

*На правах рукописи*



Церковникова Наталья Андреевна

**СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ  
АКТИВНОСТИ НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ФАКТОРА  $\chi_a$**

1.4.16 – Медицинская химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2021

Диссертация выполнена в ООО «ФармаДиол» и в Отделе динамики химических и биологических процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н.Семенова Российской академии наук.

**Научный руководитель**

**Товбин Дмитрий Геннадиевич**

кандидат физико-математических наук  
научный сотрудник ФГБУН ФИЦ ХФ  
им. Н.Н.Семенова РАН

**Официальные оппоненты**

**Офицеров Евгений Николаевич**

доктор химических наук, профессор  
кафедры химии и технологии  
биомедицинских препаратов «РХТУ им.  
Д.И. Менделеева», г. Москва

**Устюжанина Надежда Евгеньевна**

кандидат химических наук, старший  
научный сотрудник лаборатории химии  
глюкоконъюгатов «Института  
органической химии им. Н.Д.  
Зелинского РАН», г. Москва

**Ведущая организация**

Федеральное государственное  
бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Волгоградский государственный  
медицинский университет»  
Министерства здравоохранения  
Российской Федерации, г. Волгоград

Защита состоится «\_\_»\_\_\_\_\_2021 г. в\_\_часов\_\_минут на заседании диссертационного совета 24.1.139.01 (Д 002.102.01) на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологически активных веществ Российской академии наук (ИФАВ РАН) по адресу: 142432, Московская область, г. Черноголовка, Северный проезд, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИФАВ РАН.  
Автореферат размещен на сайте ИФАВ РАН ([www.ipac.ac.ru](http://www.ipac.ac.ru)).

Автореферат разослан «\_\_»\_\_\_\_\_2021 г.

Ученый секретарь диссертационного  
совета 24.1.139.01 (Д 002.102.01)



к.х.н. С. В. Афанасьева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.**

Сердечно-сосудистая система представляет собой совокупность органов, обеспечивающих непрерывную циркуляцию крови в организме. Нормальной работе сосудистой системы способствует свертывающая система крови, сохраняющая кровь в жидком состоянии при физиологической норме, и формирующая сгустки крови при различных повреждениях сосудов, предотвращая кровопотерю и гибель организма. Нарушения в работе свертывающей системы приводят к образованию тромбов как в венозных и артериальных сосудах, так и в сердце. Наиболее распространенными заболеваниями, развивающимися в результате тромбоэмболии, являются: ишемический инсульт головного мозга, инфаркт миокарда, тромбоэмболия легочной артерии, тромбозы глубоких вен нижних конечностей. Для предотвращения тромбообразования используют различные антикоагулянтные лекарственные средства.

Антикоагулянты – это терапевтические препараты, применяемые как для профилактики тромбообразования, так и для лечения, так как препятствуют образованию нитей фибрина, их полимеризации и, соответственно, приводят к прекращению роста уже образованного тромба. На протяжении длительного времени единственным классом доступных пероральных антикоагулянтов были антагонисты витамина К, такие как: варфарин, фенилин, неодикумарин и т.д. Однако, несмотря на доказанную эффективность, данные препараты обладают рядом недостатков, требующих постоянного мониторинга состояния системы свертывания, корректировки дозы препарата, связанного с зависимостью терапии этими препаратами от диеты. Препараты этого класса страдают узким терапевтическим окном из-за чего возможно возникновение серьезных побочных эффектов, в том числе кровотечений. Эти недостатки мотивировали разработку других пероральных антикоагулянтов, не являющихся антагонистами витамина К и обладающими различными механизмами действия. Многочисленные исследования в данной области показали, что одной из наиболее привлекательных мишеней для создания новых антикоагулянтов является фактор Стюарта-Прауэра (ФХа). ФХа – фактор свертывания крови X представляет собой белок  $\gamma$ -глобулин, профермент. ФХа является как частью внешнего, так и внутреннего пути образования

протромбиназы, превращающей протромбин в тромбин. Тромбин, в свою очередь, превращает растворимый фибриноген в нерастворимый фибрин – основу тромба.

Современные антикоагулянтные препараты должны отвечать следующим требованиям: иметь низкую токсичность и узкий спектр побочных действий, обладать высокой антитромботической эффективностью и низким уровнем риска развития спонтанных кровотечений – главного осложнения антитромботической терапии.

Одним из возможных подходов к снижению риска развития кровотечения может быть поиск биологически активных веществ с высоким сродством и избирательностью действия к белкам, участвующим в коагуляции, это позволило бы использовать низкие дозы препарата и, соответственно, снизило риск развития кровотечения. Еще одним критерием при разработке эффективного антитромботического препарата является создание лекарственного средства для перорального применения.

Ранее авторами патента EA015918 был описан ряд структур, потенциально ингибирующих FXa. В результате нескольких исследований, часть которых описана в настоящей работе, выбрана молекула N-(5-хлорпиридин-2-ил)-2-({4-[этанимидоил(метил)амино]бензоил}амино)-5-метилбензамида гидрохлорид (условное название - DD217). В настоящий момент лекарственный препарат с действующим веществом на основе DD217 находится на этапе клинических исследований 2-й и 3-й фазы с перспективой регистрации, как лекарственное средство по одному из стандартных показаний, общепринятому для класса пероральных антикоагулянтов прямого действия.

#### **Объект и предмет исследования.**

Объектами исследования являются ингибиторы фактора свертывания Ха:

- 1) 18 веществ, производных DD217, синтезированные в процессе hit-to-lead оптимизации (список приведен в главе 3.2).
- 2) Метаболит DD217: N-(5-хлорпиридин-2-ил)-2-[(4-этанимидоил(метиламино)фенилкарбонил)амино]-4-гидрокси-5-метилбензамид.

Предмет исследования – виртуальный поиск и численное предсказание активности структур, ограниченных защитой патентом EA015918 с последующим

синтезом некоторых из предсказанных молекул с целью определения специфической *in vitro* и *in vivo* фармакологической активности.

**Цель работы.** Оптимизация структуры соединения-лидера (DD217) с целью повышения его активности и селективности, и использование для этих целей аналогов, созданных по принципу трехмерного фармакофорного подобия с использованием моделирования SAR. Оптимизация структуры химических веществ с целью улучшения их комплексных физико-химических, фармакокинетических и фармакодинамических характеристик. Биологическое и физиологическое (*in vitro* и *in vivo*) тестирование полученных соединений на предмет изучения особенностей их взаимодействия с ФХа. Исследование ингибирующей активности соединения-лидера (DD217) и его метаболита, как потенциальных лекарственных средств, относящихся к классу новых оральных антикоагулянтов.

**Задачи, решенные в ходе достижения цели.**

1. Поиск и предсказание 263 структур, которые продемонстрировали энергию связывания (оценка AutoDock) большую или равную, чем вычисленная энергия для структуры DD217.
2. Синтез и изучение ингибирующей способности 18 веществ-кандидатов на лекарство-антикоагулянт, прямой ингибитор ФХа. Выбор соединения-лидера.
3. Изучение специфической фармакологической активности перорального антикоагулянта DD217 на различных моделях *in vitro*, *in vivo*.
4. Поиск, дизайн и синтез метаболитов DD217.
5. Изучение специфической фармакологической активности метаболита DD217 *in vitro*.

**Научная новизна и практическая ценность работы.** Впервые проведен виртуальный скрининг структурных аналогов N-(5-хлорпиридин-2-ил)-2-({4-[этанимидоил(метил)амино]бензоил}-амино)-5-метилбензамида (DD217) на пространстве молекул, ограниченных формулой Маркуша из п.1 патента EA015918, с использованием подхода SAR для обнаружения биологически активных веществ с заданными свойствами. Число потенциальных кандидатов удалось уменьшить с  $10^{13}$  до 263 структур.

Впервые синтезированы, охарактеризованы физико-химическими методами 18 амидов различного строения, из которых 9 мочевины и 9 амидинов, и изучена их биологическая активность *in vitro* и *in vivo*.

Впервые спрогнозирована структура возможных метаболитов DD217, один из которых затем был синтезирован и охарактеризован физико-химическими методами и изучена его биологическая активность *in vitro*.

Впервые изучена ингибирующая способность полученных производных по отношению к фактору Ха. Впервые показано, что метаболиты DD217 обладают антикоагулянтными свойствами и могут представлять интерес, как потенциальные лекарства-антикоагулянты.

Впервые исследована специфическая фармакологическая активность DD217 и доказано, что это вещество является лекарством-антикоагулянтом.

#### **Методология и методы исследования.**

Для целей генерации была создана программа, осуществляющая систематическую вариацию всех доступных заместителей (из отдельного списка для каждой группы) в формуле Маркуша из п.1 патента EA015918. Модификация проводилась с использованием текстовой нотации для структур SMILES. В качестве средств для докинга и оценки энергии взаимодействия лиганда были использованы пакет AutoDock Vina (ADV) и AutoDock. Регрессионные модели и оценка значимости параметров производилась средствами GNU R.

Анализ прямой ингибиторной активности веществ *in vitro* по отношению к фактору Ха осуществляли согласно методу, описанному в книге «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под редакцией А.Н. Миронова. При этом кинетику расщепления субстрата S<sub>2765</sub> белком фактор Ха исследовали на спектрофотометре «Specord M40» с автоматической записью данных об изменении во времени оптической плотности реакционной смеси в кварцевой термостатируемой кювете толщиной 1 см, при температуре 37,0±0,5° С. Аналогично, были получены константы ингибирования IC<sub>50</sub> других ферментов системы свертывания крови - Plasmin, фактор XIa, Protein C, Kallikrein и фактор XIIa, но с использованием соответствующих хромогенных субстратов.

Измерение анти-Ха амидолитической активности плазмы, протромбинового времени (ПВ) проводили с помощью методов, описанных в инструкциях к наборам

производства НПО «РЕНАМ» (г.Москва) - Реахром-гепарин и Ренампластин. Ингибирование фактора Ха исследуемым веществом пропорционально концентрации этого вещества в плазме. Оставшееся количество фактора Ха катализирует отщепление пара-нитроанилина (pNA) от синтетического хромогенного субстрата. Оптическую плотность раствора со свободным pNA определяли при длине волны 405 нм. Величина оптической плотности обратно пропорциональна активности исследуемого вещества в плазме.

#### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Предсказание активности и выбор лучших кандидатов для синтеза на основании SAR расчетов в пространстве молекул, ограниченном структурой формулы п.1 патента EA015918.
2. Синтез структурных аналогов DD217 и определение их биологической активности *in vitro*. Выбор наилучшей молекулы по нескольким параметрам, в том числе, по результатам экспериментов *in vivo*.
3. Поиск новых антикоагулянтов на основе прогнозирования метаболитов DD217
4. Синтез метаболита DD217 и определение его биологической активности *in vitro*.
5. Изучение специфической фармакологической активности вещества-лидера DD217.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

Проведено SAR моделирование структуры новых антикоагулянтов на основе диамидов.

Создана база данных низкомолекулярных антикоагулянтов на основе диамидов, что позволяет прогнозировать механизм действия этих соединений, а также использовать полученные данные для скрининга новых антикоагулянтов среди коммерчески доступных низкомолекулярных соединений.

На основе тестирования *in vitro* в ряду теоретически смоделированных амидинов и мочевинов определены биологически активные аналоги антикоагулянта DD217. Антикоагулирующая активность некоторых структурных аналогов DD217 изучена *in vivo* и сравнивается с активностью DD217.

Синтезирован метаболит DD217 и изучена специфическая фармакологическая активность в сравнении с DD217 и Ривароксабаном, (известным антикоагулянтом компании Байер).

На основе экспериментальных данных по изучению специфической фармакологической активности DD217 сделан вывод о перспективности этого вещества, как кандидата в лекарство-антикоагулянт и необходимости его дальнейших испытаний.

**Степень достоверности результатов.** Строение всех полученных соединений было подтверждено широким спектром современных физико-химических методов анализа, включающих спектроскопию ядерного магнитного резонанса, масс-спектрономию высокого разрешения. Биологическая активность полученных соединений измерялась согласно стандартным протоколам и подтверждается статистически значимой воспроизводимостью экспериментальных данных, полученных в ходе работы.

**Апробация результатов.** Основные материалы диссертации были представлены в виде тезисов на следующих конференциях: «5 Международный форум антикоагулянтной + антиагрегантной терапии (ФАКТplus2020)» (Москва, 19-21 марта 2020); I Международная научно-практическая конференции «Медико-биологические и нутрициологические аспекты здоровьесберегающих технологий» (Кемерово, 27 ноября 2020).

**Соответствие паспорту специальности.** Диссертация соответствует паспорту специальности 1.4.16 – Медицинская химия – по пунктам: 1. (Поиск, структурный дизайн и синтез соединений-лидеров – потенциальных физиологически активных (лекарственных) веществ, на основе: а) знания структурных параметров биомишени или особенностей патогенеза; б) анализа и модификации структур известных активных соединений; в) синтеза и биологического тестирования широкого разнообразия химических соединений), 2. (Использование фундаментальных методов математической химии (компьютерного молекулярного моделирования QSAR) с целью прогнозирования возможности взаимодействия определенных химических соединений с предполагаемой биологической мишенью, а также для выявления взаимосвязи между химической структурой и физиологической активностью). 3. (Оптимизация структуры соединения-лидера с целью повышения его активности и селективности и использование для этих целей создания аналогов по принципу трехмерного фармакофорного подобия). 4. (Оптимизация структур химических веществ с целью



улучшения их комплексных физико-химических, фармакокинетических и фармакодинамических характеристик), 6 (Биологическое и физиологическое (*in vitro* и *in vivo*) тестирование сконструированных и синтезированных соединений на предмет изучения особенностей их взаимодействия с молекулярными мишенями организма).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 2 работы в изданиях, рекомендуемых ВАК и индексируемых Scopus и Web of Science, а также тезисы 2 докладов на конференциях 2020 года, получен патент ЕАПО.

**Личный вклад автора.** В основу диссертационной работы положены результаты, полученные лично автором или при его участии в период с 2015 по 2021 гг. Автор лично провела сбор и систематизацию литературных данных, лично выполнила синтез 19 соединений, лично проводила эксперименты на животных (крысы) с целью получения биологических образцов. Автор принимала непосредственное участие в постановке задач, проведении биологических экспериментов, в частности изучала активность исследуемых соединений по отношению к фактору Ха, влияние исследуемых соединений на показатели протромбинового времени *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*. Также автор лично занималась подготовкой статей и тезисов докладов к публикации, участвовала в научных конференциях. В определении задач исследования, планирования эксперимента и обобщения результатов наряду с научным руководителем, участвовали к.ф.-м.-н. Тарасов Д.Н., к.х.н. Малахов Д.В., д.б.н. Дрозд Н.Н., к.ф.-м.н. Айбуш А.В. Докинг/SAR были проведены совместно Д.А Шульгой, специалистом Лаборатории медицинской химии Химического факультета МГУ им.Ломоносова (руководитель лаборатории – В.А. Палюлин).

Данная работа была проведена в рамках выполнения грантового соглашения с Фондом Сколково №Г20/14 от 16.06.2014, софинансирование которого осуществляли совладельцы ООО «ФармаДиол» г-н Балашов О.Е и г-н Баранов А.И.

Всем перечисленным коллегам и спонсорам автор выражает искреннюю признательность за неоценимую помощь и участие.

**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из введения, четырех глав (литературный обзор, материалы и методы, обсуждение результатов, экспериментальная часть), выводов, списка сокращений, списка использованной

литературы, приложения. Материал изложен на 161 странице, содержит 18 таблиц, 58 рисунков, приложения. Список литературы включает 175 ссылок.

## ОСОБЕННОСТИ СОДЕРЖАНИЯ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы диссертационной работы, сформулированы цель и задачи, описана научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы. В **главе 1** приводится обзор литературы по разработке ингибиторов фактора Ха. В **главе 2** приводятся результаты работы и их обсуждение. В **главе 3** приводятся материалы и методы исследования. В **главе 4** приводятся методики синтеза исследуемых соединений и методики изучения фармакологической активности полученных соединений.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### 1. Поиск новых антикоагулянтов

Поиск новых антикоагулянтов проводился в рамках описанной ранее модели, основанной на физической структуре белка ФХа. На первом этапе нужно было исследовать доступное химическое пространство, покрытое патентной формулой EA015918 (рисунок 1), с целью выявления новых перспективных молекул.

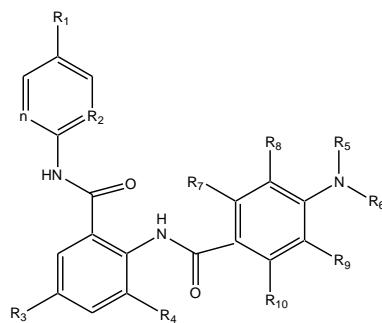


Рисунок 1. Общая формула производных амидов

Для этого сгенерировали все доступные структуры (порядка  $10^{13}$ ), выбрали из них представительное подмножество для дальнейшего более детального исследования методом молекулярного докинга. Из лучших структур выбрали наиболее перспективные для синтеза, а затем проводили синтез и экспериментальную проверку активности структур.

Фактор Ха представляет собой сериновую протеазу с малоподвижным сайтом связывания субстрата. Среди известных структур некоторая вариация положений

боковых остатков аминокислот, образующих сайт связывания, наблюдается лишь для кармана P4. Для дальнейшего моделирования был выбран белок из комплекса PDB:1IQI. Стандартными средствами MGLTools из модели рецептора удалены молекулы воды, ионы, все малые молекулы, а также альтернативные позиции белковых цепей (оставлены первые).

В качестве средств для докинга и оценки энергии взаимодействия лиганда было принято решение использовать AutoDock, который прошел валидационный тест на наличие ключевых водородных связей между остатками Gly-216 и Gly-218 и амидными связями между циклическими фрагментами патентной формулы в отличие от AutoDock Vina (ADV), который такой валидации не прошел.

Для получения итоговой энергии по результатам докинга были отобраны позиции связывания, наиболее близкие по RMSD по трем точкам (рисунок 2), выбранным так, чтобы отразить ключевые особенности позиции: занятие кармана P1 при помощи циклической системы с заместителем R1, расположение средней циклической системы в непосредственно близости к Gly-216 и Gly-218 и расположение заместителей R5 и R6 в кармане P4 сайта связывания.

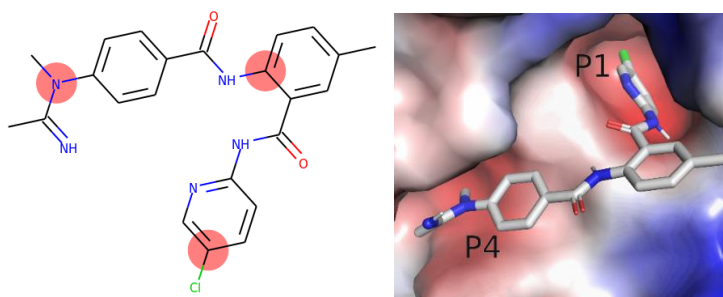


Рисунок 2 - Точки для сравнения позиции (а) с валидированным расположением скаффолда в сайте связывания ФХа (б).

Для получения полуколичественных моделей, позволяющих интерпретировать значимость заместителя и его влияние на предсказанную энергию связывания, использовался QSAR метод Фри-Вильсона. В рамках этого метода строится регрессионная модель, в которой в качестве независимых переменных используются индикаторные переменные, показывающие присутствует конкретный заместитель в определенной позиции или нет (значения 1 или 0, соответственно).

Регрессионные модели и оценка значимости параметров производилась средствами GNU R. На каждом этапе моделирования варьировались заместители в нескольких положениях, что позволяло выявить вклад конкретного заместителя на основании данных докинга и QSAR-модели. Для следующего шага выбирали как можно меньшее число наиболее подходящих заместителей в исследованной позиции, что позволяло уменьшить количество сгенерированных структур на последующих стадиях.

Для дальнейшей экспериментальной проверки активности структур был предложен список из 263 кандидатов, которые продемонстрировали энергию связывания (оценка AutoDock) большую или равную, чем вычисленная энергия для DD217. С учетом синтетической доступности и других данных по аналогичным структурам и с использованием исследованных SAR зависимостей выбиралось подмножество из этих структур.

В отобранных структурах заместитель в положении R6 было принято представить примерно в одинаковых пропорциях для амидинового фрагмента и производного мочевины.

Заместители R1 и R2 было принято проварьировать лишь в нескольких структурах, поскольку эти заместители были достаточно хорошо провалидированы в работе по оптимизации аналогичной с DD217 структуры - бетриксабана. В большинстве исследуемых структур был оставлен 5-хлорпиридин-2-ильный фрагмент, как оптимальный и по афинности, и по селективности к другим мишеням.

На основании данных моделирования, а также экспериментальных данных по исследованию SAR бетриксабана, было принято решение не варьировать заместитель R4, т.к. это не приводит к объяснимому увеличению активности.

Что касается вариации заместителя в положении R3, то было принято решение расширить рекомендации моделирования и включить в некоторые структуры F и OMe заместители. Для SAR бетриксабана было показано, что замещение указанными заместителями в этом положении дает активности несколько большие, чем для незамещенных структур. Кроме того, результаты моделирования не противоречат их использованию. Они лишь показывают, что с точки зрения докинга такие заместители не являются оптимальными. Однако с учетом известной точности результатов докинга, эта рекомендация не является запретительной.

Аналогичные соображения были применены к выбору заместителей в положении R7. Здесь моделирование показало, что из исследуемых заместителей любой приводит к увеличению энергии связывания лиганда с рецептором. При выборе конкретных заместителей была принята более консервативная стратегия и были использованы заместители, которые экспериментально продемонстрировали свою значимость на схожей структуре бетриксабана. Литературные данные по экспериментальной зависимости для бетриксабана по заместителям в R7 не известны. Поэтому в нашем моделировании в качестве R7 использовались лишь F и OMe заместители.

В соответствии со схемой (см. рис.3) были синтезированы 18 новых структурных аналогов DD217, относящихся к классу мочевины (115, 117, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317) и классу амидинов (216, 301, 302, 303, 304, 306, 307, 310, 318), см. таблицу 3 Раздела 2.1 Диссертации. Для этих веществ были измерены константы ингибирования  $K_i$  белка ФХа и концентрации, удваивающие протромбиновое время (ПВ $\times$ 2) в плазме животных и человека. У наиболее эффективных веществ были определены дополнительные параметры: стабильность, растворимость и липофильность. В результате для последующих “in vivo” испытаний для сравнения с соединением 217 были отобраны соединения 115, 117, 216, 301, 302, 303, 310. Для этих веществ были получены фармакодинамические параметры для различных доз соединений при per os (пероральном) и iv (внутривенном) введении. Результаты экспериментов обобщены в таблице 1 и характеризуются следующими величинами: среднее время ( $T_{max}$ ), необходимое для достижения максимума терапевтического эффекта после введения per os; средний период полувыведения ( $T_{1/2}$ ) в соответствии с фармакодинамикой ПВ; и, наконец, соотношение ПВ при  $T_{max}$  (ПВ $_{max}$ ) к ПВ перед введением (ПВ $_0$ ).

Оказалось, что соединение DD217, превосходит другие соединения по периоду полувыведения и активности (ПВ $_{max}$ /ПВ $_0$ ) при тех же дозах и путях введения. Таким образом, принимая во внимание активность DD217, было принято решение оставить его единственным кандидатом и провести другие испытания с этим соединением.

Таблица 1 - Результаты экспериментов на кроликах и крысах.

Соединение	Структура	Животное	Путь введения	Дозы мг/кг	ПВ <sub>max</sub> /ПВ <sub>0</sub>	T <sub>max</sub> , мин	T <sub>1/2</sub> , мин
217		кролики	IV	1.6	2	10	25
		кролики	IV	1	1.8	10	25
		крысы	per os	6	1.7	10	30
		крысы	IV	1	3.5	5	5
		крысы	IV	3	1.7	40	60
216		крысы	per os	0.5	1.0		
		крысы	per os	3	1.7	15	45
		крысы	per os	10	1.3	20	180
115		крысы	per os	10	1.0		
117		крысы	IV	1	1.3	10	20
301		крысы	IV	1	2.0	10	30
302		крысы	IV	1	2.0	2	10

Соединение	Формула	Животное	Путь введения	Дозы мг/кг	ПВ <sub>max</sub> / ПВ <sub>0</sub>	T <sub>max</sub> , мин	T <sub>1/2</sub> , мин
303		крысы	IV	1	1.5	3	15
310		крысы	IV	1	1.3	5	20

Примечание: IV - введение препарата внутривенно; *per os* – введение препарата перорально.

## 2. Синтез новых антикоагулянтов

Схема синтеза исследованных веществ изображена на рисунке 3.

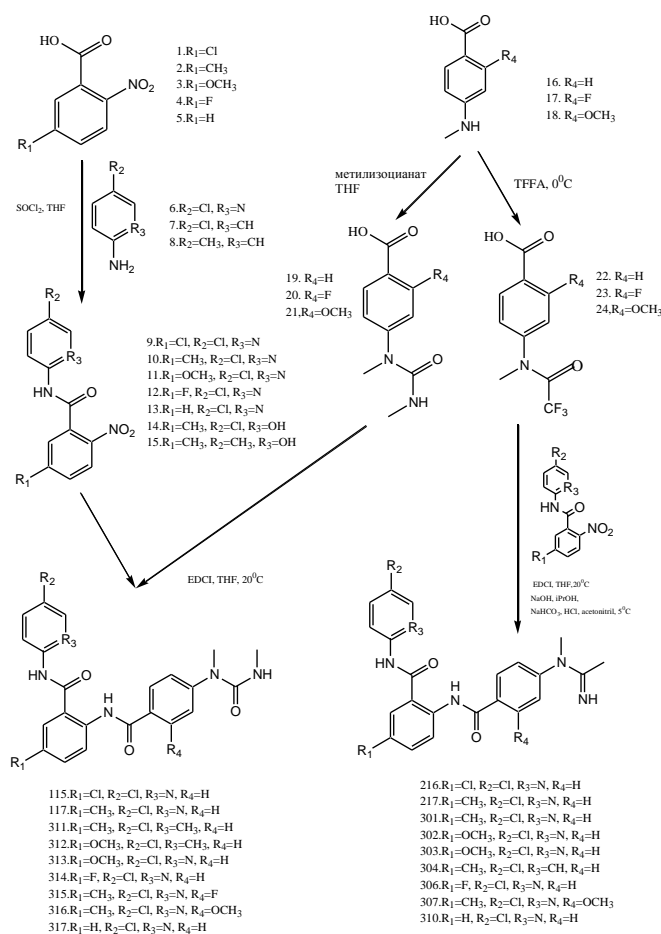


Рисунок 3. Схема синтеза DD217 и его производных

### 3. Поиск новых антикоагулянтов, метаболитов DD217

Наряду с изучением фармакофоров, другим способом поиска возможных биологически активных соединений является изучение метаболитов известной активной субстанции.

Поскольку любое вещество подвергается окислительной биотрансформации в печени, предполагаемыми метаболитами могут быть гидроксипроизводные N-(5-хлорпиридин-2-ил)-2-[(4-этанимидоил-метиламинофенилкарбонил)-амино]-5-метилбензамида. С целью исследования механизма действия этого соединения были получены предполагаемые метаболиты формулой, представленной на рисунке 4.

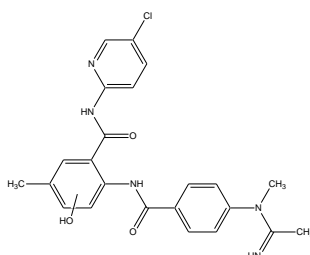


Рисунок 4 - Общая формула метаболитов DD217

Для идентификации потенциальных метаболитов DD217 и определения места возможной биотрансформации в молекуле были получены ТС-хроматограммы по наиболее крупным фрагментам 308m/z и 253m/z с использованием положительного MRM-режима детектирования.

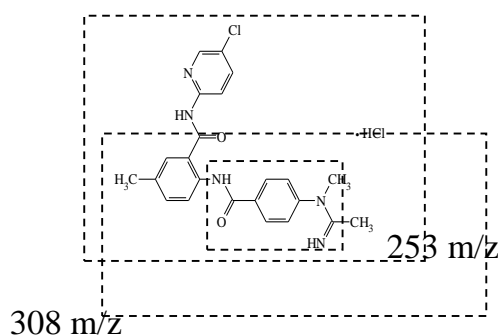


Рисунок 5 - Наиболее интенсивные ионы-фрагменты  $[M+H]^+$  молекулы DD217 в соответствии с MS/MS-спектром.

Установлено, что хроматограммы по фрагментам 253 m/z и 308 m/z практически идентичны, а наиболее вероятные метаболиты совпадают. Отсюда следует, что окисление происходит во фрагменте с меньшей массой 253 m/z. Данный вывод подтверждается при сопоставлении спектров исходного вещества и обнаруженных метаболитов. Ионам исходного соединения 436, 308 и 253 m/z



соответствуют ионы M+16 в спектрах метаболитов, т.е. 452, 324 и 269 m/z. Ион 120 m/z присутствует во всех трех спектрах и имеет максимальную интенсивность, поэтому очевидно, что окисление не затрагивает этот фрагмент. Спектры метаболитов очень близки, и в обоих спектрах присутствует ион 92 m/z, отсутствующий у исходного вещества, что соответствует массе второго бензольного кольца и протонированного кислорода (75+16+1). Таким образом, вероятно, окисление происходит в метилированном бензольном кольце молекулы, а метаболиты представляют собой изомеры, отличающиеся по положению OH-группы в кольце (рисунок 4).

## 2. Синтез новых антикоагулянтов, метаболитов DD217

Синтез гидроксипроизводных проводился по схеме, изображенной на рисунке 6.

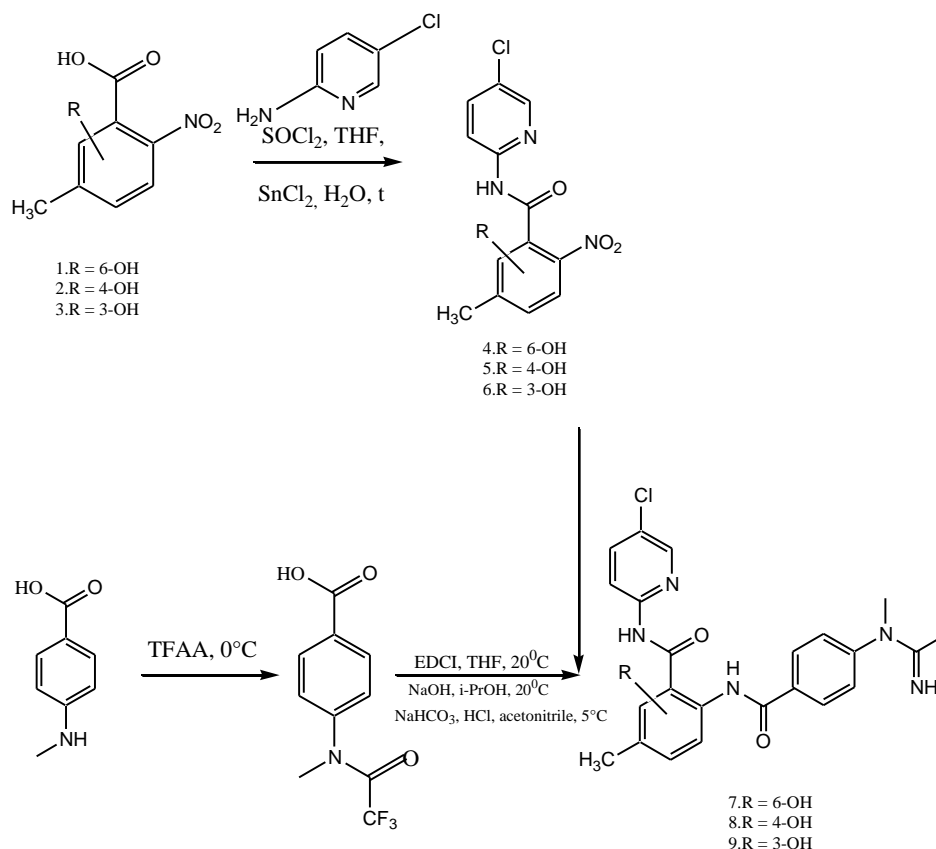


Рисунок 6 - Схема синтеза гидроксипроизводных N-(5-хлорпиридин-2-ил)-2-[(4-этанимидоил-метил-аминофенилкарбонил)амино]-5-метилбензамида.

По указанной схеме удалось синтезировать N-(5-хлорпиридин-2-ил)-2-[(4-этанимидоилметиламинофенил-карбонил)амино]-4-гидрокси-5-метилбензамид.

### 3. Изучение фармакологической активности новых антикоагулянтов

Для субстанции DD217 были получены *in vitro* основные параметры, определяющие качество и эффективность её как лекарство-антикоагулянт.

#### 3.1. Влияние на ПВ и амидолитическую активность в плазме крыс, обезьян и человека

В соответствии с описанием, данным в инструкции к набору Реахром-гепарин (производства НПО «РЕНАМ») измерялась концентрация DD217 в плазме крови, при которой МНО увеличивается в 2 раза по сравнению с контролем, а также концентрация субстанции в плазме крови, при которой амидолитическая (анти-ФХА) активность снижается в 2 раза, по сравнению с контролем. Подобные эксперименты были проведены и для препарата сравнения – ривароксабан.

Из этих данных были определены концентрации DD217 и ривароксабана, при которых МНО увеличивается в 2 раза, по сравнению с контролем (таблица 2) и при которых амидолитическая активность плазмы (анти-ФХа) увеличивается в 2 раза по сравнению с контролем (таблица 3).

Таблица 2 - Концентрации субстанции DD217 и субстанции ривароксабан в плазме крови крыс, обезьян и человека, при которых МНО увеличивается в 2 раза по сравнению с контролем.

Субстанция	С <sub>ПВх2</sub> , 10 <sup>-6</sup> М		
	Человек	Обезьяны	Крысы
DD217	0.09±0.02	0.30±0.05	3.0±0.5
Ривароксабан	0.70±0.09	0.30±0.05	1.4±0.4

Из таблицы 2 видно, что при одинаковой дозировке и в случае сравнимой биодоступности, эффективность субстанции DD217 по сравнению с субстанцией ривароксабан будет ниже на крысах, сравнимой на обезьянах и выше на людях. Это может свидетельствовать о более высокой избирательности и специфичности DD217 к человеческому Фактору Ха, чем у ривароксабана.

Таблица 3 - Концентрации субстанции DD217 и ривароксабан в плазме крови крыс, обезьян и человека, при которой анти-фактор Ха амидолитические активности плазм увеличиваются в 2 раза по сравнению с контролем. Количество измерений  $n=6-8$ .

Субстанция	$C_{x\text{Fa}}, 10^{-6} \text{ M}$		
	Человек	Обезьяны	Крысы
DD217	$2,2 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,3$	$2,3 \pm 0,3$
Ривароксабан	$2,7 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,9$	$4,0 \pm 0,5$

Из таблицы 3 видно, что концентрации субстанции DD217, при которых анти-ФХа активность снижалась в 2 раза по отношению к контрольной плазме при использовании плазмы человека -  $2,2 \pm 0,2$  мкМ, плазмы обезьян -  $2,3 \pm 0,3$  мкМ, плазмы крыс -  $2,3 \pm 0,3$  мкМ.

При лечении тромбозов терапевтический диапазон для анти-ФХа активности плазмы составляет 0,3-0,7 ЕД/мг, а профилактический диапазон - 0,1-0,3 ЕД/мг. Экспериментально было установлено что терапевтический диапазон в плазме человека для субстанции DD217 наступает с концентрации в плазме 1,7 мкМ.

Полученные данные:

- концентрация DD217 в человеческой плазме, при которой МНО увеличивалось в 2 раза по сравнению с контролем, составила  $0,09 \pm 0,02$  мкМ;
- концентрация DD217 в человеческой плазме, при которой анти-ФХа активность плазмы снижалась в 2 раза по сравнению с контролем -  $2,2 \pm 0,2$  мкМ;
- концентрация DD217  $\geq 1,7$  мкМ в плазме крови человека определяет терапевтический диапазон, когда анти-ФХа активность плазмы составляет более 0,3 ЕД.

Эти значения соответствуют уровню современных антикоагулянтов ингибиторов фактора Ха и даже несколько превосходят их, что позволяет рассматривать субстанцию DD217 как потенциальное лекарство - антикоагулянт.

### **3.2. Определение специфичности субстанции DD217 по отношению к основным ферментам системы свертывания крови и трипсину *in vitro***

Получены результаты измерения концентрации DD217, вызывающей 50% ингибирования реакции белка и хромогенного субстрата, а также отношение этих

концентраций к концентрации DD217, вызывающей 50% ингибирования реакции субстрата  $S_{2765}$  фактором Ха, представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Субстраты, концентрации 50% ингибирования белков субстанцией DD217, отношение концентраций 50% ингибирования основных ферментов системы свертывания крови к концентрации 50% ингибирования фактора Ха *in vitro*. Точность измерения - 20%. Количество измерений  $n=8$ .

Субстрат	Белок						
	FXa	Plasmin	FXIa	Protein C	A thrombin	Kallikrein	FXIIa
	$S_{2366}$	$S_{2251}$	$S_{2302}$	$S_{2366}$	$S_{2238}$	$S_{2302}$	$S_{2302}$
IC <sub>50</sub> , мкМ	$5 \cdot 10^{-4}$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>50$	$>10^3$	$>10^3$
IC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> FXa	1	$>10^6$	$>10^6$	$>10^6$	$>5 \cdot 10^4$	$>10^6$	$>10^6$

Т.о. DD217 избирательно ингибирует белок фактор Ха по отношению к основным ферментам системы свертывания крови *in vitro*, что является необходимым условием для рассмотрения субстанции DD217 в качестве потенциального лекарства-антикоагулянта.

### 3.3. Изучение фармакодинамических параметров субстанции DD217 при внутрижелудочном введении крысам

Установлено, что при внутрижелудочном введении DD217 крысам МНО увеличивалось, а затем, начиная с 4-10 часов до 24 ч после введения, МНО возвращалось к исходному значению. По сравнению с DD217, активность субстанции ривароксабан при одной и той же дозировке в начальный период была несколько выше, но затем уменьшалась быстрее, чем у DD217. Таким образом, интегральная эффективность DD217 вполне сопоставима с эффективностью субстанции ривароксабан. Данное влияние субстанции DD217 при внутрижелудочном введении крысам на ПВ (МНО) соответствует требованиям к периоду действия, предъявляемым к потенциальному лекарству-антикоагулянту с частотой приема 1-2 раза в сутки (рисунок 7-8).

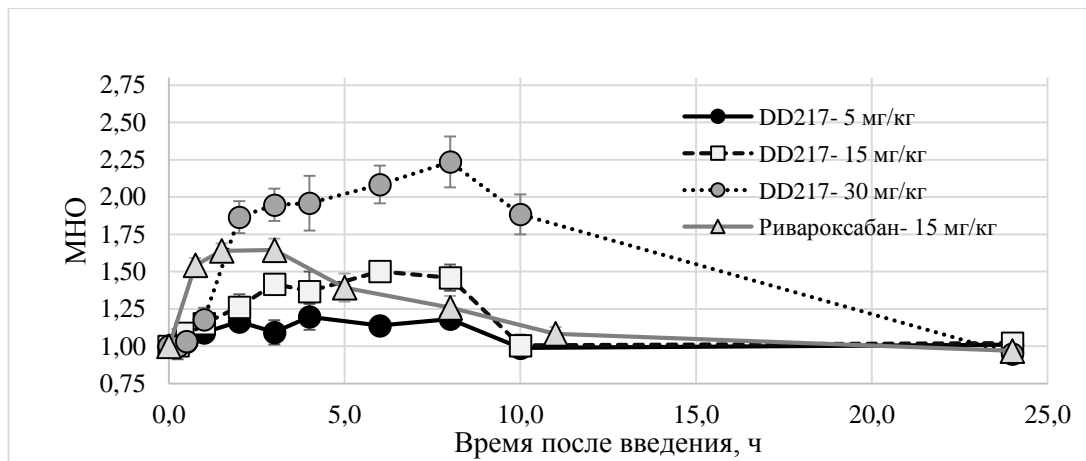


Рисунок 7. Сравнения влияния DD217 и субстанции ривароксабан при внутрижелудочном введении крысам на показания МНО. Количество животных для каждой точки n=8

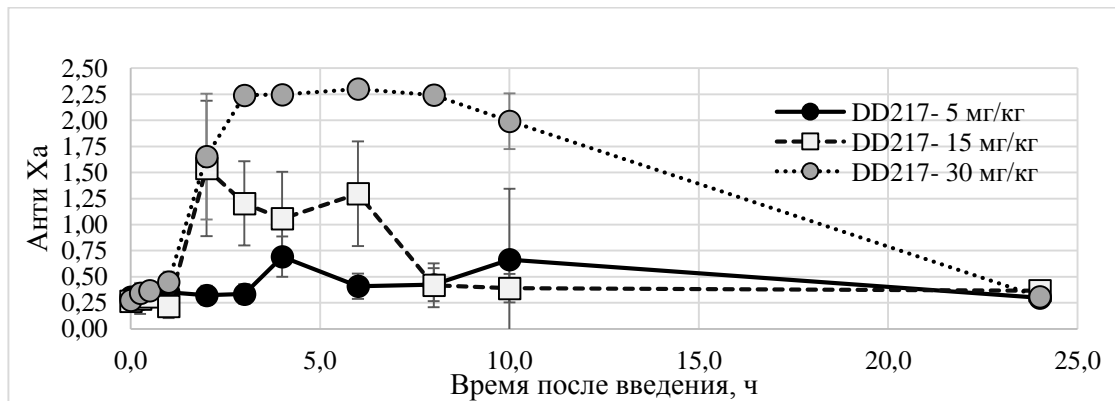


Рисунок 8. Влияние DD217 при внутрижелудочном введении крысам на анти-ФХа активность плазмы (в ОЕ анти-ФХа активности). Количество животных для каждой точки n=8

### 3.4. Изучение специфической фармакологической активности субстанции DD217 при внутрижелудочном введении на модели венозного тромбоза по Wessler S. у крыс

Для исследования антитромботической активности субстанции DD217 была использована модель венозного тромбоза по Wessler S. у крыс-самцов. Показано, что увеличение дозы субстанции DD217 от 0 до 50 мг/кг при внутрижелудочном введении крысам приводило к достоверному уменьшению размеров тромбов от  $3,2 \pm 0,4$  баллов ( $4,8 \pm 1,6$  мм<sup>3</sup>) до  $0,5 \pm 0,3$  баллов ( $0,20 \pm 0,16$  мм<sup>3</sup>). Это свидетельствует о высоком противотромботическом потенциале субстанции DD217, поскольку

DD217 при введении начиная с 20 мг/кг эффективно препятствовала развитию экспериментального венозного тромбоза у крыс (таблица 5).

Таблица 5 - Зависимости объема тромба и баллов тромба от дозы субстанции DD217 при внутрижелудочном введении крысам.

Доза DD217, мг/кг	Объём тромба, мм <sup>3</sup>	Баллы тромба
0	4,8±1,6	3,2±0,4
10	3,9±1,8	2,4±0,6
20	0,7±0,4	0,6±0,3
30	0,4±0,3	0,5±0,3
50	0,20±0,16	0,5±0,3

### 3.5. Результаты дополнительного исследования сравнительной активности метаболита

В отношении фактора свертываемости крови Ха тестируемое вещество DD217 показало концентрационно-зависимое ингибирование активности со следующими значениями IC<sub>50</sub>: для человеческого фактора 1.8±0.2 нМ, для крысиного 14±2 нМ. При этом метаболит DD217 в отношении факторов свертываемости крови Ха показал концентрационно-зависимое ингибирование активности со схожими значениями IC<sub>50</sub>: для человеческого фактора – 1.9±0.2 нМ, для крысиного – 10±2 нМ. Значения IC<sub>50</sub> ривароксабана, взятого в качестве референтного вещества, для человеческого фактора – 10±2 нМ, для крысиного – 14±2 нМ. Таким образом, вещество DD217 и его метаболит показали сопоставимую с ривароксабаном активность в отношении фактора свертываемости крови Ха крысы, и в несколько раз большую в отношении фактора свертываемости крови Ха человека.

Известно, что для ривароксабана K<sub>i</sub>=0.4 нМ. Тогда, по формуле имеем:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{S_0}{K_m}} \quad \text{и} \quad 1 + \frac{S_0}{K_m} = 25.$$

С учетом этого для человеческого фактора были посчитаны K<sub>i</sub>: для DD217 K<sub>i</sub>=0.07±0.02 нМ и для метаболита DD217 K<sub>i</sub>=0.08±0.02 нМ.

Исследование активности DD217 и его метаболита показало близкую и одинаково высокую способность обоих концентрационно-зависимо ингибировать фактор свертываемости крови Ха со значениями IC<sub>50</sub>, составляющими 14±2 нМ и 10±2 нМ, соответственно, в отношении фактора свертываемости крови Ха крысы и K<sub>i</sub> = 0.07±0.02 нМ и 0.08±0.02 нМ, соответственно, в отношении фактора свертываемости крови Ха человека. При этом, активность вещества DD217 и его метаболита была сопоставима с ривароксабаном в отношении фактора свертываемости крови Ха крысы (IC<sub>50</sub>=14±2 нМ), и в несколько раз больше в отношении фактора свертываемости крови Ха человека (K<sub>i</sub>=0.4±0.1 нМ).

### 3.6. Изучение прямой ингибиторной активности веществ *in vitro* по отношению к фактору Ха

Из зависимостей величины  $\frac{V_0}{V} - 1$  от концентрации исследуемого вещества, где V – начальная скорость реакции, V<sub>0</sub> - начальная скорость реакции в отсутствии ингибитора были получены концентрации, необходимые для 50% ингибирования активности IC<sub>50</sub> для субстанции DD217 и ривароксабан (таблица 6).

Таблица 6 - Концентрации 50% ингибирования активности. Количество измерений n=5.

Субстанция	IC <sub>50</sub> , нМ
DD217	0.4±0.15
Ривароксабан	0.4±0.15

Субстанция DD217 показала себя как сильный ингибитор белка фактор Ха, а следовательно, может рассматриваться как потенциальное лекарство антикоагулянт.

### 3.7. Результаты определения возможного влияния препарата на некоторые рецепторы, определяющие лекарственную зависимость

Проведено исследование влияния препарата на следующие мишени: hCB1 рецептор, hCB2 рецептор, опиоидный рецептор крысы, hD<sub>1</sub> и hD<sub>2s</sub> рецепторы, h5-

HT<sub>1A</sub> и h5-HT<sub>2A</sub> рецепторы, rNMDA рецептор и rGABA транспортёр, а также связывание вещества с hERG каналом в составе мембранной фракции.

Определены концентрации вещества, существенно влияющие на связывание лигандов с соответствующими рецепторами и работу калиевого канала (ингибирование >50%). Значимые взаимодействия (ингибирование >50%) перечислены в таблице 10.

Таблица 10 - Значимые взаимодействия препарата DD217 с проанализированными мишенями.

Мишень	IC <sub>50</sub> , мкМ
Опиоидные рецепторы (r)	12±2
Дофаминовый рецептор D <sub>1</sub> (h)	33±2
Дофаминовый рецептор D <sub>2S</sub> (h)	78±4
Серотониновый рецептор 5-HT <sub>2A</sub> (h)	40±3
Ионный канал hERG (hERG-CHO)	6.0±0.3

## ВЫВОДЫ

1. Проведено моделирование структуры потенциального ингибитора DD217 в пространстве, покрытом патентной формулой с использованием текстовой нотации для структур SMILES. Найдены вещества-кандидаты, обладающие антикоагулянтными свойствами.
2. Реакцией амидирования синтезированы 18 новых структурных аналогов вещества DD217, диамидов различного строения (мочевин и амидинов).
3. При фармакологическом скрининге синтезированных соединений выявлены наиболее перспективные антитромботические препараты. Изучена активность этих веществ *in vitro* по отношению к ФХа и определена концентрация, удваивающая время свертывания на плазме человека.
4. На основании полученных результатов и физических свойств выбраны 7 веществ, кандидатов на соединение-лидер и исследована их антикоагулянтная активность в опытах на кроликах и крысах.



5. Показано, что соединение N-(5-хлорпиридин-2-ил)-2-({4-[этанимидоил(метил)амино]-бензоил}амино)-5-метилбензамида (DD217) является наиболее перспективным в качестве потенциального лекарственного препарата для профилактики тромбоемболических осложнений.
6. Исследовано влияние DD217 на протромбиновое время и амидолитическую активность в плазме крыс, обезьян и человека.
7. Определены концентрации DD217, удваивающие ПВ и уменьшающие в 2 раза активность фактора Ха.
8. Измерены IC50 (концентрации 50% ингибирования белков веществом DD217) по отношению к основным ферментам системы свертывания крови - Plasmin, фактор XIa, Protein C, Kallikrein и фактор XIIa. Показано, что DD217 избирательно ингибирует белок фактор Ха (отношение не менее 50000).
9. Исследована специфическая фармактивность DD217 при внутрижелудочном введении на модели венозного тромбоза по Wessler S. у крыс.
10. Изучены фармакодинамические параметры субстанции DD217 при внутрижелудочном введении крысам.
11. Антикоагулянтная активность соединения DD217 является дозозависимой. Эффективность антикоагулянтного действия соединения зависит от его концентрации в плазме крови. Соединение DD217 препятствует развитию тромбоза, вызванного внутривенным введением тромбина. Его антитромботическая активность сопоставима с действием ривароксабана.
12. Впервые синтезированы и охарактеризованы физико-химическими методами новые производные (метаболиты) N-(5-хлорпиридин-2-ил)-2-({4-[этанимидоил(метил)амино]бензоил}амино)-5-метилбензамида.
13. Впервые изучена специфическая фармакологическая активность метаболита DD217 in vitro.
14. Установлено, что исследованный метаболит N-(5-хлорпиридин-2-ил)-2-({4-[этанимидоил(метил)амино]бензоил}амино)-5-метилбензамида проявляет ингибирующую активность по отношению к фактору Ха на уровне исходного вещества DD217.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи и патенты

1. Dmitry N. Tarasov, Dmitry G. Tovbin, Dmitry V. Malakhov, Natalia A. Tserkovnikova and others. The Development of New Factor Xa Inhibitors Based on Amide Synthesis//Current Drug Discovery Technologies. – 2018. - V.15. – p.335-350.
2. Тарасов Д.Н., Товбин Д.Г. Церковникова Н.А., Савченко А.Ю. Новые амидины - ингибиторы фактора Ха. – Евразийский патент №032764. – 31.07.2019.
3. Dmitry G. Tovbin, Dmitry N. Tarasov, Dmitry V. Malakhov, Natalia A. Tserkovnikova The development of new low-molecular-weight factor Xa inhibitors that are potential anticoagulants// Current Drug Discovery Technologies. – V.18. - 2021. – doi: 10.2174/1568009621666210224104940.

### Тезисы докладов конференций

1. Товбин Д.Г., Тарасов Д.Н., Напалков Д.А., Церковникова Н.А. Клиническое исследование II фазы инновационного DD217, прямого ингибитора фактора ХА /5 Международный форум антикоагулянтной + антиагрегантной терапии (ФАКТplus2020). –М. - 19-21 марта 2020. – с. 12.
2. Церковникова Н.А., Товбин Д.Г., Тарасов Д.Н., Малахов Д.В. Определение *in vitro* активности нового ингибитора фактора Ха – субстанции DD217 в плазме человека и крысы / I Международная научно-практическая конференции «Медико-биологические и нутрициологические аспекты здоровьесберегающих технологий. – Кемерово. - 27 ноября 2020. – с. 127-130.