:

1. При разработке биологически активных субстанций не должны использоваться структуры, содержащие алифатические, несопряженные карбонитрильные группы или карбонитрильные группы при ненасыщенном атоме углерода во избежание выделения синильной кислоты при метаболизме соединений.

2. При выборе потенциально активных классов соединений следует руководствоваться данными об изучении биологической активности нитрилсодержащих соединений в литературе, специализированных банках данных и программным обеспечением, позволяющим предсказывать вид активности.

3. При направленном дизайне субстанций следует иметь четкое представление о биомишенях для выбранного вида активности.

4. Оценку фармакологического потенциала соединений в отношении выбранного вида активности следует проводить по совокупности физико-химических дескрипторов (LogP, pKa, PSA и т.д.) и оценочных функций, описывающих взаимодействие с известными биомишенями (LE, pKi, IC₅₀), а также комплексным параметрам (LELP, SEI, LipE, SILE и др.).

5. На основе физико-химических дескрипторов, оценочных функций и комплексных параметров разрабатываются модели «структура – активность» для выбранных классов

соединений и биологической активности. Полученные модели исследуются на степень достоверности и устойчивости.

6. По полученным моделям проводится отбор «соединений-лидеров» для направленного синтеза. При отборе также учитываются потенциальные токсические риски исследуемых соединений, оценка которых может быть проведена с помощью программных алгоритмов, основанных на эмпирических правилах и законах.

7. Направленный синтез нитрилсодержащих соединений по известным и оригинальным методикам с последующей иммобилизацией на поверхность наноалмазов.

8. Изучение биологической активности полученных субстанций.

9. Расширение банка данных о биологической активности с целью уточнения и корректировки моделей активности.

Предложенный комплексный подход к дизайну биологически активных субстанций направлен на сокращение материальных и временных затрат на разработку и исследование новых лекарственных препаратов. Алгоритм подхода может быть использован для создания моделей различных видов биологической активности и проведения виртуального скрининга. Количественные модели структура – активность позволяют провести предварительную количественную оценку биологической активности исследуемых соединений.

Выводы

1. На основе проведенного анализа существующих баз данных выделены наиболее перспективные для разработки биологически активных субстанций классы нитрилсодержащих соединений.

2. Осуществлен синтез производных 2-амино-4*H*-пиран-3-карбонитрила, хромен-3,3,4(2*H*,4*aH*)-трикарбонитрила, циклопропан-1,1,2,2-тетракарбонитрила, хинолин-3,3,4,4-тетракарбонитрила, циклобутан-1,1,2,2-тетракарбонитрила, 3-цианокумарина, 1,1,3,3-тетрацианопроп-2-ен-1-ида по известным и оригинальным методикам.

3. Создан банк данных биологической активности нитрилсодержащих соединений, включающий результаты исследования структуры, биологической активности и анализа «структура – активность» ароматических карбонитрилов, содержащих цикл пиррола, пирана, хромена, хинолина, анилина; трех-, четырех- и шестичленных циклических нитрилов, алифатических нитрилов – мероцианинов (полиметинов), а также аддуктов ТЦЭ с третичными аминами.

4. Изучено взаимодействие нитрилсодержащих соединений методом молекулярного докинга с биомшенями – топоизомеразой 1 и 2, тирозинкиназой, рецепторами эпидермального и сосудистого эндотелиального факторов роста, дигидрофолатредуктазой, рибонуклеотидредуктазой, тубулином, циклооксигеназой 1 и 2.

5. На основе рассчитанных показателей эффективности связывания с биомшенями – LELP и SEI, – составлены регрессионные модели антипролиферативной активности для дизайна и виртуального скрининга нитрилсодержащих соединений.

6. Разработан метод нековалентной посадки нитрилсодержащих соединений на немодифицированных наноалмазах для получения биологически активных субстанций и создания новых противоопухолевых лекарственных препаратов с высокой биодоступностью.

7. В результате проведенного виртуального скрининга нитрилсодержащих соединений по среднему проценту ингибирования роста клеточных линий выбраны два «соединения-лидера» для направленного синтеза, иммобилизации на наноалмазах и изучения антипролиферативной

активности – 2-(2,6-диоксо-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-4-ил)-10-имино-тетрагидро-8а,4-(эпоксиметано)хромен-3,3,4(2*H*,4а*H*)-трикарбонитрил и 2-((3,3,4,4-тетрациано-8,8-диметилтрицикло[5.1.1.0_{2,5}]нонал-2-ил)метил)ен)гид-разин-1-карботиамида.

8. Осуществлен синтез и иммобилизация на поверхности наноалмазов «соединений-лидеров», изучена антипролиферативная активность полученных субстанций.

9. Сформулированы основные положения комплексного подхода к дизайну биологически активных субстанций на платформе нитрилсодержащих соединений.

Таким образом, в результате проведенного исследования разработан комплексный подход к дизайну новых биологически активных субстанций на основе нитрилсодержащих соединений, позволяющий с меньшими затратами проводить разработку новых отечественных лекарственных препаратов, в первую очередь цитостатиков.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Синтез и противомикробная, анальгетическая, жаропонижающая и иммуностропная активность метил-3-ацил-6-амино-4-арил-5-циано-4*H*-пиран-2-карбоксилатов [Текст] / М. А. Марьясов, В. В. Давыдова, В. П. Шевердов, О. Е. Насакин, В. Л. Гейн // Химико-фармацевтический журнал. – 2016. – Т. 50, № 8. – С. 22–25.
2. Анальгетическая активность 9-арил-12-имино-10,11-диоксатрицикло[5.3.2.0^{1,6}]додекан-7,8,8-трикарбонитрилов и 3-арил-1,1,2,2-тетрацианоциклопропанов [Текст] / М. А. Марьясов, В. П. Шевердов, О. Е. Насакин, Р. Р. Махмудов // Химико-фармацевтический журнал. – 2016. – Т. 50, № 9. – С. 10–12.
3. Антипролиферативная активность цианозамещенных пиранов и 1,2,5,6,7,8-гексагидрохиолин-3,3,4,4-тетракарбонитрилов [Текст] / М. А. Марьясов, В. П. Шевердов, В. В. Давыдова, О. Е. Насакин // Химико-фармацевтический журнал. – 2016. – Т. 50, № 12. – С. 26–27.
4. Цианосодержащие гетероциклы – цитостатики [Текст] / А. В. Еремкин, М. Н. Казанцева, М. А. Марьясов, В. П. Шевердов, О. Е. Насакин // Химия и современность : сб. тр. IV Всерос. науч. конф. с междунар. участием (Чебоксары, 22–23 апр. 2016) / Чуваш. гос. педагог. ун-т. им. И. Я. Яковлева. – Чебоксары, 2016. – С. 19–21.
5. Анальгетическая, противомикробная и жаропонижающая активность метиловых эфиров 3-ацил-5-циано-4*H*-пиран-2-карбоновых кислот [Текст] / В. В. Давыдова, М. В. Данилова, М. А. Марьясов, В. П. Шевердов, О. Е. Насакин // Современная химия: успехи и достижения: материалы II Междунар. науч. конф. (г. Чита, апрель 2016 г.). – Чита: «Молодой ученый», 2016. – С. 42–45.
6. Цитостатики на основе цианосодержащих гетероциклов [Текст] / В. В. Давыдова, М. В. Данилова, М. А. Марьясов, В. П. Шевердов, О. Е. Насакин // Современная химия: успехи и достижения: материалы II Междунар. науч. конф. (г. Чита, апрель 2016 г.). – Чита: «Молодой ученый», 2016. – С. 45–47.
7. Новые цитостатики на основе цианосодержащих пиранов и их активность [Текст] / В. В. Давыдова, М. А. Марьясов, М. В. Данилова, Е. С. Илларионова // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии: сборник материалов Всероссийской конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева. Томск, 13 мая, 2016 года [Электронный ресурс] / под ред. Е.Л. Чойнзонова, Э.В. Галажинского, Н.В. Чердынцевой. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2016. – С. 41–43.
8. Цитостатики на основе цианосодержащих гетероциклов [Текст] / М. А. Марьясов, М. И. Казанцева, А. В. Еремкин, В. П. Шевердов, О. Е. Насакин // Современные проблемы химической науки и фармации: сб. материалов V Всерос. конф. с междунар. участием – Чебоксары: Изд-во «Крона», 2016. – С. 33–34.
9. Синтез новых 2-(5-амино-2-*R*-2,3-дигидро-4*H*-имидазол-4-илиден)малонитрилов и исследование их антимикробной активности [Текст] / С. С. Чунихин, А. В. Еремкин,

- М. А. Марьясов, М. Н. Казанцева, В. П. Шевердов, О. Е. Насакин // Современные проблемы химической науки и фармации: сб. материалов V всерос. конф. с междунар. участием – Чебоксары: Изд-во «Крона», 2016. – С. 57.
10. Антипролиферативная активность цианосодержащих гетероциклов / В. П. Шевердов, О. Е. Насакин, М. А. Марьясов, В. В. Давыдова [Текст] // XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. В 5 т. Т. 4 : тез. докл. – Екатеринбург: Уральское отделение Российской академии наук, 2016. – С. 628.
11. Антипролиферативная активность 1,2,5,6,7,8-гескагидрохинолин-3,3,4,4-тетракарбонитрилов и 9-арил-12-имино-10,11-диоксатрицикло[5.3.2.0^{1,6}]додекан-7,8,8-трикарбонитрилов [Текст] / В. В. Давыдова, М. А. Марьясов, В. П. Шевердов, О. Е. Насакин, А. В. Еремкин, М. И. Казанцева // Вестник Пермской Государственной фармацевтической академии. Создание конкурентоспособных лекарственных средств - приоритетное направление инновационного развития фармацевтической науки : материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвященной 80-летию ПГФА (23 ноября 2016 года). – Пермь: ПГФА, 2016. – № 18. – С. 82–84.
12. Реакция метил 2,4-диоксабутаноатов с тетрацианоэтиленом – новый подход к синтезу биодоступных пирролов [Текст] / В. В. Давыдова, М. А. Марьясов, В. П. Шевердов, А. В. Еремкин, М. И. Казанцева, О. Е. Насакин // Вестник Пермской Государственной фармацевтической академии. Создание конкурентоспособных лекарственных средств - приоритетное направление инновационного развития фармацевтической науки : материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвященной 80-летию ПГФА (23 ноября 2016 года). – Пермь: ПГФА, 2016. – № 18. – С. 84–86.
13. Цианоорганические цитостатики [Текст] / А. В. Еремкин, В. П. Шевердов, М. И. Казанцева, В. В. Давыдова, М. А. Марьясов, О. Е. Насакин, К. А. Лысенко // Вестник Пермской Государственной фармацевтической академии. Создание конкурентоспособных лекарственных средств - приоритетное направление инновационного развития фармацевтической науки : материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвященной 80-летию ПГФА (23 ноября 2016 года). – Пермь: ПГФА, 2016. – № 18. – С. 86-87.
14. Synthesis, Antiproliferative Activity of Nitrile Containing Pyranes and 1,2,5,6,7,8-Hexahydroquinoline-3,3,4,4-Tetracarbonitriles [Text] / V. P. Sheverdov, M. A. Mar'yasov, V. V. Davydova [et al.] // Journal of Pharmaceutical Science & Emerging Drugs. – 2016. – Vol. 4, N. 2. – Doi: 10.4172/2380-9477.1000114.
15. Реакция метил-2,4-диоксобутаноатов с тетрацианоэтиленом [Текст] / В. П. Шевердов, М. А. Марьясов, В. В. Давыдова, О. Е. Насакин, П. В. Дороватовский, В. Н. Хрусталеv // Журнал общей химии. – 2017. – Т. 87, вып. 7. – С. 1097–1101.
16. Реакция гидразонов α,β -непредельных альдегидов с тетрацианоэтиленом [Текст] / В. В. Давыдова, В. П. Шевердов, М. А. Марьясов, Е. С. Илларионова, О. Е. Насакин // 21 век: фундаментальная наука и технологии XIII : материалы XIII междунар. науч.-практ. конф. (8-9 августа 2017 г. North Charleston, USA). – НИЦ Академический, 2017. – С. 144–147.
17. Антипролиферативная активность 2-(3-циано-4-R₁-5-гидрокси-5-R₂-1H-пиррол-2(5H)-илиден)малонитрилов [Текст] / В. П. Шевердов, В. В. Давыдова, М. А. Марьясов, О. Е. Насакин // Актуальные проблемы фармацевтической деятельности : сб. всерос. науч.-практ. конф. – Казань: ИД МеДДоК, 2017. – Вып. 9. – С. 190–197.
18. Цианосодержащие органические соединения на наноалмазах в качестве цитостатиков [Текст] / О. Е. Насакин, В. В. Давыдова, Е. С. Илларионова, М. А. Марьясов, В. П. Шевердов, А. В. Еремкин, Р. Ю. Яковлев // Современные проблемы науки и фармации : сб. материалов VI всерос. конф. с междунар. участием (к 50-летию Чувашского гос. ун-та им. И. Н. Ульянова). – Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 2017. – С. 177–178.
19. Cyansodeastic cytostatics on nanoalmases [Text] / O. E. Nasakin, V. V. Davydova, E. S. Illarionova, M. A. Maryasov, S. Yu. Vasiljeva, V. P. Sheverdov, A. V. Eremkin,

- R. Yu. Yakovlev, Yu. G. Shtyrlin // Актуальные направления фундаментальных и прикладных исследований : материалы XIV междунар. науч.-практ. конф. (19-20 декабря 2017 г. North Charleston, USA) : в 3 т. Т. 2. – НИЦ Академический, 2017. – С. 101–104.
20. Цитостатики на цианосубстанциях [Текст] / В. В. Давыдова, М. А. Марьясов, Е. С. Илларионова, А. В. Еремкин, П. И. Федоров, О. Е. Насакин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т. 81: Приложение : Материалы V съезда фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств» (14-18 мая 2018 года, г. Ярославль). – С. 67.
 21. Новая фармакофорная группировка в синтезе лекарств-цитостатиков [Текст] / О. Е. Насакин, В. В. Давыдова, М. А. Марьясов, Е. С. Илларионова, А. В. Еремкин, В. П. Шевердов, П. И. Федоров // Российский биотерапевтический журнал. – 2018. – Т. 17, № 1s : Материалы XV Всероссийской научно-практической конференции имени А.Ю. Барышникова. – С. 50.
 22. Нанотрубки и наноалмазы - переносчики цианоорганических субстанций [Текст] / О. Е. Насакин, В. В. Давыдова, М. А. Марьясов, Е. С. Илларионова, А. В. Еремкин, В. П. Шевердов, П. И. Федоров // Российский биотерапевтический журнал. – 2018. – Т. 17, № 1s : Материалы XV Всероссийской научно-практической конференции имени А.Ю. Барышникова. – С. 50–51.
 23. Цитостатики на наноносителях [Текст] / М. А. Марьясов, В. В. Давыдова, А. В. Еремкин, О. Е. Насакин // Семьдесят первая всероссийская научно-техническая конференция студентов, магистрантов и аспирантов высших учебных заведений с международным участием. 18 апреля 2018 г., Ярославль: сб. материалов конф. В 3 ч. Ч. 1 [Электронный ресурс]. – Ярославль : Издат. дом ЯГТУ, 2018. – С.506–508.
 24. Salts of pentacyanopropenides new perspective cytostastics [Text] / V. V. Davydova, E. S. Illarionova, M. A. Maryasov, A. V. Eremkin, V. P. Sheverdov // Topical issues of new drugs development: abstracts of XXV International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student (Kharkiv, April 18-20, 2018). – Kharkiv: NUPh, 2018. – P. 11.
 25. New pharmacophoric grouping in synthesis of cystostatic medicines [Text] / V. V. Davydova, M. A. Maryasov, E. S. Illarionova, A. V. Eremkin, V. P. Sheverdov // Topical issues of new drugs development: abstracts of XXV International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student (Kharkiv, April 18-20, 2018). – Kharkiv: NUPh, 2018. – P. 12.
 26. Детонационный наноалмаз как средство доставки цианоорганических субстанций [Текст] / В. В. Давыдова, М.А. Марьясов, Д. К. Насакина // Научному прогрессу – творчество молодых: материалы XIII междунар. молодежной науч. конф. по естественно-науч. и техн. дисциплинам (Йошкар-Ола, 20-21 апреля 2018 г.) : в 4 ч. / редкол.: Д. В. Иванов, С. Г. Кудрявцев, Э. В. Унженина, В. Е. Шебашев. – Йошкар-Ола: Поволжский государственный технологический университет, 2018. – Ч. 1. – 115–117 с.
 27. Наноалмазы как идеальные наноносители для цианосодержащих цитостатиков [Текст] / В. В. Давыдова, Е. С. Илларионова, М. А. Марьясов // Перспективы развития фундаментальных наук : сб. трудов XV междунар. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых (Томск, 24–27 апреля 2018 г.) : в 7 т. Т. 2: Химия / под ред. И. А. Курзиной, Г. А. Вороновой. – Томск : Изд-во Том. ун-та, 2018. – 207–209 с.
 28. Цитостатики на наноносителях [Текст] / В. В. Давыдова, М. А. Марьясов, О. Е. Насакин, Е. С. Илларионова, А. В. Еремкин, В. П. Шевердов // Инновационные внедрения в области медицины и фармакологии. Выпуск III : сб. науч. трудов по итогам междунар. науч.-практ. конф. (Москва, 25 января 2018 г.). – Москва, 2018. – С. 46–48.
 29. Нанофармация на цианосубстанциях [Текст] / В. В. Давыдова, М. А. Марьясов, А. В. Еремкин // Сборник тезисов XIII Международной (XXII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. – Москва: ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, 2018. – С. 231–332.
 30. Salts of pentacyanopropenides new perspective cytostastics [Text] / V. V. Davydova, E. S. Illarionova, M. A. Maryasov, O. E. Nasakin, V. P. Sheverdov, A. V. Eremkin // Пути и

- формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств : материалы 7-й междунар. науч.-методической конф. «Фармобразование-2018» (Воронеж, 28-30 марта 2018 г.) / под. общ. ред. А. С. Беленовой, А. А. Гудковой ; Воронежский государственный университет. – Воронеж: Изд-во Воронежского ун-та, 2018. – 425–428 с.
31. Cytostatics on nanositors [Text] / М. А. Maryasov, V. V. Davydova, O. E. Nasakin, E. S. Illarionova, V. P. Sheverdov, A. V. Eremkin // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств : материалы 7-й междунар. науч.-методической конф. «Фармобразование-2018» (Воронеж, 28-30 марта 2018 г.) / под. общ. ред. А. С. Беленовой, А. А. Гудковой ; Воронежский государственный университет. – Воронеж: Изд-во Воронежского ун-та, 2018. – 519–522 с.
 32. Детонационный наноалмаз как средство доставки лекарственных веществ [Текст] / В. В. Давыдова, М. А. Марьясов, В. П. Шевердов, О. Е. Насакин // Актуальные вопросы химической технологии и защиты окружающей среды: сб. материалов VII Всерос. конф. с междунар. участием (Чебоксары, 19-20 апреля 2018 г.). – Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 2018. – С. 99–100.
 33. Наноалмаз как средство доставки цитостатиков [Текст] / В. В. Андреева, М. А. Марьясов, Н. П. Ромашов, О. Е. Насакин // Фармация. – 2021. – Т. 70, № 7. – С. 11–17.
 34. Реакция 1-(2-оксоциклогексил)этан-1,1,2,2-тетракарбонитрила с α,β -непредельными альдегидами [Текст] / В. П. Шевердов, В. В. Давыдова, О. Е. Насакин, М. А. Марьясов, П. В. Дороватовский, В. Н. Хрусталева // Журнал общей химии. – 2019. – Т. 89, вып. 3. – С. 350–356.
 35. *Ethene-1,1,2,2-tetracarbonitrile and Methanol in the Methylating Reaction of Tertiary Amines to the Quaternary Ammonium Compounds of 1,1-Dicyano-2-methoxy-2-oxoethane-1-ide* [Text] / V. P. Sheverdov, V. V. Davydova, O. E. Nasakin, M. A. Mar'yasov, O. A. Lodochnikova // *Synlett*. – 2019. – Vol. 30, iss. 2. – P. 173–177.
 36. Марьясов, М. А. Антипролиферативная активность 2-галоген-5,6-дигидропиридин- и 2-галоген-4а,5,6,7-тетрагидрохинолин-3,4,4(1H)-трикарбонитрилов [Текст] / М. А. Марьясов, А. В. Еремкин, О. Е. Насакин // Химико-фармацевтический журнал. – 2019. – Т. 53, № 11. – С. 34–36.
 37. Синтез аминифенилполикарбонитрилов в реакции Михаэля арилиденмалонитрилов [Текст] / М. А. Марьясов, В. В. Давыдова, О. Е. Насакин, С. А. Штейнгольц, О. А. Лодочникова // Журнал общей химии. – 2019. – Т. 90, вып. 8. – С. 1304–1308.
 38. Novel approach to synthesis of pharmaceutical substances by the methylating reaction of tertiary amines [Text] / V. V. Davydova, M. A. Mar'yasov, E. S. Illarionova, O. E. Nasakin // XXI Mendeleev Congress on General and Applied Chemistry: book of abstracts in 6 volumes (Saint Petersburg, 9–13 September). – 2019. – Vol. 1. – P. 346.
 39. Hydrazones of α,β -unsaturated aldehydes in [2+2]-cycloaddition with tetracyanoethylene [Text] / V. V. Davydova, E. S. Illarionova, M. A. Mar'yasov, O. E. Nasakin // XXI Mendeleev Congress on General and Applied Chemistry: book of abstracts in 6 volumes (Saint Petersburg, 9–13 September). – 2019. – Vol. 1. – P. 347.
 40. Марьясов, М. А. Антипролиферативная активность 2-ароил- и 2-гетероил-1,1,3,3-тетрацианопрор-2-ен-1-идов [Текст] / М. А. Марьясов, Я. С. Каюков, О. Е. Насакин // Химико-фармацевтический журнал. – 2020. – Т. 54, № 2. – С. 40–42.
 41. Антипролиферативная активность 3-((N-гидразоно)метил)циклобутан-1,1,2,2-тетракарбонитрилов и 3-((2-N-гидразоно)метил)-6-метилциклогекс-4-ен-1,1,2,2-тетракарбонитрилов [Текст] / М. А. Марьясов, Давыдова В. В., Насакин О. Е., Лысенко К.А. // Химико-фармацевтический журнал. – 2020. – Т. 54, № 3. – С. 11–15.

42. Антипролиферативная активность N-замещенных 2,4-диамино-5-арил-5,6,7,8,9,10-гексагидро-бензо[b][1,8]нафтиридин-3-карбонитрилов [Текст] / И. Н. Бардасов, А. Ю. Алексеева, О. В. Ершов, М. А. Марьясов // Химико-фармацевтический журнал. – 2020. – Т. 54, № 5. – С. 50–52.
43. Кристаллическая структура пентацианопренидов дакарбазина, метоклопрамида и ацетилхолина [Текст] / С. А. Штейнгольц, В. В. Давыдова, М. А. Марьясов, О. Е. Насакин, Р. Р. Файзуллин, О. А. Лодочникова // Журнал структурной химии. – 2020. – Т. 61, № 6. – С. 980–990.
44. Отсутствие антипролиферативной активности у 6-замещенных поликарбонитрильных производных 3-азабицикло[3.1.0]гексана [Текст] / И. Н. Бардасов, А. Ю. Алексеева, О. В. Ершов, М. А. Марьясов // Химико-фармацевтический журнал. – 2020. – Т. 54, № 8. – С. 7–9.
45. Антипролиферативная активность продуктов циклизации 1-(2-оксоциклогексил)этан-1,1,2,2-тетракарбонитрила с α,β -непредельными альдегидами [Текст] / М. А. Марьясов, В. В. Давыдова, О. Е. Насакин, В. А. Тафеенко // Химико-фармацевтический журнал. – 2020. – Т. 54, № 8. – С. 29–32.
46. Реакция тетрацианоэтилена третичными аминами / П. А. Егоров, В. В. Давыдова, М. А. Марьясов, Н. П. Ромашов, А. С. Акчурин, О. Е. Насакин // Актуальные вопросы химической технологии и защиты окружающей среды: сб. материалов VIII всерос. конф. (Чебоксары, 16-17 апреля). – Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 2020 – с. 170.
47. *Redirecting a Diels–Alder Reaction toward (2+2)-Cycloaddition [Text] / M. V. Panova, M. G. Medvedev, M. A. Mar'yasov, K. A. Lyssenko, O. E. Nasakin // Journal of Organic Chemistry. – 2021. – Vol. 86, iss. 6. – P. 4398–4404.*
48. Антипролиферативная активность производных 2-амино-4H-хромен-3-карбонитрилов – 3-цианокумаринов и 2-аминохромен[2,3-b]пиридин-3-карбонитрилов [Текст] / И. Н. Бардасов, А. Ю. Алексеева, О. В. Ершов, М. А. Марьясов // Химико-фармацевтический журнал. – 2021. – Т. 55, № 7. – С. 14–17.
49. Синтез 2,2-диметилгидразоно-бут-2-еннитрилов и [(2,2-диметилгидразоно)-метил]фенилакрилонитрилов для разработки антимикробных флуоресцентных красителей [Текст] / М. А. Марьясов, В. В. Давыдова, О. Е. Насакин, С. А. Штейнгольц, О. А. Лодочникова // Журнал общей химии. – 2021. – Т. 91, № 9. – Р. 1321–1327.

Патенты:

50. Патент № 2700928 Российская Федерация. Способ получения метил 3-ацил-4-циано-5-(дицианометил)-2-гидрокси-2,5-дигидро-1H-пиррол-2-карбоксилатов: № 2018109533 : заявлено 07.03.2018 : опубликовано 24.09.2019 / В. В. Давыдова, Е. С. Тимофеева, М. А. Марьясов [и др.].