

*На правах рукописи*



**ГРИГОРКЕВИЧ ОКСАНА СЕРГЕЕВНА**

**ДИЗАЙН, СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ  
АКТИВНОСТИ ОРИГИНАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ МАТРИКСНЫХ  
МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ 2-ГО И 9-ГО ТИПОВ**

3.3.6. – фармакология, клиническая фармакология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2025 г.

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»

**Научный  
руководитель:**

**Гудашева Татьяна Александровна**

доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», руководитель отдела химии лекарственных средств

**Официальные  
оппоненты:**

**Щулькин Алексей Владимирович**

доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры фармакологии

**Каршиева Саида Шамильевна**

кандидат биологических наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, старший научный сотрудник лаборатории биохимических основ фармакологии и опухолевых моделей

**Ведущая  
организация:**

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы"

Защита диссертации состоится « 23 » декабря 2025 года в 15:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.183.02 на базе федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» Министерства образования и науки Российской Федерации (125315, Москва, Балтийская ул. д.8).

Отзывы на автореферат направлять по адресу: 125315, Москва, Балтийская ул. д.8, ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий».

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» по адресу: 125315, Москва, Балтийская ул. д.8 и на сайте [www.academpharm.ru](http://www.academpharm.ru).

Автореферат разослан «    »        2025 г.

**Ученый секретарь  
диссертационного совета 24.1.183.02**  
кандидат биологических наук



**Васильева Екатерина Валерьевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность.** По данным ВОЗ онкологические (рак трахеи, легких и др.) и сердечно-сосудистые (ИБС, инсульт) заболевания относятся к основным причинам смерти в мире (URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>). Одним из перспективных способов борьбы с этими заболеваниями является применение ингибиторов матриксных металлопротеиназ (ММП).

Матриксные металлопротеиназы — это семейство цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать основные белковые компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ), который участвует во многих физиологических процессах в организме (Cabral-Pacheco G.A. et al. // *Int. J. Mol. Sci.* **2020**. V. 21. P. 9739-9793). Существует более 20-и ММП, среди которых самыми изученными являются желатиназы (ММП-2 и ММП-9). В организме они синтезируются в про-форме (про-ММП) и активируются при воспалении и окислительном стрессе до ММП (Nissinen L. et al. // *BBA*. **2014**. V. 1840. No. 8. P. 2571-2580). Это оказывает пагубное воздействие на белковые компоненты ВКМ (например, коллаген, ламинин и др.), что приводит к развитию ряда патологических процессов, включая онкологические, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания (Рогова Л.Н. и др. // *ВНМТ*. **2011**. Т. 18. № 2. С. 86-89). Исследования по поиску ингибиторов ММП-2 и ММП-9 и их разработке для последующего внедрения в практику проводятся за рубежом научными группами как фармацевтических компаний (ECOG, Procter and Gamble и др.), так и научно-исследовательских институтов (National Cancer Institute (NCI) и др.). В РФ изучением ММП и их ингибиторов занимаются научные группы в МГУ им. М.В. Ломоносова (Ivanov V. et al. // *Arab. J. Chem.* **2022**. V. 15. P. 103492), ИБМХ им. В.Н. Ореховича (Соловьева Н.И. и др. // *Биомедицинская химия*. **2015**. Т. 61. № 6. С. 694-704), НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (Герштейн Е.С. и др. // *Альманах клинической медицины*. **2017**. Т. 45. № 2. С. 94–101), ФИЦ ПХФ и МХ (Терентьев А.А. и др. // *Материалы 6-ой Российской конференции по медицинской химии, приуроченной к празднованию 300-летия Российской академии Наук*. **2024**. С. 44), ВолГМУ (Тихаева К.Ю. и др. // *Проблемы репродукции*. **2020**. Т. 26. № 4. С. 22–29) и др.

Антибиотик тетрациклинового ряда, доксициклин (Periostat®, CollaGenex Pharmaceuticals Inc., США), является единственным ингибитором ММП, одобренным для клинического применения для лечения парадонтоза (Lindsey M.L. et al. // *Global J. Anat. Phys. Res.* **2014**. V. 1. No. 1. P. 6-9). Кроме того, в настоящее время доксициклин находится на II стадии клинических исследований (University of Alberta, Канада) как препарат для защиты сердца пациентов, перенесших сердечный приступ (ClinicalTrials.gov ID: NCT03508232). Помимо доксициклина есть еще ряд ингибиторов ММП, которые дошли до стадии клинических исследований. Так, для пептидного ингибитора желатиназ маримастата (рисунок 1) были проведены клинические испытания в качестве препарата для лечения рака

легких и молочной железы (Pfizer, США) (Wojtowicz-Praga S.M. et al. // *IND*. 1997. V. 15. P. 61-75). Однако, на III фазе, из-за наличия побочных эффектов со стороны опорно-двигательного аппарата при длительном применении они были прерваны (Hidalgo M. et al. // *JNCI*. 2001. V. 93. No. 3. P. 178-193). Ингибитор ММП, соединение PG-116800 (рисунок 1) в 2004 году дошло до II фазы клинических исследований как препарат для профилактики ремоделирования левого желудочка сердца (Procter and Gamble, США). Из-за наличия побочных эффектов этот препарат также был снят с испытаний (Hudson M.P. et al. // *J Am Coll Cardiol*. 2006. V. 48. No. 1. P. 15-20.). Полусинтетическое соединение тетрациклинового ряда со свойствами ингибитора ММП под шифром COL-3 (NSC-683551) (рисунок 1), не обладающее антибактериальной активностью, дошло до II фазы клинических исследований (NCI, США) как препарат для лечения саркомы Капоши (Dezube B.J. et al. // *J. Cell. Physiol*. 2006. V. 209. No. 3. P. 659-662; Dezube B.J. et al. // *J. Clin. Oncol*. 2006. V. 24. No. 9. P. 1389-1394). За исключением доксициклина, ни один из ингибиторов ММП на данный момент не внедрен в клиническую практику. В связи с этим актуальным представляется создание и изучение фармакологических эффектов новых селективных ингибиторов ММП.

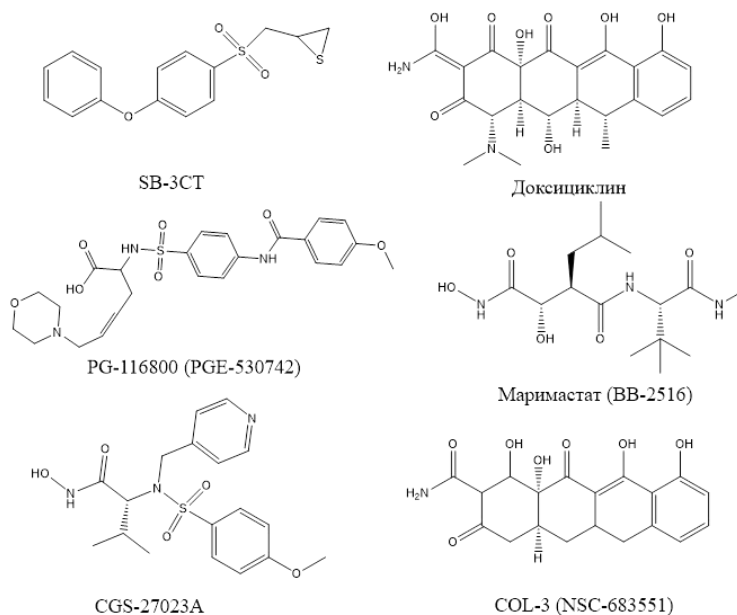


Рисунок 1 – Исследованные в клинике ингибиторы ММП

**Степень разработанности проблемы.** С 60-х годов XX века проводится поиск и изучение фармакологических свойств соединений, селективно блокирующих активность желатиназ. В 90-е годы на основании полученных с помощью рентгеноструктурного анализа 3D-структур ММП и структур полученных ранее ингибиторов были сформулированы структурные требования к ингибиторам ММП, в том числе и к ММП-2/-9 (Whittaker M. et al. // *Celltransmissions*. 2001. V. 17. No. 1. P. 3–14; Verma R.P. et al. // *Bioorg. Med. Chem*. 2007. No. 5. P. 2223-2268). Они включают в себя наличие цинк-связывающей группы, ароматических участков для  $\pi$ - $\pi$  взаимодействий и алифатических групп для гидрофобных взаимодействий.

На основании этих структурных требований за рубежом были получены новые ингибиторы ММП-2 и ММП-9.

Так, в 2000 г. Brown S. с соавт. описали новый ингибитор желатиназ, соединение SB-3CT (рисунок 1), которое ингибировало ММП-2 и ММП-9 с  $K_i$   $1,39 \cdot 10^{-8}$  М и  $60 \cdot 10^{-8}$  М соответственно (Brown S. et al. // *JACS*. **2000**. V. 122. P. 6799-6800) и защищало нейроны от апоптоза (Gu Z. et al. // *J. Neurosci*. **2005**. V. 25. No. 27. P. 6401-6408). Ингибитор SB-3CT в экспериментах у грызунов устранял неврологический дефицит после транзиторной очаговой ишемии и после эмболической очаговой ишемии головного мозга (Gu Z. et al. // *J. Neurosci*. **2005**. V. 25. No. 27. P. 6401-6408; Cui J. et al. // *Mol. Neurodegener*. **2012**. V. 7. P. 21-35; Sunny A. et al. // *Neurochem. Int*. **2024**. V. 172. P. 105642). На основании структурных требований к ингибиторам желатиназ в компании Procter and Gamble Pharmaceuticals получили производное сульфонида, PG-116800 (PGE-530742) ( $IC_{50}$ ММП-2  $5 \cdot 10^{-8}$  г/мл;  $IC_{50}$ ММП-9  $1,5 \cdot 10^{-9}$  г/мл), которое в экспериментах на животных уменьшало ремоделирование левого желудочка сердца после инфаркта миокарда (Yarbrough W.M. et al. // *Circulation*. **2003**. V. 108. P. 1753-1759). Другое производное сульфонида, соединение CGS-27023A (рисунок 1), обладающее сродством к ММП-2 и ММП-9 в наномолярных концентрациях, дошло до 1 фазы клинических исследований (Novartis, Швейцария) для лечения немелкоклеточного рака легкого (Levitt N.C. et al. // *Clin Cancer Res*. **2001**. V. 7. No. 7. P. 1912-1922).

Структурные требования к ингибиторам ММП-2 и ММП-9 стали основой для получения оригинальных селективных ингибиторов ММП-2 и ММП-9 в данной работе.

**Целью работы** является создание фармакологически перспективных селективных ингибиторов матриксных металлопротеиназ 2-го и 9-го типов.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Конструирование новых потенциальных ингибиторов ММП-2 и ММП-9 с использованием фармакофорных требований и метода молекулярного докинга.
2. Синтез сконструированных соединений методами классического органического синтеза.
3. Выявление ингибиторной активности синтезированных соединений *in vitro* с использованием рекомбинантных ММП-2 и ММП-9 человека.
4. Выявление в экспериментах *in vitro* нейропротекторной активности синтезированных ингибиторов ММП-2 и ММП-9 на модели окислительного стресса с использованием клеток линии НТ-22.
5. Выявление противоопухолевой и антиметастатической активностей у наиболее активных ингибиторов ММП-2 и ММП-9 на моделях эпидермоидной карциномы легкого Льюис (LLC) или аденокарциномы молочной железы Ca755.
6. Выявление и изучение кардиопротективного действия у активного представителя на модели острого инфаркта миокарда.

**Научная новизна.** Впервые получены 3 оригинальных относительно селективных ингибитора ММП-2, обладающих противоопухолевой и антиметастатической активностями с сопутствующими нейропротекторным и кардиопротективным действиями.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** С использованием структурных требований к ингибиторам ММП-2 и ММП-9 сконструированы новые ингибиторы желатиназ на основе *N*-замещенных- [бензоиламино(фенилсульфонил)]-циклических аминокислот. С помощью структур полученных ингибиторов была уточнена фармакофорная модель селективных ингибиторов ММП-2. Среди полученных ингибиторов выявлено соединение ГГМ-27, обладающее *in vitro* нейропротекторной и *in vivo* противоопухолевой активностями, а также соединение АЛ-828, обладающее нейропротекторной, антиметастатической и кардиопротекторной активностями. Полученные новые фармакологически активные соединения могут стать основой для создания соответствующих лекарственных препаратов.

**Методология и методы исследования.** В настоящей работе использована химико-фармакологическая методология с применением химических, фармакологических и биохимических методов исследования.

**Связь темы диссертации с научными планами института.** Диссертация выполнена в рамках темы FGFG-2022-0005 ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» «Создание новых химических структур – потенциальных лигандов фармакологических мишеней для лечения нервнопсихических и сердечно-сосудистых заболеваний» и проекта РФФИ № 18-015-00244 А «Дизайн и синтез новых ингибиторов матриксных металлопротеиназ 2 и 9 типа как основа для создания новых кардиопротекторных средств».

**Положения, выносимые на защиту.**

1. Получена новая группа ингибиторов ММП-2 и ММП-9, на основе *N*-замещенных- [бензоиламино(фенилсульфонил)]-циклических аминокислот.
2. Полученные ингибиторы обладают нейропротекторной, противоопухолевой и антиметастатической активностями.
3. Соединение АЛ-828, ингибитор ММП-2, не уступает по кардиопротективной активности доксициклину, ингибитору желатиназ, используемому в клинической практике.

**Степень достоверности.** Исследование выполнено на большом экспериментальном материале с использованием адекватных методических приёмов. Статистическая обработка полученных данных была проведена с привлечением соответствующих современных методов математической статистики.

**Апробация работы.** Основные результаты работы доложены на: V съезде фармакологов России Научные основы поиска и создания новых лекарств» (г. Ярославль,

2018 г.), 4-ой Российской конференции по медицинской химии МедХим-Россия 2019 (MedChem Russia 2019, (MCh2019), Екатеринбург, 2019), VI съезде фармакологов России «Смена поколений и сохранение традиций. Новые идеи – новые лекарства» (Клязьма, 2023), 6-ой Российской конференции по медицинской химии, приуроченной к празднованию 300-летия Российской академии Наук (Нижний Новгород, 2024), XIII Международная конференция молодых ученых по химии «МЕНДЕЛЕЕВ 2024» (XIII International Conference on Chemistry for Young Scientists "MENDELEEV 2024", Санкт-Петербург, 2024), Всероссийской студенческой научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения фармацевтических наук» (Рязань, 2025).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 7 статей, 5 из которых в периодических научных изданиях из списка ВАК; 3 патента на изобретение РФ; 7 тезисов устных и стендовых докладов на конференциях и съездах российского и международного уровней.

**Личный вклад.** Автор работы является основным исполнителем проведенного исследования на всех этапах: анализе данных литературы по теме диссертационной работы, проведении экспериментальной части исследования и анализе полученных результатов, проведении статистической обработки, формулировании выводов. При активном участии автора подготовлены публикации по результатам работы.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация содержит следующие разделы: введение; обзор литературы; материалы и методы; основные результаты и их обсуждение; заключение; выводы; библиографический указатель, включающий работы на русском (59) и иностранных (193) языках; 21 таблицу; 61 рисунок. Диссертация изложена на 159 страницах машинописного текста.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для молекулярного моделирования использовали известные структурные требования для ингибиторов ММП-2/-9 (*Whittaker M. et al., 2001*) и молекулярный докинг.

Молекулярный докинг проводили с помощью программы Glide версии 2022-4 build 134 от Schrödinger (*Schrödinger Release 2022-4: Maestro, version 13.5 [Электронный ресурс]. – LLC Schrödinger., - NY., 2022*).

Синтез сконструированных ингибиторов осуществляли методами классического органического синтеза в растворе. Структура подтверждалась методом ЯМР-спектроскопии (рабочая частота 300 МГц), хроматографическая гомогенность - методом тонкослойной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии, химическая чистота – данными элементного анализа и масс-спектрометрии.

Препараты и вещества, использованные при проведении исследований.

Для растворения соединений использовалась вода с сопротивлением 19 МОм·см, полученная на установке Милли-Q («Миллипор», США), или физиологический раствор

(ООО «Мосфарм», Россия), или 1%-ный водный Twin-80 («Merck», Германия), или 1%-ый водный крахмал.

Ингибиторный анализ проводили с использованием флуорогенного субстрата Mca-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH<sub>2</sub>·TFA («Sigma-Aldrich», США) и активных ММП-2 и ММП-9 человека («Calbiochem®», США).

Нейропротекторную активность определяли на клетках HT-22, для культивирования клеток использовали среду DMEM («HyClon», США), телячью эмбриональную сыворотку (FBS) («Invitrogen», США), L-глутамин («ICN», США). Для определения жизнеспособности клеток использовали 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) («Sigma», США), диметилсульфоксид (ООО ТД «Химмед», Россия).

Препараты сравнения: доксициклин (ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов», Республика Беларусь), доксорубин («Sandoz», Швейцария), гемцитабин в форме лиофилизата («Биокад», Россия).

Наркоз: уретан («Acros organics», Индия), эфир для наркоза стабилизированный (ООО «Кузбассоргхим», Россия).

Гистология: для фиксации использовали формалин 10% забуференный (ООО «Биовитрум», Россия), для гистологической проводки- раствор на основе изопропилового спирта IsoPrep («Эрго Продакшн», Россия), парафин («Leica Biosystems Richmond», США), галлоцианин-хромовые квасцы («Serva», Германия), 1% водный раствор эозина («Эрго Продакшн», Россия), набор для окраски по Ван-Гизону (пиркофуксин) 100 тестов/упак. («Эрго Продакшн», Россия), среда для заключения препаратов Leica CV Mount («Leica Biosystems», США).

Экспериментальные животные. В работе были использованы беспородные белые мыши-самцы, инбредные мыши-самцы и мыши-самки линии C57BL/6 и беспородные белые крысы-самцы. Животные были получены из сертифицированного питомника (филиал "Столовая" ФГБУН НЦБМТ ФМБА России) и содержались в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде и естественной смене светового режима. Эксперименты с животными проводили в соответствии с «Руководством по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований» (Приложение к Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 года № 33), межгосударственным стандартам серии «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» ГОСТ 33215-2014 и ГОСТ 33216-2014 (Приложение А к Европейской конвенции о защите Позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях (ETS N 123)). Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» (протокол № 05 от 05.03.2024 г.).



Общее количество животных, использованных в экспериментах, составило 360 мышей, 136 крыс.

Статистическая обработка. Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартного пакета программ OriginPro 8 (OriginLab, Corp., США), «Statistica 10.0» (Statsoft, Inc., США) и «GraphPad Prism 8» («Dotmatics», США). Нормальность распределения выборок проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка, а гомогенность дисперсий – по Левену. Использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA), а также непараметрические методы статистики – ранговый однофакторный критерий Краскела-Уоллиса, U-критерий Манна-Уитни и метод множественных сравнений по Ньюмену-Кейлсу, по Тьюки и по Даннету. Анализ выживаемости проводился с использованием метода Каплана-Майера, для оценки достоверности различий между кривыми выживаемости использовался F-критерий Кокса. Результаты МТТ-теста анализировали с помощью t-критерия Стьюдента. Полученные результаты описывали с помощью средних арифметических и их стандартных ошибок. Критический уровень значимости  $\alpha = 0,05$ .

### **Биохимические и фармакологические тесты**

Ингибиторная активность по отношению к ММП-2/-9 in vitro синтезированных соединений была определена флуориметрическим методом. Флуоресценцию регистрировали на микропланшетном ридере Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX при 37°C при длинах волн возбуждения и испускания 325 нм и 393 нм соответственно. (Faust, A. et al., 2008).

Нейропротекторная активность была изучена на модели окислительного стресса на культуре иммортализованных клеток гиппокампа мыши линии НТ-22 (Jackson G.R. et al., 1992). Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста (Ueda Y. et al., 1994). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре "Multiscan EX" («Thermo Scientific», Германия) при 600 нм.

Полулетальная доза синтезированных соединений была определена на беспородных мышах через 24 ч при внутрибрюшинном или интрагастральном введении.

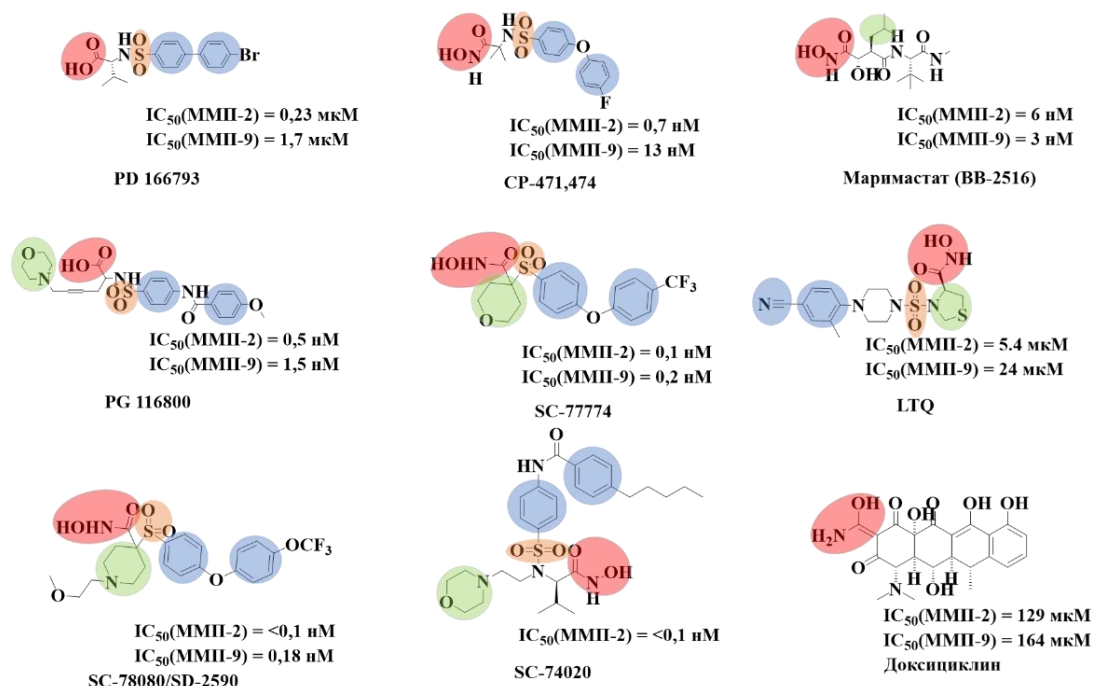
Противоопухолевая и антиметастатическая активности были изучены на мышах-самцах линии C57BL/6 на модели эпидермоидной карциномы легкого Льюис (LLC) ( $5 \times 10^6$  клеток) и на мышах-самках линии C57BL/6 на модели аденокарциномы молочной железы Са755 ( $1 \times 10^6$  клеток), согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под редакцией Миронова А.Н., Москва, 2012. сс. 642 –656. Использованные опухолевые клетки были получены из банка клеточных культур ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина".

Кардиопротективный эффект I(АЛ-828) был исследован на беспородных крысах-самцах на модели экспериментального инфаркта миокарда по методу А. Selye (Selye A.I. et al., 1960).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Конструирование потенциальных ингибиторов ММП-2 и ММП-9

На основании полученных с помощью рентгеноструктурного анализа 3D-структур ММП и структур описанных ингибиторов ММП-2 и ММП-9 (*Peterson T.J. et al., 2001*) (рисунок 2) были сформулированы структурные требования к ингибиторам желатиназ (*Whittaker M. et al., 2001*).



Примечание – Цинк-связывающая группа выделена красной окружностью; ароматическая группа - синей окружностью; гидрофобная группа - зеленой окружностью; SO<sub>2</sub>-группа – усиливает связывание водородными связями.

Рисунок 2 – Ингибиторы ММП-2 и ММП-9

Основным структурным требованием к ингибиторам ММП является наличие цинк-хелатирующей группы (гидроксаматная, сульфгидрильная, карбоксильная группа и др.) (*Whittaker M. et al., 2001*). Структурным требованием к селективным ингибиторам ММП-2 и ММП-9 является наличие группы для связывания с сайтом первичной специфичности (называемым S1' по номенклатуре Шехтера и Бергера) активного центра ферментов (*Whittaker M. et al., 2001*), так как именно сайт S1' в активном центре ММП-2 и ММП-9 по структуре отличается от соответствующих сайтов других ММП (*Pirad B. et al., 2006*). Для этого используют производные сульфонамида, содержащие биароматическую и/или амидную группы, а также тройную связь или тетразол (*Tamura Y. et al., 1998*). Следующим структурным требованием к селективным ингибиторам ММП-2 и ММП-9 является наличие циклического алифатического участка для связывания с S1-сайтом (*Pirad B. et al., 2006*). Сродство к желатиназам увеличивают amino- и карбонильная группы, способные образовывать прочные водородные связи с остатками аминокислот активного центра (*Whittaker M. et al., 2001; Yamamoto D. et al., 2009*).

На основании этих структурных требований к селективным ингибиторам желатиназ нами сконструированы их новые предполагаемые ингибиторы на основе *N*-замещенных-[бензоиламино(фенилсульфонил)]-циклических аминокислот (Григоркевич О.С. и др., 2018). Они содержат в себе необходимые структурные элементы для связывания с активным центром желатиназ (рисунок 3).

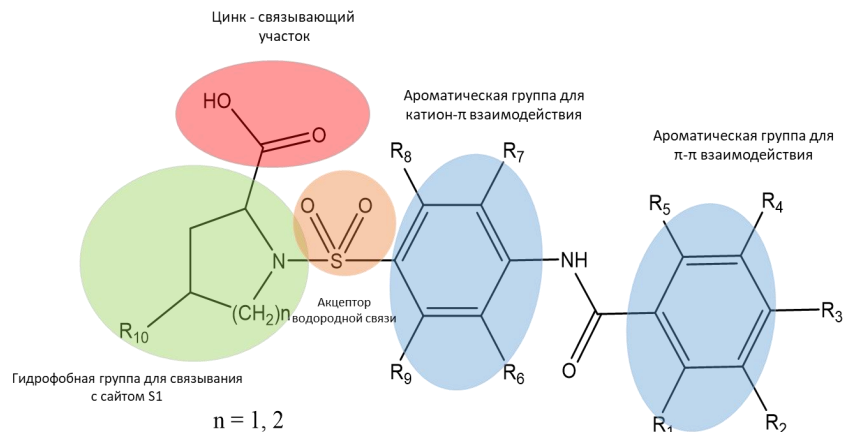


Рисунок 3 – Группа *N*-замещенных-[бензоиламино(фенилсульфонил)]-циклических аминокислот, возможных ингибиторов ММП-2 и ММП-9

Эта группа включала следующие соединения (рисунок 4):

- I(АЛ-828): 1-(4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил)сульфонил-L-пролин.
- II(МЛ-269): 1-(4-[(2-хлорбензоил)амино]фенил)сульфонил-L-пролин.
- III(КМ-29): 1-(4-[(4-фторбензоил)амино]фенил)сульфонил-L-пролин.
- IV(МЛ-292): 1-(4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил)сульфонил)-2-пиперидинкарбоновая кислота.
- V(МЛ-293): 1-(4-[(2-хлорбензоил)амино]фенил)сульфонил)-2-пиперидинкарбоновая кислота.
- VI(ГО-10): 1-(4-[4-хлорбензамино]-3,5-диметилфенил)сульфонил)-L-пролин.
- VII(ГО-47): 1-(4-[4-хлоробензамино]-3,5-диметилфенил)сульфонил)-пиперидин-2-карбоновая кислота.
- VIII(ГГМ-10): 1-(4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил)сульфонил)-(2*S*,4*R*)-4-гидрокси-пирролидин-2-карбоновая кислота.
- IX(ГГМ-14): 1-(4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил)сульфонил)-о-(*N*-метиламино)-бензойная кислота.
- X(ГГМ-27): 1-(4-[(2,4-дихлорбензоил)амино]фенил)сульфонил)-(2*S*,4*R*)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновая кислота.

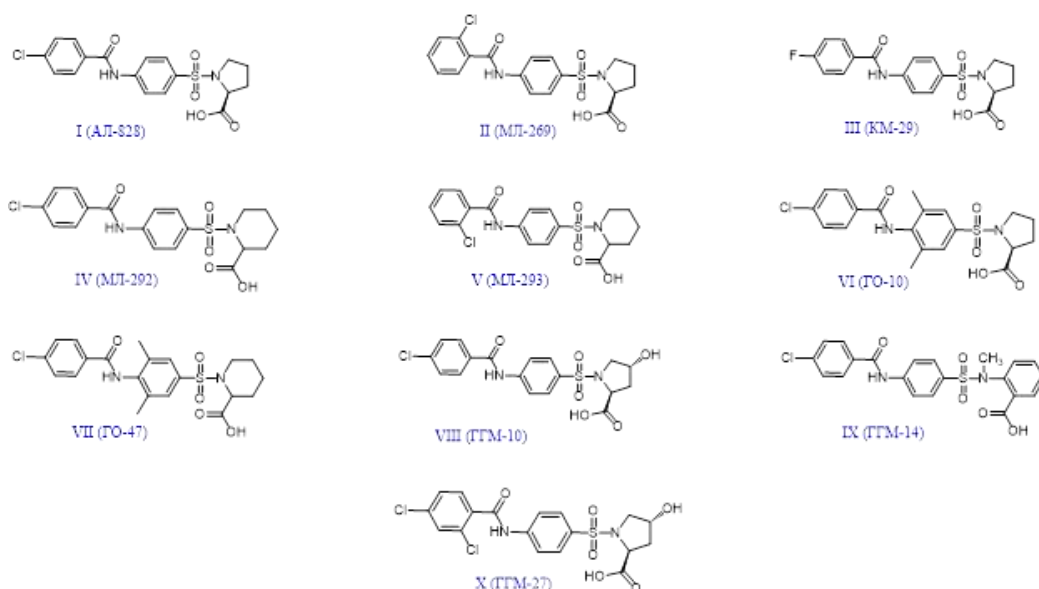


Рисунок 4 – Новые предполагаемые ингибиторы ММП-2 и ММП-9

### Молекулярный докинг

Для теоретической оценки предложенных соединений (рисунок 4) в качестве ингибиторов ММП-2 и ММП-9 нами проведен молекулярный докинг. Для калибровки были использованы ранее описанные ингибиторы желатиназ (рисунок 2).

Таблица 1 – Результаты молекулярной стыковки предложенных соединений в активные центры металлопротеиназ 2 и 9 в сравнении с известными ингибиторами желатиназ

Соединение	Функция DS	Соединение	Функция DS
1HOV (ММП-2)		5CUH (ММП-9)	
I(АЛ-828)	-9.888	I(АЛ-828)	-6.632
II (МЛ-269)	-9.013	II(МЛ-269)	-8.336
III(КМ-29)	-9.422	III(КМ-29)	-7.608
IV(МЛ-292)	-9.477	IV(МЛ-292)	-5.264
V(МЛ-293)	-8.986	V(МЛ-293)	-8.348
VI(ГО-10)	-9.557	VI(ГО-10)	-9.399
VII(ГО-47)	-9.573	VII(ГО-47)	-8.434
VIII(ГГМ-10)	-10.000	VIII(ГГМ-10)	-8.704
IX(ГГМ-14)	-9.425	IX(ГГМ-14)	-7.418
X(ГГМ-27)	-7.161	X(ГГМ-27)	-6.788
PG_116800	-10.418	PG_116800	-9.212
PD_166793	-9.672	PD_166793	-9.429
SC_77774	-9.818	SC_77774	-8.245
CP-471, 474	-9.601	CP-471,474	-8.146
LTQ	-9.598	LTQ	-8.887
SC-74020	-9,084	SC-74020	-6.862
Маримастат	-8.231	Маримастат	-6.674
Доксициклин	-5.479	Доксициклин	-2.128

Примечание: DS - Docking Score - оценочная функция энергии связывания фермент-ингибитор, рассчитано в Glide v8.1.

Как видно из таблицы 1 на основании значений величин оценочных функций, характеризующих энергию взаимодействия «лиганд-белок» (docking score),

сконструированные соединения (рисунок 4) соответствуют потенциальным ингибиторам ММП-2 и ММП-9.

### Синтез сконструированных ингибиторов

Сконструированные соединения были синтезированы по общей схеме (рисунок 5).

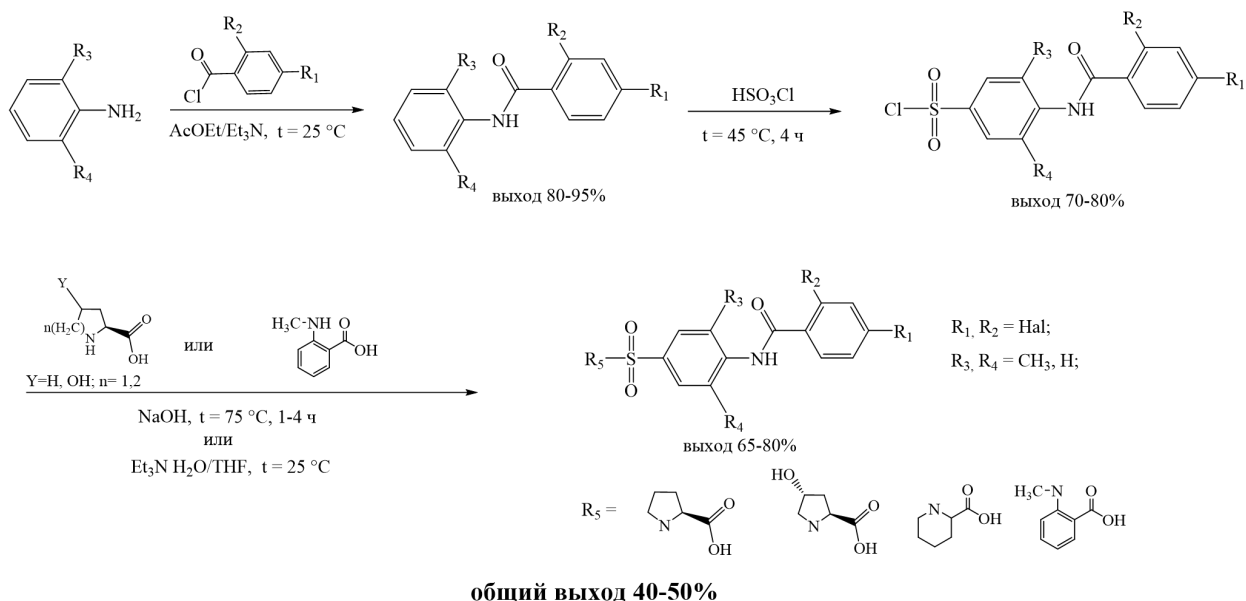


Рисунок 5 – Схема синтеза предполагаемых ингибиторов ММП-2 и ММП-9

### Выявление ингибиторной активности соединений АЛ-828, МЛ-269 и ГГМ-27 по отношению к ММП-2 и ММП-9<sup>1</sup>

С использованием флуорогенного субстрата Mca-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH<sub>2</sub>·TFA и активных рекомбинантных ММП-2 и ММП-9 человека были получены константы ингибирования (K<sub>i</sub>).

Для трех синтезированных соединений из десяти (соединения АЛ-828, МЛ-269 и ГГМ-27) было показано значимое ингибирование по отношению к желатиназам. Как видно из таблицы 2 все исследованные соединения можно отнести к селективным ингибиторам ММП-2. Соединение ГГМ-27 также проявляет ингибиторную активность и по отношению к ММП-9, но в концентрации на порядок выше, чем ММП-2. По ингибирующей активности по отношению к ММП-2 соединения АЛ-828, МЛ-269 и ГГМ-27 превосходят препарат сравнения доксициклин (таблица 2), и при этом селективнее его.

Таблица 2 – Ингибиторная активность по отношению к ММП-2 и ММП-9

Ингибитор	K <sub>i</sub> ММП-2, М	K <sub>i</sub> ММП-9, М
АЛ-828	4,5*10 <sup>-5</sup>	Не ингибирует
МЛ-269	8,25*10 <sup>-5</sup>	Не ингибирует
ГГМ-27	9,4*10 <sup>-5</sup>	9,0*10 <sup>-4</sup>
Доксициклин	лит: IC <sub>50</sub> = 1,29*10 <sup>-4</sup>	лит: IC <sub>50</sub> = 1,64*10 <sup>-4</sup>

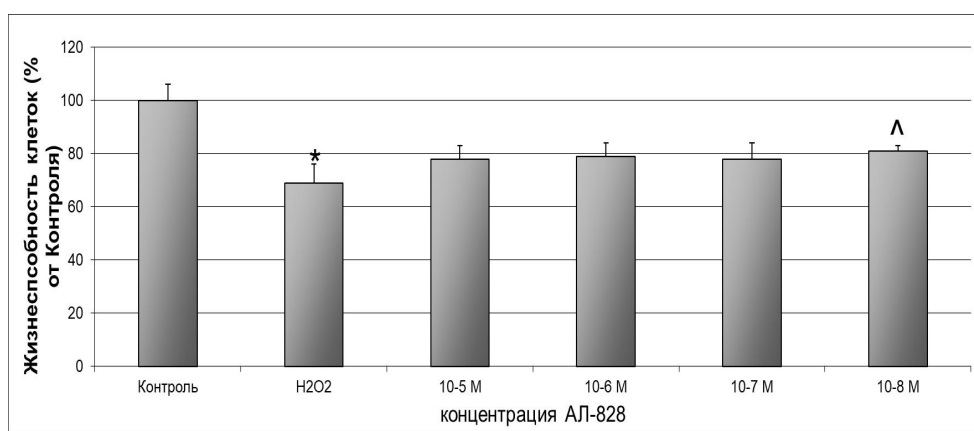
Примечание: константы ингибирования каждого ингибитора рассчитывали с помощью линейного регрессионного анализа по методу Диксона.

<sup>1</sup> Исследования по выявлению ингибиторной активности проводили совместно с лабораторией молекулярной фармакологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» под руководством к.б.н. Зайнуллиной Л.Ф.

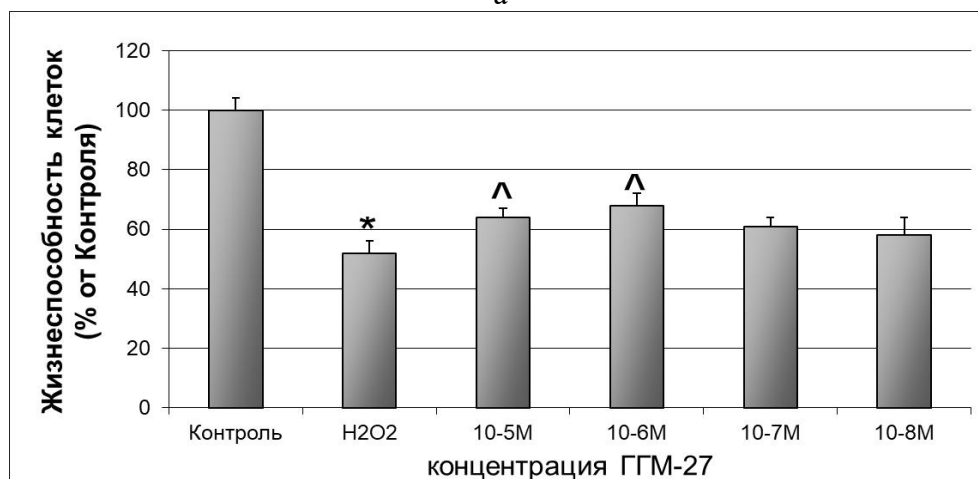
## Выявление нейропротекторной активности у АЛ-828 и ГГМ-27<sup>1</sup>

Хорошо известно вовлеченность ММП-2 и ММП-9 в патогенез нейродегенеративных заболеваний. С этими заболеваниями связано нарушение процесса ремоделирования соединительной ткани из-за повышенной неконтролируемой активности желатиназ, разрушающих внеклеточный матрикс, что приводит к увеличению проницаемости гематоэнцефалического барьера и повреждению миелинизированных нервных волокон (Yang Y. et al., 2015).

В связи с этим нами была изучена нейропротекторная активность ингибиторов на примере АЛ-828 и ГГМ-27. Исследование проводили на модели окислительного стресса на клетках линии НТ-22 (Jackson G.R. et al., 1992). Как видно из рисунка 6 оба соединения обладают нейропротекторной активностью при внесении за 24 ч до повреждения.



а



б

Примечание – \* -  $p < 0,05$  по критерию Краскела-Уоллеса относительно контроля без H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; <sup>Λ</sup> -  $p \leq 0,05$  по критерию Краскела-Уоллеса относительно H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Активность рассчитывали по формуле:  $A(\%) = (D_{\text{эксп}} - D_{\text{H}_2\text{O}_2}) / (D_{\text{контр}} - D_{\text{H}_2\text{O}_2}) \times 100\%$ , где D<sub>эксп</sub> – оптическое поглощение раствора в опыте, D<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> – оптическое поглощение раствора контроля (с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), D<sub>контр</sub> – оптическое поглощение пассивного контроля (без H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Рисунок 6 – Нейропротекторная активность АЛ-828-На (а) и ГГМ-27-На (б)

В проведенном эксперименте на модели окислительного стресса на клетках линии НТ-22 установлена нейропротекторная активность АЛ-828 в концентрации 10<sup>-8</sup> М.

<sup>1</sup> Исследования по выявлению нейропротекторной активности проводили совместно с лабораторией молекулярной фармакологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» (руководитель к.б.н. Зайнуллиной Л.Ф.) в группе фармакологии нейропротекции с н.с. С.В. Николаевым и в.н.с., к.б.н. Т.А. Антиповой

Зависимость данного эффекта от концентрации АЛ-828 описывается куполообразной кривой. Куполообразная кривая, которую еще называют гормезис (*hormesis*), является одной из основных характеристик биологических процессов (*Calabrese E.J., 2008*). Для ГГМ-27 нейропротекторная активность выявлена в концентрациях  $10^{-5}$ – $10^{-6}$  М. В данном случае наблюдается линейная зависимость «доза-эффект».

Исходя из литературных данных (*Nelson K.K. et. al., 2004*), можно предположить, что в клетках линии НТ-22 окислительный стресс мог привести к активации ММП-2, а соединения АЛ-828 и ГГМ-27, за счет ингибирования активной ММП-2, способствуют увеличению выживаемости нейронов.

### Определение полулетальной дозы <sup>1</sup>

Для соединений АЛ-828, МЛ-269 и ГГМ-27 была определена полулетальная доза (ЛД50) при в/б введении у мышей (таблица 3). Для соединения АЛ-828 ЛД50 была определена и при *p.o.* введении.

Таблица 3 – Определение ЛД50 соединений АЛ-828, МЛ-269 и ГГМ-27

	АЛ-828	МЛ-269	ГГМ-27	Доксициклин
ЛД50, мг/кг, в/б	399	955	1173 (самцы) 1125 (самки)	-
ЛД50, мг/кг, <i>p.o.</i>	> 2000	-	-	1870 <sup>^</sup>

Примечание: Расчет проводили по методу Литчфилда-Уилкоксона с доверительными 95% интервалами. <sup>^</sup> - в соответствии с литературными данными: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00254>.

Как видно из таблицы 3, заявляемые соединения относятся к IV классу токсичности, т.е. к малотоксичным веществам.

### Выявление антиметастатической и противоопухолевой активностей АЛ-828 и ГГМ-27<sup>2</sup>

ММП-2/-9 принимают участие в механизме опухолевой инвазии и ангиогенеза при опухолевом росте за счет способности разрушать базальную мембрану и компоненты ВКМ. В связи с этим соединения АЛ-828 и ГГМ-27, обладающие ингибиторной активностью по отношению к ММП-2, были изучены на наличие противоопухолевых и антиметастатических свойств.

#### Антиметастатическая активность АЛ-828 на модели карциномы легкого Льюис

<sup>1</sup> Исследования проводили совместно с лабораторией фармакологии кровообращения (заведующий лабораторией д.м.н. Крыжановским С.А.) ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» с в.н.с., д.б.н. Цориным И.Б., с.н.с., к.м.н. Столяруком В.Н., н.с., к.м.н. Барчуковым В.В., а также совместно с группой хронической токсичности лаборатории лекарственной токсикологии (заведующий лабораторией д.б.н., профессор РАН Колик Л.Г.) отдела лекарственной токсикологии (руководитель отдела д.м.н., профессор, академик РАН Дурнев А.Д.) ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» с с.н.с. Алексеевой С.В.

<sup>2</sup> Исследования по выявлению противоопухолевой и антиметастатической активности проводили совместно с группой иммунофармакологии лаборатории лекарственной токсикологии (заведующий лабораторией д.б.н., профессор РАН Колик Л.Г.) отдела лекарственной токсикологии (руководитель отдела д.м.н., профессор, академик РАН Дурнев А.Д.) ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» с в.н.с., д.б.н. Коваленко Л. П. и Журиковым Р. В.

При курсовом 14-ти дневном введении АЛ-828 в дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг, в/б достоверного торможения роста опухоли (ТРО) не выявлено. При введении на 2-е и 9-е сутки развития LLC препарата сравнения, гемцитабина, в дозе 50 мг/кг, в/б определено значимое ТРО. У всех животных группы активного контроля и групп животных-опухоленосителей, которым вводили АЛ-828 в дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг или гемцитабин в дозе 50 мг/кг, были выявлены метастазы (таблица 5).

Степень поражения легких метастазами у животных опытных групп была значимо менее выраженной по сравнению с животными-опухоленосителями группы активного контроля (таблица 4). Не выявлено значимого увеличения средней продолжительности жизни и медианы выживаемости у животных опытных групп по сравнению с активным контролем.

Таблица 4 – Оценка 14-и дневного введения АЛ-828 и двукратного введения гемцитабина на развитие процессов метастазирования у мышей C57BL/6 с LLC

Группы: n=10	Параметры метастазирования на 21 сутки развития LLC	
	Количество метастазов на 1 мышь (M±m)	ИИМ%^
Контроль	32,5±2,9	-
Гемцитабин 50 мг/кг, в/б, двукратно	9,0±1,5*	75,8
АЛ-828, 10 мг/кг, в/б	16,8±1,3*	48,3
АЛ-828, 30 мг/кг, в/б	19,8±1,0*	39,2

Примечание: \* -  $p < 0,05$  по критерию Тьюки, n – количество животных в группе. ^ - ИИМ – индекс ингибирования метастазирования, рассчитывали по формуле:  $\text{ИИМ} = \frac{(A_k \times B_k) - (A \times B)}{(A_k \times B_k)} \times 100\%$ , где  $A_k$  и  $A$  – частота метастазирования в легких у мышей контрольной группы и опытной;  $B_k$  и  $B$  – среднее число метастазов в легких в контрольной и опытной группах

Согласно полученным данным соединение АЛ-828 в дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг, в/б обладает антиметастатической активностью.

#### ***Противоопухолевая активность ГГМ-27 на модели аденокарциномы молочной железы Ca755***

При курсовом 14-ти дневном введении ГГМ-27 в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг, в/б, было определено достоверное ТРО на 9-е сутки развития опухоли, на 15-е сутки (1-й день после окончания введения ГГМ-27) и на 21-е сутки (через 7 дней после окончания введения препарата). При введении препарата сравнения, доксорубицина, в дозе 4 мг/кг, в/б на 2-е и 4-е сутки развития аденокарциномы Ca755 определено значимое ТРО на 9-е, 15-е и 21-е сутки развития опухоли (таблица 5).



Таблица 5 – Оценка 14-ти дневного введения ГГМ-27 и двукратного введения доксорубина на торможение роста опухоли самок мышей линии С57В1/6 с аденокарциномой Са755

Группы n=10	Средний объем опухоли, мм <sup>3</sup>			ТРО <sup>^</sup> на 15 сутки, %	ТРО <sup>^</sup> на 21 сутки, %
	9-е сутки	15-е сутки	21-е сутки		
Контроль	302,9±79,1	5353,8±930,9	10908,7±1307,8		
Доксорубин, 4 мг/кг, в/б, двукратно	7,5±6,2*	462,4±122,9*	2951,1±608,4*	91%	73%
ГГМ-27 1 мг/кг, в/б	90,8±50,4*	1278,5±303,7	4036,9±710,2*	76%	63%
ГГМ-27 10 мг/кг, в/б	84,5±56,34*	1528,7±371,6	4074,1±672,5*	71%	62%

Примечание: n – количество животных в группе; \* - p < 0,05 по сравнению с контрольной группой, критерий Краскела-Уоллеса. ^ - ТРО - торможение роста опухоли. Расчет объема опухоли проводили после измерения 3-х ее размеров по формуле: V= А x В x С; ТРО вычисляли по формуле ТРО%= (Vконтроля – Vопыта)/ Vконтроля x100%.

Согласно полученным данным, ГГМ-27 достоверно увеличивает среднюю продолжительность жизни (УПЖ) мышей в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг (таблица 6).

Таблица 6 – Оценка влияния 14-ти дневного введения ГГМ-27 и двукратного введения доксорубина на выживаемость самок мышей линии С57В1/6 с аденокарциномой Са755

Группы, n=10	Средняя продолжительность жизни, сутки	УПЖ <sup>^</sup> , %
Контроль	19,0	
Доксорубин 4 мг/кг, в/б, двукратно	30,0*	58
ГГМ-27 1 мг/кг, в/б	27,5*	45
ГГМ-27 10 мг/кг, в/б	28,0*	47

Примечания: n – количество животных в группе; \* - p < 0,05 по сравнению с контролем по F-тесту Кокса.  
^ - УЖП - увеличение средней продолжительности жизни.

Медиана выживаемости по методу Каплан-Мейера у животных активного контроля составила 18,0 дней, при введении доксорубина – 31,0 дня. При введении ГГМ-27 в дозе 1 мг/кг медиана выживаемости составила 28,5 дней, а при введении ГГМ-27 в дозе 10 мг/кг – 25,5 дней. Полученные данные указывают на выраженную противоопухолевую активность ГГМ-27 при его 14-ти дневном введении в дозе 1 мг/кг и перспективность дальнейшего изучения противоопухолевых свойств ГГМ-27 в других моделях.

### Кардиопротективный эффект АЛ-828 на модели экспериментального инфаркта миокарда<sup>1</sup>

Активность ММП-2 и ММП-9 играет главную роль в нежелательных изменениях тканей сердечно-сосудистой системы, и от уровня их активности в ишемизированном

<sup>1</sup> Исследования по изучению кардиопротективного эффекта проводили совместно с лабораторией фармакологии кровообращения (заведующий лабораторией д.м.н. Крыжановским С.А.) ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» с в.н.с., д.б.н. Цориным И.Б., н.с., к.м.н. Барчуковым В.В., а также совместно с группой морфологии лаборатории лекарственной токсикологии (заведующий лабораторией д.б.н., профессор РАН Колик Л.Г.) отдела лекарственной токсикологии (руководитель отдела д.м.н., профессор, академик РАН Дурнев А.Д.) ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» с с.н.с., к.б.н. Мирошкиной И.А., в.н.с., к.б.н. Сорокиной А.В.

миокарде во многом зависит прогноз раннего постинфарктного ремоделирования сердца (Simova J. et al., 2013).

Гиперэкспрессия ММП-2 и ММП-9 с последующей активацией влияет на ремоделирование легочных артерий при патологии легочной артериальной гипертензии (ЛАГ). Известно, что ЛАГ может привести к формированию правожелудочковой сердечной недостаточности (Liua Y. et. al., 2018). Гипоксия играет достаточно важную роль в патогенезе развития ЛАГ. В работе Liua Y. И др. в экспериментах *in vitro* и *in vivo* показано, что гипоксия увеличивает экспрессию ММП-2 и ММП-9 в эндотелии легочной артерии (Liua Y. et. al., 2018). В связи с этим, в предварительном эксперименте для соединения АЛ-828 в дозе 0,01 мг/кг, в/б был выявлен антигипоксический эффект на модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией у мышей (Григоркевич О.С. и др., 2022).

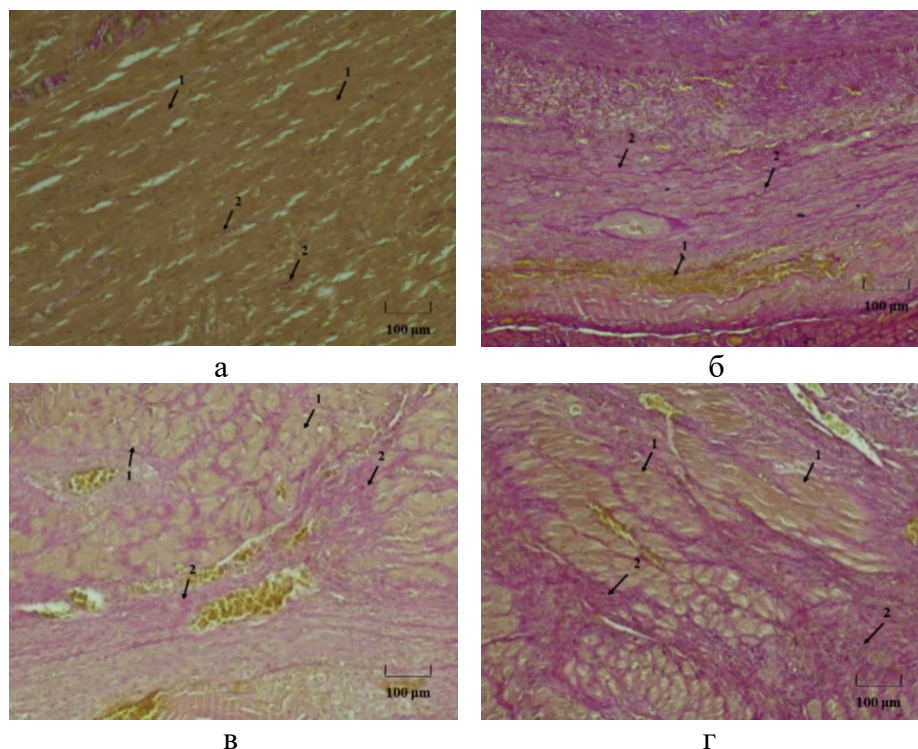
Кардиопротективная активность соединения АЛ-828 была изучена в эксперименте, воспроизводящем влияние курсовой терапии на размер экспериментального инфаркта миокарда (ИМ).

Соединение АЛ-828 вводили крысам *p.o.* 1 раз в сутки за 3 дня до ИМ и с 1-го по 7-й день после ИМ в дозе 30 мг/кг. В качестве препарата сравнения использовали доксициклин, который вводили по аналогичной схеме в дозе 40 мг/кг/сут, *p.o.*

Результаты патологоанатомического вскрытия свидетельствуют о том, что как у контрольных животных, так и у животных, получавших доксициклин и АЛ-828, в отличие от ложнооперированных, форма сердца близка к шаровидной, а ниже места перевязки левой коронарной артерии на передней стенке ЛЖ визуализируется зона некроза, имеющая неправильную форму и сероватый оттенок.

Согласно данным морфометрии у животных, получавших АЛ-828, площадь инфаркта (ПИ), по сравнению с контролем, статистически значимо ( $p < 0,0001$ ) меньше  $-3,84 \pm 0,44$  мм<sup>2</sup> и  $8,16 \pm 0,55$  мм<sup>2</sup> соответственно. Доксициклин также статистически значимо ( $p < 0,0001$ ) уменьшал ПИ–  $4,30 \pm 0,36$  мм<sup>2</sup> и  $8,16 \pm 0,55$  мм<sup>2</sup> соответственно. У животных, получавших АЛ-828 и доксициклин площадь условно-интактного миокарда статистически больше ( $p = 0,0041$  и  $p = 0,0062$  соответственно). Дилатация полости ЛЖ и истончение его стенок у животных, получавших АЛ-828 и доксициклин менее выражены, чем у контрольных крыс с ИМ.

Согласно данным гистологических исследований у животных, получавших соединение АЛ-828 и доксициклин, в очаге некроза менее выражена воспалительная инфильтрация, чем у крыс контрольной группы. При окраске по Ван-Гизону визуализируется большее количество клеток сердечной мышцы, окрашенных в желтый цвет, а также меньшее количество волокон соединительной ткани, окрашенных пикрофуксином в малиновый цвет (рисунок 7).



Примечание: 1- мышечная ткань; 2 – соединительная ткань; Увеличение x 100. ИМ – инфаркт миокарда. Рисунок 7 – Микрофотография зоны некроза сердечной мышцы крысы ложнооперированной (а) и контрольной (б) группы, группы получавшей АЛ-828+ИМ (в) и группы получавшей доксициклин+ИМ (г). Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону

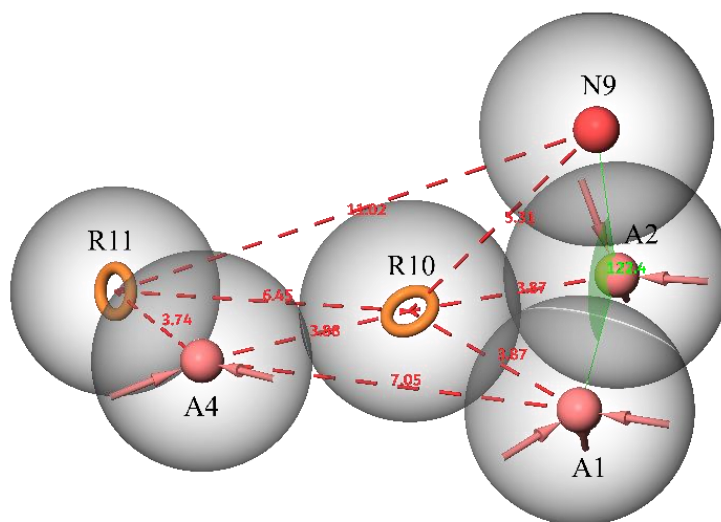
Согласно результатам исследований, курсовая терапия соединением АЛ-828 способствует значительному уменьшению площади ИМ и препятствует развитию раннего постинфарктного ремоделирования. По своей кардиопротективной активности соединение АЛ-828, не уступает препарату сравнения – доксициклину.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании структурных требований к селективным ингибиторам желатиназ была получена новая группа соединений на основе *N*-замещенных-[бензоиламино(фенилсульфонил)]-циклических аминокислот. Их структура в качестве ингибиторов ММП-2 и ММП-9 была подтверждена методом молекулярного докинга. Сконструированные соединения I(АЛ-828), II(МЛ-269), III(КМ-29), IV(МЛ-292), V(МЛ-293), VI(ГО-10), VII(ГО-47), VIII(ГГМ-10), IX(ГГМ-14), X(ГГМ-27) были синтезированы по универсальной высокотехнологичной методике в 3 стадии с общим выходом около 50%. В дальнейшем разработанная схема может быть внедрена с целью получения фармацевтической субстанции.

В эксперименте *in vitro* показана селективная ингибирующая активность по отношению к ММП-2 для соединений АЛ-828, МЛ-269. Для соединения ГГМ-27 выявлена ингибирующая активность как по отношению к ММП-2, так и к ММП-9, но в концентрации на порядок больше.

На основании структур полученных ингибиторов была уточнена фармакофорная модель селективных ингибиторов ММП-2 (рисунок 8).



Примечание: R10 - ароматическое кольцо для катион-π взаимодействия; R11 - ароматическое кольцо для π-π взаимодействия; A1, A2, A4 - акцептор водородной связи; N9 – отрицательный заряд. Расстояние выражено в ангстремах (Å), угол – в градусах.

Рисунок 8 – Фармакофорная модель селективных ингибиторов ММП-2

На примере АЛ-828 и ГГМ-27 выявлена нейропротекторная активность полученных ингибиторов в условиях окислительного стресса на клетках линии НТ-22.

Для ингибитора ММП-2, соединения АЛ-828, была показана антиметастатическая активность на модели эпидермоидной карциномы легкого Льюис. Для ингибитора ММП-2 и ММП-9, соединения ГГМ-27, была показана противоопухолевая активность и достоверное увеличение средней продолжительности жизни животных на модели аденокарциномы молочной железы Са755. При этом АЛ-828 и ГГМ-27 относятся к малотоксичным соединениям.

В эксперименте по изучению влияния курсовой терапии на размер экспериментального инфаркта миокарда выявлено, что АЛ-828 более чем в 2 раза уменьшает площадь инфаркта по сравнению с контролем, также уменьшает интенсивность ремоделирования миокарда и поддерживает его инотропную функцию в острейшую фазу инфаркта миокарда. В проведенных экспериментах по изучению кардиопротективного действия было показано, что соединение АЛ-828 у интактных животных не оказывает влияния на величину артериального и венозного давления, на структуру электрокардиографии и вариабельность ритма сердца. При этом АЛ-828 обладает способностью уменьшать содержание как ММП-2, так и ММП-9 в плазме крови крыс с острым инфарктом миокарда. Для соединения АЛ-828 также показана антигипоксическая активность на модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией.

Таким образом было выявлено и изучено кардиопротективное действие ингибитора ММП-2, соединения АЛ-828.

Следует отметить, что дошедшие до клинических исследований ингибиторы ММП обладают высоким сродством как к желатиназам, так и к другим ММП, таким как ММП -1, -3, -7, -8, за счет чего предположительно возникают побочные эффекты в виде скелетно-

мышечной боли. Наши ингибиторы являются относительно селективными к ММП-2, что позволяет ожидать от них отсутствие побочных эффектов. В связи с этим они могут стать более перспективной основой для создания лекарственных средств.

### ВЫВОДЫ

1. С применением метода молекулярного моделирования и с использованием известных структурных требований для ингибиторов ММП-2/-9 и молекулярного докинга сконструированы оригинальные ингибиторы ММП 2 и ММП 9 на основе N-замещенных-[бензоиламино(фенилсульфонил)]-циклических аминокислот.
2. Разработана высокотехнологичная общая схема синтеза получения сконструированных ингибиторов, с использованием которой наработано 10 соединений.
3. Для трех соединений из десяти была показана ингибирующая активность по отношению к ММП-2 и ММП-9. С использованием флуорогенного субстрата Mca-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH<sub>2</sub> и рекомбинантных ММП-2 и ММП-9 человека для соединений АЛ-828 ( $K_{i\text{ММП-2}} 4,5 \times 10^{-5}\text{М}$ ) и МЛ-269 ( $K_{i\text{ММП-2}} 8,25 \times 10^{-5}\text{М}$ ) определены константы ингибирования по отношению к ММП-2. Для соединения ГГМ-27 была выявлена ингибирующая активность как по отношению к ММП-2 ( $K_{i\text{ММП-2}} 9,4 \times 10^{-5}\text{М}$ ), так и к ММП-9 ( $K_{i\text{ММП-9}} 9 \times 10^{-4}\text{М}$ ).
4. Для соединений АЛ-828 и ГГМ-27 установлена нейропротекторная активность на модели окислительного стресса с использованием клеток НТ-22 в концентрациях  $10^{-8}$  М и  $10^{-5}$ – $10^{-6}$  М соответственно.
5. Для соединения АЛ-828 в дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг, в/б установлена антиметастатическая активность на модели эпидермоидной карциномы легкого Льюис у мышей С57BL/6. Для соединения ГГМ-27 в дозах 1 и 10 мг/кг, в/б установлена противоопухолевая активность на модели аденокарциномы молочной железы Ca755 у самок мышей линии С57BL/6. Оба соединения являются малотоксичными: ЛД<sub>50</sub>(АЛ-828) = 399 мг/кг в/б, ЛД<sub>50</sub>(АЛ-828) > 2000 мг/кг *p.o.*; ЛД<sub>50</sub>(ГГМ-27) = 1173 мг/кг в/б (самцы) и 1125 мг/кг в/б (самки).
6. Для соединения АЛ-828 при субхроническом введении в дозе 30 мг/кг/сут, *p.o.* в модельных экспериментах, воспроизводящих острый инфаркт миокарда у крыс, установлена кардиопротективная активность, а также показано достоверное уменьшение содержания ММП-2 и ММП-9 в плазме крови крыс с острым инфарктом миокарда. По своей активности АЛ-828 не уступает препарату сравнения – доксициклину.

### Практические рекомендации

Рекомендуется расширенное изучение фармакологических эффектов ингибиторов ММП-2/-9, соединений ГГМ-27 и АЛ-828, как потенциальных препаратов, полезных для лечения онкологических или сердечно-сосудистых заболеваний.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи

1. Крыжановский, С.А. Поиск селективных блокаторов цинк-зависимых металлопротеиназ 2-го и 9-го типа в ряду бензоиламино(фенилсульфонил)-замещённых циклических аминокислот [Текст] / С.А. Крыжановский, Г.В. Мокров, **О.С. Григоркевич**, И.Б. Цорин, В.Н. Столярук, М.Б. Вититнова, А.М. Лихошерстов, Т.А. Гудашева // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2016. – №3. – С. 3-8.
2. **Григоркевич, О.С.** Дизайн, синтез и фармакологическая активность нового ингибитора матричной металлопротеиназы-9 [Текст] / **О.С. Григоркевич**, Г.В. Мокров, А.С. Дябина, В.Н. Столярук, И.Б. Цорин, Е.О. ИONOва, С.А. Крыжановский, Т.А. Гудашева, А.Д. Дурнев // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52. – № 1. – С. 8-14.
3. **Григоркевич, О.С.** Матричные металлопротеиназы и их ингибиторы [Текст] / **О.С. Григоркевич**, Г.В. Мокров, Л.Ю. Косова // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2019. – №2. – С. 3-16.
4. **Григоркевич, О.С.** Поиск селективных ингибиторов матричной металлопротеиназы 2-го типа в ряду производных бензоиламино(фенилсульфонил)-замещённых циклических аминокислот [Текст] / **О.С. Григоркевич**, Г.В. Мокров, Н.Н. Золотов, В.В. Барчуков, С.А. Крыжановский, Т.А. Гудашева // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2020. – Т. 23. – № 11. – С. 22-27.
5. **Григоркевич, О.С.** Антигипоксическая активность ингибитора матричной металлопротеиназы 2-го типа, производного фенилсульфонил-L-пролина [Текст] / **О.С. Григоркевич**, К.Н. Колясникова, Г.В. Мокров // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2022. – Т. 85. – № 9. – С. 27-29.
6. **Григоркевич, О.С.** Получение нового ингибитора матричных металлопротеиназ 2-го и 9-го типов 1-(4-[(2,4-дихлорбензоил)амино]фенил)сульфонил-(2*S*,4*R*)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновой кислоты и выявление его противоопухолевой активности на модели аденокарциномы молочной железы [Текст] / **О.С. Григоркевич**, Л.П. Коваленко, Р.В. Журиков, А.С. Пантеев, О.Ю. Кравцова, А.Г. Ребеко, Г.В. Мокров, Л.Г. Колик, Т.А. Гудашева, А.Д. Дурнев, В.Л. Дорофеев // Химико-фармацевтический журнал. – 2025. – Т. 59. – № 2. – С. 10-19.
7. **Григоркевич, О.С.** Антиметастатическая активность ингибитора матричной металлопротеиназы 2-го типа, производного фенилсульфонил L-пролина АЛ-828, на модели карциномы лёгкого Льюис у самцов мышей линии C57BL/6 [Текст] / **О.С. Григоркевич**, Л.П. Коваленко, Г.В. Мокров, Л.Г. Колик, Т.А. Гудашева, В.Л. Дорофеев // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2025. – №2. – С. 9-17.

## Патенты

1. Патент 2646752 С2 Российская Федерация, СПК С07D 207/48; С07D 211/96; А61К 31/401; А61К 31/445. Ингибиторы цинк-зависимых металлопротеиназ (ММП-2 и ММП-9) в ряду бензоиламино(фенилсульфонил)-замещенных циклических аминокислот как потенциальные лекарственные средства, препятствующие постинфарктному ремоделированию левого желудочка сердца [Текст] / Середенин С.Б., Мокров Г.В., Крыжановский С.А., Лихошерстов А.М., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Цорин И.Б., Гудашева Т.А., **Григоркевич О.С.**, Ионова Е.О., Дурнев А.Д., Жердев В.П.; заявитель и патентообладатель ФГБНУ “Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова”. – № 2016106615, заявл. 25.02.2016; опубликов. 07.03.2018. Бюл. № 7.
2. Патент 2820516 С1 Российская Федерация, СПК С07С 311/44; А61К 31/63. Производное антраниловой кислоты, обладающее антигипоксической, анальгетической и мнемотропной активностью [Текст] / **Григоркевич О.С.**, Мокров Г.В., Колясникова К.Н., Николаев С.В., Антипова Т.А., Надорова А.В., Колик Л.Г., Гудашева Т.А., Вахитова Ю.В. заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных исследовательский центр оригинальных и биомедицинских и фармацевтических технологий». – № 2023116970, заявл. 28.06.2023; опубликов. 04.06.2024. Бюл. № 16.
3. Патент 2826902 С1 Российская Федерация, СПК С07D 207/48; А61К 31/401; А61Р 35/00; А61Р 25/00. Ингибитор матриксных металлопротеиназ 2-го и 9-го типов из ряда производного бензоиламино(фенилсульфонил)-L-оксипролина, обладающий нейропротекторной и противоопухолевой активностью [Текст] / **Григоркевич О.С.**, Мокров Г.В., Николаев С.В., Антипова Т.А., Коваленко Л.П., Гудашева Т.А., Дурнев А.Д., Дорофеев В.Л. заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных исследовательский центр оригинальных и биомедицинских и фармацевтических технологий». – № 2023118642, заявл. 14.07.2023; опубликов. 18.09.2024. Бюл. № 26.

## Тезисы

1. **Григоркевич, О.С.** Дизайн и синтез нового ингибитора матриксной металлопротеиназы-9 типа [Текст] / **О.С. Григоркевич**, Г.В. Мокров, А.С. Дябина, В.Н. Столярук, И.Б. Цорин, Е.О. Ионова, С.А. Крыжановский, Т.А. Гудашева // Экспериментальная и клиническая фармакология: приложение. Материалы V съезда фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств». – 2018. – Т. 81. – С. 62.
2. **Grigorkevich, O.S.** Design and synthesis of 1-({4-[(4-chlorobenzoyl)amino]phenyl}sulfonyl-L-proline, new pharmacologically active inhibitor of matrix metalloproteinase 9 [Текст] / **O.S. Grigorkevich**, G.V. Mokrov, S.A. Kryzhanovskii, V.N. Stolyaruk, I.B. Tsorin, T.A. Gudasheva // 4th Russian Conference on Medicinal Chemistry with

international participants. MedChem Russia 2019 / Abstract book. Ekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Science. – 2019. – P. 199.

3. **Григоркевич, О.С.** Дизайн, синтез и изучение спектра фармакологической активности оригинальных ингибиторов матриксных металлопротеиназ 2-го и 9-го типов [Текст] / **О.С. Григоркевич**, Г.В. Мокров, Т.А. Гудашева // Экспериментальная и клиническая фармакология: приложение. Материалы VI съезда фармакологов России «Смена поколений и сохранение традиций. Новые идеи – новые лекарства». – 2023. – Т. 86, № 11S. – С. 62.

4. Мирошкина, И.А. К механизму действия селективного ингибитора матриксной металлопротеиназы 2 типа 1-({4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил- L-пролина [Текст] / И.А. Мирошкина, **О.С. Григоркевич**, И.Б. Цорин, А.В. Сорокина, Г.В. Мокров, С.А. Крыжановский // Экспериментальная и клиническая фармакология: приложение. Материалы VI съезда фармакологов России «Смена поколений и сохранение традиций. Новые идеи – новые лекарства». – 2023. – Т. 86, № 11S. – С. 107.

5. **Григоркевич, О.С.** Дизайн, синтез и изучение кардиопротективной активности оригинального ингибитора матриксной металлопротеиназы 2 [Текст] / **О.С. Григоркевич**, Г.В. Мокров, И.А. Мирошкина, И.Б. Цорин, Т.А. Гудашева, С.А. Крыжановский В.Л., Дорофеев // Материалы 6-ой Российской конференции по медицинской химии, приуроченной к празднованию 300-летия Российской академии Наук. – 2024. – С. 211.

6. **Grigorkevich, O.S.** Design, synthesis and anti-tumor activity of an original matrix metalloproteinases-2 and -9 inhibitor [Текст] / **O.S. Grigorkevich**, R.V. Zhurikov, L.P. Kovalenko, A.D. Durnev, T.A. Gudasheva, V.L. Dorofeev // XIII International Conference on Chemistry for Young Scientists “MENDELEEV 2024”. Book of abstracts. — St Petersburg.: VVM Publishing LLC. – 2024. –P. 433.

7. **Григоркевич, О.С.** Выявление антиметастатической активности ингибитора матриксной металлопротеиназы 2-го типа, соединения АЛ-828 [Текст] / **О.С. Григоркевич**, Р.В. Журиков // Материалы III всероссийской студенческой научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения фармацевтических наук». – 2025. – С. 44-45.