

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ**

**«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ОРИГИНАЛЬНЫХ И
ПЕРСПЕКТИВНЫХ БИОМЕДИЦИНСКИХ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ
ТЕХНОЛОГИЙ»**

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

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН

Гудашева Татьяна Александровна

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Введение.....	11
1.2. Матриксные металлопротеиназы.....	12
1.2.1. Строение матриксных металлопротеиназ	13
1.2.2. Классификация матриксных металлопротеиназ	15
1.2.3. Механизм активации ММП	18
1.3. Ингибиторы матриксных металлопротеиназ.....	19
1.3.1. Эндогенные ингибиторы ММП	19
1.3.2. Синтетические ингибиторы ММП.....	23
1.3.2.1. Природные ингибиторы ММП	25
1.3.2.2. Гидроксаматные ингибиторы ММП	26
1.3.2.3. Ингибиторы ММП, содержащие карбоксильную группу	30
1.3.2.4. Ингибиторы ММП с тиольной цинк-связывающей группой	31
1.3.2.5. Фосфоросодержащие ингибиторы ММП	32
1.3.2.6. Ингибиторы ММП на основе сульфонамидов.....	33
1.3.2.7. Ингибиторы ММП на основе барбитуратов	36
1.3.2.8. Ингибиторы, не содержащие цинк-связывающую группу.....	37
1.4. Роль ММП в патологических процессах	39
1.4.1. Роль ММП в патогенезе сахарного диабета.....	41
1.4.2. Роль ММП в процессе заживления ран	42
1.4.3. Роль ММП в заболеваниях почек.....	42
1.4.4. Роль ММП при заболеваниях тканей зубов	43
1.4.5. Роль ММП в нейродегенеративных заболеваниях	44
1.4.6. Роль ММП в патогенезе онкологических заболеваний	45
1.4.7. Роль ММП в воспалительных процессах	46
1.4.8. Роль ММП в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний	47
1.5. Заключение	49
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	54
2.1. Молекулярный докинг	54
2.2. Экспериментальная химическая часть	55
2.2.1. Исходные вещества и вспомогательные реагенты	55
2.2.2. Аналитические методы	56
2.2.3. Синтез производных L-пролина и его циклических аналогов	57
2.3. Экспериментальная биологическая часть.....	62
2.3.1. Препараты и реагенты	63
2.3.2. Методы регистрации	64
2.3.3. Животные	64
2.3.4. Клеточные линии	65
2.3.5. Методы исследования	66

2.3.5.1. Эксперименты <i>in vitro</i>	66
2.3.5.2. Эксперименты <i>in vivo</i>	68
2.3.6. Статистическая обработка результатов	76
ГЛАВА 3. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	78
3.1. Конструирование потенциальных ингибиторов ММП-2 и ММП-9	78
3.2. Молекулярный докинг	82
3.3. Синтез сконструированных ингибиторов	87
3.4. Ингибиторная активность соединений АЛ-828, МЛ-269 и ГГМ-27 по отношению к ММП-2 и ММП-9	91
3.5. Выявление нейропротекторной активности у АЛ-828 и ГГМ-27	94
3.6. Определение полулетальной дозы	98
3.7. Выявление антиметастатической и противоопухолевой активностей АЛ-828 и ГГМ-27	99
3.7.1. Антиметастатическая активность АЛ-828 на модели карциномы легкого Льюис	99
3.7.2. Противоопухолевая активность ГГМ-27 на модели аденокарциномы молочной железы Ca755	104
3.8. Выявление антигипоксической активности соединения АЛ-828	108
3.9. Кардиопротективный эффект АЛ-828 на модели экспериментального инфаркта миокарда	110
3.10. Выявление влияния соединения АЛ-828 на содержание ММП-2 и ММП-9 в плазме крови крыс с острым инфарктом миокарда	121
3.11. Влияние соединения АЛ-828 на артериальное и венозное давление	123
3.12. Влияние соединения АЛ-828 на структуру электрокардиографии	124
3.13. Влияние соединения АЛ-828 на вариабельность ритма сердца	127
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	129
ВЫВОДЫ	131
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	132
БЛАГОДАРНОСТЬ	133
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	134

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
 FDA – Food and Drug Administration, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (США)
 ВКМ – внеклеточный матрикс
 ММП – матриксная металлопротеиназа
 ММП-2 – матриксная металлопротеиназа 2-го типа, желатиназа А
 ММП-9 – матриксная металлопротеиназа 9-го типа, желатиназа Б
 про-ММП – неактивная форма ММП
 ТИММП – тканевый ингибитор матриксных металлопротеиназ
 ТСХ – тонкослойная хроматография
 ЯМР – ядерный магнитный резонанс
 Т.пл. – температура плавления
 ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
 ТФУ – трифторуксусная кислота
 ДМСО-*d*₆ – дейтерированный диметилсульфоксид
 Dnp – динитрофенильная группа
 ДМФА – N,N – диметилформамид
 МТТ – бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия
 в/б – внутрибрюшинный способ введения
 ОС – окислительный стресс
p.o. – *per os* – интрагастральный способ введения
 СПЖ – средняя продолжительность жизни
 ТРО – торможение роста опухоли
 УПЖ – увеличение средней продолжительности жизни
 ИИМ – индекс ингибирования метастазирования
 LLC – эпидермоидная карцинома легкого Льюис
 ЛД – летальная доза
 Физ. р-р – физиологический раствор
 ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
 ИБС – ишемическая болезнь сердца
 ИМ – инфаркт миокарда
 ЛЖ – левый желудочек сердца
 ПЖ – правый желудочек сердца
 КМ – кардиомиоциты
 ЛО – ложнооперированные животные
 ЭКГ – электрокардиография
 АД – артериальное давление
 ЧСС – частота сердечных сокращений
 ANOVA – дисперсионный анализ ANalysis Of Variance
 RR min – минимальная частота сердечных сокращений за период наблюдения
 RR max – максимальная частота сердечных сокращений за период наблюдения

RR mean – среднее значение частоты сердечных сокращений за период наблюдения

PQ интервал – время проведения возбуждения по предсердиям и атриовентрикулярному узлу

QRS комплекс – фаза деполяризации желудочков сердца

QT интервал – период от начала деполяризации до окончания реполяризации желудочков сердца

QTc интервал – скорректированный интервал QT, позволяющий оценить истинную величину QT, вне зависимости от величины частоты сердечных сокращений

VLf – мощность в диапазоне очень низких частот (0,003-0,04 Гц)

LF – мощность в диапазоне низких частот (0,04-0,15 Гц)

HF – мощность в диапазоне высоких частот (0,15-0,40 Гц)

RRNN – средняя длительность интервалов R-R

SDNN – стандартное отклонение интервалов R-R

RMSSD – среднеквадратичное значение разности последовательных RR

CV% – коэффициент вариации ряда последовательных кардиоинтервалов, $SDNN/RRNN \times 100\%$

LF/HF – отношение абсолютных значений мощности в диапазоне низких частот к абсолютным значениям мощности в диапазоне высоких частот

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. По данным ВОЗ онкологические (рак трахеи, легких и др.) и сердечно-сосудистые (ИБС, инсульт) заболевания относятся к основным причинам смерти в мире [4]. 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 [77]. 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 [174]. 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 [48]. 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 [135], ИБМХ им. В.Н. Ореховича [49], НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина [10], ФИЦ ПХФ и МХ [51], ВолгГМУ [52] и др.

Антибиотик тетрациклинового ряда, доксициклин (Periostat®, CollaGenex Pharmaceuticals Inc., США), является единственным ингибитором ММП, одобренным для клинического применения для лечения парадонтоза [156]. 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 [87]. 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) [239]. Однако, на III фазе, из-за наличия побочных эффектов со стороны опорно-двигательного аппарата при длительном применении они были прерваны [127]. 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 [129]. 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 [103, 104]. 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.

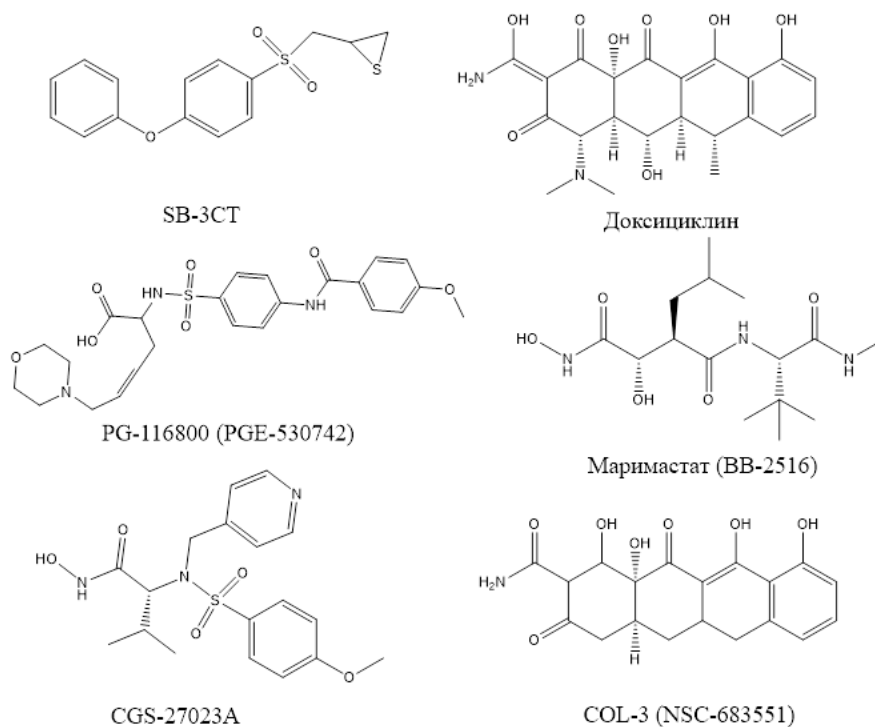


Рисунок 1 – Исследованные в клинике ингибиторы ММП [67, 73, 74, 97, 148]

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 [224, 236]. Они включают в себя наличие цинк-связывающей группы, ароматических участков для π - π 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 [73] и защищало нейроны от апоптоза [122]. Ингибитор SB-3CT в экспериментах у грызунов устранял неврологический дефицит после транзиторной очаговой ишемии и после эмболической очаговой ишемии головного мозга [97, 122, 208]. 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 [245]. 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 [154].

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.

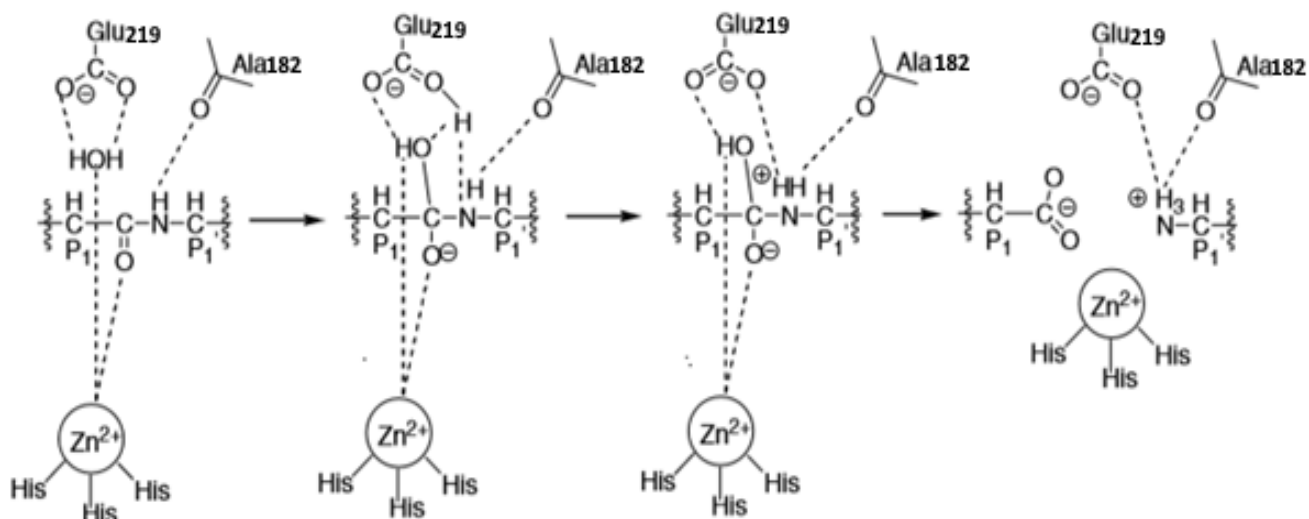
Объем и структура диссертации. Диссертация содержит следующие разделы: введение; обзор литературы; материалы и методы; основные результаты и их обсуждение; заключение; выводы; библиографический указатель, включающий работы на русском (59) и иностранных (193) языках; 21 таблицу; 61 рисунок. Диссертация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

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Введение

Металлопротеиназы впервые были обнаружены в первой половине XX века. Позднее стало известно, что они принимают участие во многих процессах в организме, таких как повышение и понижение артериального давления, болезнь Крона, ревматоидный артрит, онкологические заболевания и др.Metalloпротеиназы можно разделить на подгруппы, такие как семейство метцинцина, цинк-зависимые протеазы, которые включают матриксные металлопротеиназы, ангиотензинпревращающий фермент (АПФ) а также дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина (ADAMTS) [191]. Металлопротеиназы относятся к семейству ферментов из класса гидролаз, способных разрушать пептидную связь между аминокислотными остатками в белках. Также включают в себя аспарагиновые протеиназы, сериновые протеиназы и цистеиновые протеиназы. Все 4 класса металлопротеиназ способны катализировать гидролиз пептидной связи [123]. Цинк-содержащие металлопротеиназы содержат в активном центре двухвалентный атом цинка (Zn^{2+}). При гидролизе пептидной связи тетраэдрический ион Zn^{2+} координируется с тремя донорными группами из фермента и молекулой воды. На рисунке 2 [145, 224, 235] представлено схематическое изображение механизма гидролиза пептидной связи ММП. ММП являются основным классом цинк-содержащих металлопротеиназ.

Настоящий обзор посвящен рассмотрению представлений о структуре ММП, механизме их действия, заболеваниям, в которых ММП принимают участие, а также их эндогенным и экзогенным ингибиторам. Особый акцент сделан на анализе подходов к дизайну синтетических ингибиторов ММП и их активности, а также целесообразности конструирования их новых селективных ингибиторов, поскольку целью настоящей диссертационной работы является поиск, синтез и дальнейшее фармакологическое исследование оригинальных ингибиторов ММП, которые потенциально могли бы применяться в клинике в качестве лекарственных средств.



Примечание - Ион цинка, входящий в активный центр ММП, координирован тремя остатками гистидина (His). Частично обозначены аминокислоты Glu219 и Ala182, которые участвуют в процессе гидролиза.

Рисунок 2 – Схематическое изображение механизма гидролиза пептидной связи в присутствии иона цинка Zn^{2+} ММП [145, 224, 235]

1.2. Матриксные металлопротеиназы

Семейство цинк-содержащих металлопротеиназ в большинстве своем состоит из ММП, которые относятся к семейству цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать все типы белков внеклеточного матрикса (ВКМ). Свое название ММП получили из-за способности специфически гидролизовать белки ВКМ. ММП принимают участие в обмене белков соединительной ткани, в процессах нормального развития и ремоделирования клеточного матрикса, эмбриогенезе, репарации тканей, неоангиогенезе, а также в процессах опухолевой трансформации и метастазирования. Активно изучается роль ММП при ревматоидных артритах, остеоартритах, эндометриозе, аневризме аорты, периодонтитах, аутоиммунных поражениях кожи, атероматозе и язвообразовании [36, 59].

Одно из самых ранних упоминаний о ММП датируется 1949 годом [252]. В этой работе впервые были описаны деполимеризующие ферменты, которые, как полагали авторы, могли способствовать росту опухоли, делая строму соединительной ткани, а также мелкие кровеносные сосуды более рыхлыми. Спустя 13 лет, в 1962 году Джером Гросс и Чарльз М. Лапьер (Jerome Gross и Charles Lapierre) [252] впервые во время изучения деградации тройного спирального коллагена при метаморфозе хвоста головастика, обнаружили коллагеназу. В 1968 году этот фермент в неактивной форме, называемой про-ММП (также называемый зимогеном ММП), был

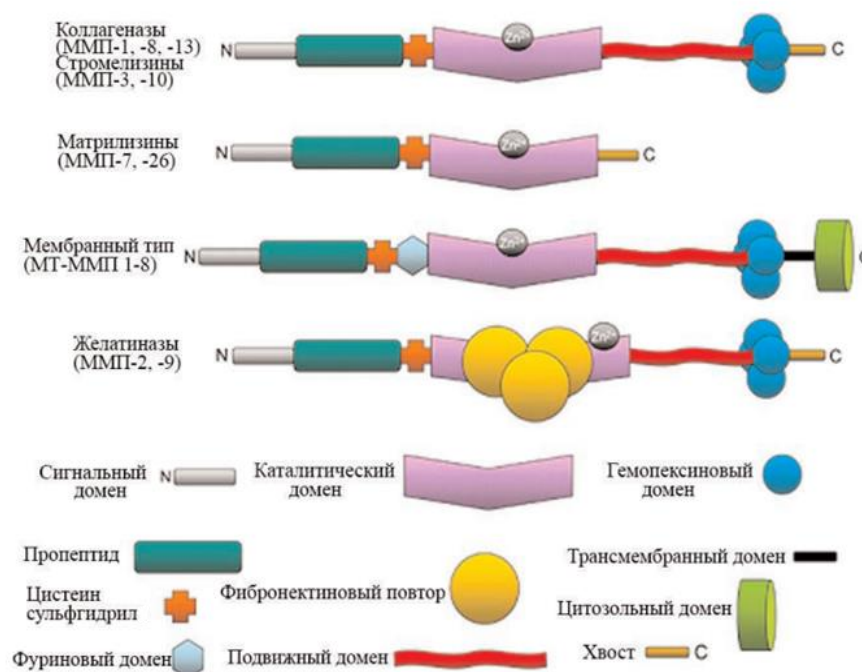
выделен из хвоста головастика и человеческой кожи [252]. Позднее коллагеназа была найдена у позвоночных, насекомых (*Drosophila melanogaster*), нематод (*Caenorhabditis elegans*), гидр (*Hydravulgaris*) и растений (*Arabidopsis*) [252]. В дальнейшем были обнаружены и охарактеризованы другие ММП. Однако, как оказалось, многие вновь открытые ферменты были уже известны ранее или были найдены одновременно не связными друг с другом группами ученых. Это приводило к тому, что одни и те же члены семейства ММП называли разными именами. В связи с этим, в 1989 году, Эдом Харрисом-младшим (Ed Harris, Jr.) и его коллегами во время конференции «Destin Beach Matrix Metalloproteinase» было предложено использовать название «матриксная металлопротеиназа» или «матриксина» для этого семейства ферментов. Первая обзорная статья, где впервые упомянуто название «матриксные металлопротеиназы», была написана Хеннинг Биркедал-Хансен (Henning Birkedal-Hansen) и опубликована в 1988 году. Впоследствии, Международный союз биохимии и молекулярной биологии присвоил этому семейству название - «Matrix Metalloproteinases» и присвоил каждому члену свой номер. К 1991 году были идентифицированы и охарактеризованы ММП-1, -2, -3, -7, -8, -9 и -10, а также их тканевые эндогенные ингибиторы ММП 1 и 2 типа (ТИММП-1 и -2) [238]. Путем ДНК-клонирования было показано, что коллагеназы и желатиназы нейтрофилов генетически отличны от тех же самых ферментов, синтезируемых фибробластами. Нейтрофильная коллагеназа была обозначена ММП-8, а желатиназа – ММП-9 [209].

1.2.1. Строение матриксных металлопротеиназ

В 1994 с помощью рентген-кристаллографии лабораторией Longley были получены 3D структуры каталитических доменов ММП-1 и ММП-8 [36, 162]. В 1995 году удалось получить кристаллическую структуру у всей молекулы коллагеназы 1. В 1996-97 годах благодаря рентгеноструктурному анализу удалось получить 3D структуры комплексов каталитических доменов ММП-3 и ММП-8 с их ингибиторами [36].

На данный момент при помощи того же метода и ЯМР-спектроскопии помимо ММП-1 и ММП-8 были выяснены структуры ММП-2, ММП-3, ММП-7, ММП-9, ММП-10, ММП-11, ММП-12, ММП-13, ММП-14 и ММП-16. Частичны были выяснены структуры про-ММП-3 и про-ММП-9, про-ММП-1 и про-ММП-2. Комплексы про-ММП-2 совместно с ТИММП-2 каталитического домена ММП-3 с кат–ТИММП-1, ММП-14 и кат–ТИММП-2 помогли понять механизм катализа и связывания субстрата при поиске новых ингибиторов [162].

Благодаря новым методам исследования структур органических молекул оказалось возможным выяснить структуры ММП и их эндогенных ингибиторов, а так же установить ряд их общих закономерностей. Показано, что ММП состоит из следующих доменов (рисунок 3):



Примечание - Последовательность доменов, начиная с N-конца: сигнальный домен, пропептидный домен, цистеин сульфгидрильный домен, фуриновый домен (имеется только у МТ-ММП), каталитический домен, подвижный закрепляющий домен, гемопексиноподобный домен, трансмембранный и цитоплазматический домены. Последние 2 домена содержатся только в МТ-ММП. Все ММП вырабатываются в неактивной форме (включая пропептидный домен) и активируются в межклеточном пространстве.

Рисунок 3 – Схематическое отображение доменной структуры ММП человека [8]

Продомен

Продомен условно можно разделить на два фрагмента: N- концевую последовательность (сигнальный домена) из 18-20 аминокислотных остатков (АКО), отщепляющихся во время активации фермента, и так называемого «пропептида», содержащего около восьмидесяти АКО. В последнем находится последовательность PRCGxPD (пролин – аргинин – цистеин– глицин – остаток любой аминокислоты – пролин – остаток любой аминокислоты). Эта последовательность несёт остаток цистеина, взаимодействующего с ионом Zn^{2+} в каталитическом домене. При этом образуется координационная связь и предотвращается связывание молекулы воды с ионом металла, благодаря чему фермент может существовать в неактивной форме (про-ММП) [50].

Каталитический домен

Каталитический домен состоит примерно из 170 АКО и включает в себя активный Zn-связывающий сайт, в котором ион металла связывают три остатка гистидина. После сайта следует стабилизирующая структура из метионина, восемь остатков которого образуют «метиониновую

петлю», поддерживающую структуру активного центра вокруг каталитического иона цинка [75, 149].

Подвижный закрепляющий домен

Подвижный закрепляющий домен часто называют линкерный пептид. Его основная задача состоит в том, чтобы соединять каталитический домен с последующим гемопексиноподобным. Линкерный пептид может состоять из разных АКО, расположенных в произвольном порядке [149].

Гемопексиноподобный домен (С-концевой)

Гемопексиноподобный домен образован серией около 200 АКО. Он ответственен за специфичность при взаимодействии с белком. Гемопексиноподобный домен раскручивает спирали в молекуле коллагена, попутно определяя её положение по отношению к ферменту. Именно на нем происходит взаимодействие с тканевыми ингибиторами ММП [149].

1.2.2. Классификация матриксных металлопротеиназ

В 80-х-90-х годах XX века, когда было охарактеризовано достаточное количество ММП, возникла необходимость их классификации. Изначально ММП были классифицированы относительно их *in vitro* субстратной специфичности (внеклеточный матрикс). Однако не было понятно почему конкретные субстраты были протестированы относительно определенных ММП [224].

Установлено, что для того, чтобы фермент отнесли к семейству ММП, он должен отвечать следующим требованиям:

- 1) Протеолиз не менее одного компонента ВКМ;
- 2) Катализ, связанный с ионом Zn^{2+} в активном центре фермента;
- 3) Активация протеиназами или ртутьорганикой;
- 4) Ингибируется этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА), 1,10-фенантролином и одним из тканевых эндогенных ингибиторов металлопротеиназ (ТИММП);
- 5) кДНК фермента должна быть гомологична с кДНК ММП-1.

Изначально предложенная классификация, заключающаяся в том, что протеиназа секретируется в про-форме, в настоящее время не применяется, в связи с открытием ММП-11 и ММП-28, которые внутриклеточно активируются фурином и секретируются в активных формах, а мембраносвязанные ММП вообще не обязательно секретируются [136].

Активность некоторых ММП тестировалась на коллагене I типа, фибронектине и ламинине. Однако далеко не все ММП проверялись на таком количестве субстратов. В итоге это привело к тому, что первые 10 ММП имели широкую субстратную специфичность, в то время как для ММП, открытых позднее (например, ММП-28), было идентифицировано или исследовано только несколько субстратов. Такая ограниченная классификация субстратов привела к возникновению ряда ошибочных представлений и упрощений в понимании разнообразия функций ММП [136].

Во избежание этих ошибок были предложены две системы классификации матричных металлопротеиназ. Одна из них выделяет 5 подсемейств: коллагеназы, желатиназы, стромелизины, митрилизины и мембранносвязанные ММП (МС-ММП). Недостаточно изученные относят в группу «другие ферменты» [95]. Всего на сегодняшний день известно 28 ферментов ММП (таблица 1).

Таблица 1 – Матричные металлопротеиназы [29, 56, 95, 133, 162, 187].

ММП	Альтернативное название	Субстраты
Коллагеназы		
ММП-1	Интерстициальная коллагеназа	Коллаген I, II, III, VII, VIII, X, XI типов, агрекан, желатин, фибронектин, витронектин, ламинин, энтактин, тенасцин, верзикан, перлекан, проММП-1, проММП-2, проММП-9, α 2-макроглобулин, проTNF- α , C1q, IGFBP, α 1-антихимотрипсин
ММП-8	Нейтрофильная коллагеназа	Коллаген I, II, III, V, VII, VIII, X типов, агрекан, эластин, фибронектин, желатин, ламинин, α 2-макроглобулин, C1q, ангиотензин I, ангиотензин II, фибриноген, брадикинин
ММП-13	Коллагеназа-3	Коллаген I, II, III, IV, VII, IX, X, XIV типов, агрекан, желатин, фибронектин, перлекан, проММП-9, α 2-макроглобулин, C1q, фактор XII, фибриноген, α 1-антихимотрипсин
Желатиназы		
ММП-2	Желатиназа А Коллагеназа IV типа	Коллаген I, II, III, IV, V, VII, X, XI типов, агрекан, эластин, фибронектин, желатин, ламинин, витронектин, энтактин, тенасцин, декорин, верзикан, α 2-макроглобулин, проММП-1, проММП-2, проММП-9, проММП-13, proIL-1 β , proTGF- β , плазминоген, IGFBP-3/5, FGF-R1, CCL7, CXCL12
ММП-9	Желатиназа В	Коллаген IV, V, VII, X, XI, XIV типов, агрекан, эластин, фибронектин, желатин, витронектин, верзикан, декорин, α 2-макроглобулин, proIL-1 β , proTGF- β , IL-2R α , ангиотензин I, ангиотензин II, плазминоген, CXCL6, CXCL8
Стромелизины		

ММП-3	Стромелизин 1	Коллаген II, III, IV, V, VII, IX, X, XI типов, агрекан, эластин, фибронектин, желатин, ламинин, витронектин, энтактин, тенасцин, декорин, перлекан, верзикан, проММП-1, проММП-3, проММП-7, проММП-8, проММП-9, проММП-13, α 2-макроглобулин, proIL-1 β , proTNF- α , антитромбин-III, PAI-1, плазминоген, IGFBP-3, α 1-антихимотрипсин
ММП-10	Стромелизин 2	Коллаген III, IV, V типов, агрекан, эластин, фибронектин, желатин, ламинин, проММП-1, проММП-7, проММП-8, проММП-9
ММП-11	Стромелизин 3	Коллаген IV типа, агрекан, фибронектин, желатин, ламинин, α 2-макроглобулин, α 2-антиплазмин, PAI-2, IGFBP-1
Митрилизины		
ММП-7	Митрилизин-1	Коллаген I, IV, X типов, агрекан, эластин, фибронектин, желатин, ламинин, витронектин, энтактин, тенасцин, декорин, фибулин, верзикан, проММП-1, проММП-2, проММП-7, проММП-9, α 2-макроглобулин, proTNF- α , плазминоген, β 4-интегрин, про- α -дефензин, Fas-L
ММП-26	Митрилизин-2, эндометаза	Коллаген IV типа, фибронектин, желатин, витронектин, α 2-антиплазмин, β 4-интегрин, фибриноген, Е-кадхерин, проММП-9, Fas-L
Матриксные металлопротеиназы мембранного типа		
ММП-14	MT1-ММП	Коллаген I, II, III типов, агрекан, эластин, фибронектин, желатин, ламинин, витронектин, энтактин, тенасцин, перлекан, проММП-2, проММП-13, α 2-макроглобулин, proTNF- α , фактор XII, фибриноген, CD44
ММП-15	MT2-ММП	Коллаген I типа, фибронектин, желатин, ламинин, энтактин, тенасцин, перлекан, проММП-2, proTNF- α
ММП-16	MT3-ММП	Коллаген I, III типов, фибронектин, желатин, ламинин, витронектин, проММП-2, α 2-макроглобулин
ММП-24	MT5-ММП	Фибронектин, желатин, хондроитинсульфат, проММП-2, N-кадхерин
Заякоренные с помощью гликозилфосфатидилинозитола (GPI-anchored)		
ММП-17	MT4-ММП	Желатин, фибриноген, proTNF- α
ММП-25	MT6-ММП, лейколезин	Коллаген IV типа, фибронектин, желатин, ламинин, хондроитинсульфат, дерматансульфат, α 2-макроглобулин, проММП-2, фибриноген, proTNF- α
Неклассифицированные матриксные металлопротеиназы		
ММП-12	Металлоэластаза, макрофагальная эластаза	Коллаген I, IV, V типов, агрекан, эластин, фибронектин, желатин, ламинин, витронектин, остеонектин, α 2-макроглобулин, proTNF- α , фактор XII, фибриноген, плазминоген
ММП-19	RASI-1	Коллаген IV типа, агрекан, фибронектин, желатин, ламинин, олигомерный матриксный протеин хряща, энтактин, фибриноген
ММП-20	Энамилизин	Коллаген V типа, агрекан, амелогенин, олигомерный матриксный протеин хряща
ММП-21	XMMP	α 1-антитрипсин, желатин

ММП-23		Желатин
ММП-27		Желатин, казеин
ММП-28	Эпилизин	Казеин

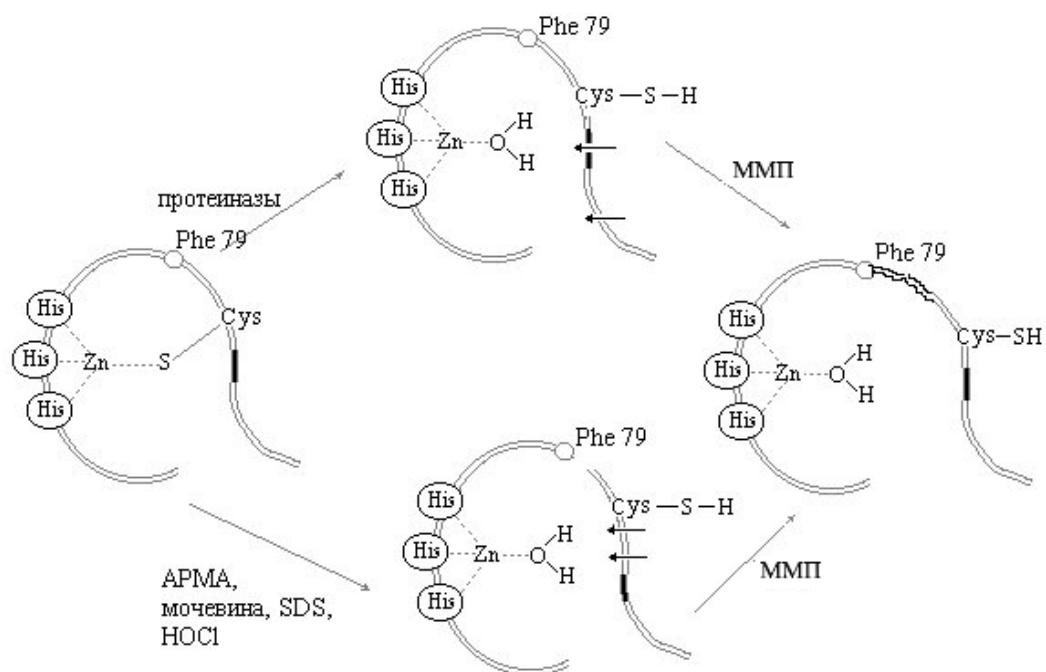
Другая система классификации предложена Хаксли-Джонсоном с соавт (Huxley-Jones) в 2007 году [133]. Авторы, на основании филогенетического соотношения семейства генов ММП идентифицировали гены, способные их кодировать. На основании полученных данных Хаксли-Джонсоном с соавт. разделили ММП на шесть групп:

- А. подгруппа А (ММП-19, ММП-26 и ММП-28);
- В. подгруппа В (ММП-11, ММП-21 и ММП-23);
- С. подгруппа С (ММП-17, ММП-25);
- Д. подгруппа D (ММП-1, ММП-3, ММП-8, ММП-10, ММП-12, ММП-13 и ММП-27, чьи гены расположены в хромосоме 11q21–24);
- Е. подгруппа Е (ММП-14, ММП-15, ММП-16 и ММП-24, которые являются ММП мембранного типа (МТ-ММП));
- F. подгруппа F (ММП-2, ММП-7, ММП-9 и ММП-20).

1.2.3. Механизм активации ММП

В организме ММП синтезируются в виде проферментов (про-ММП), которые активируются как протеолитически, так и непротеолитически – соединениями ртути (HgCl_2 ; 4-аминофенилацетат ртути), хаотропными агентами (молекула в водном растворе, которая может разрушать сеть водородных связей между молекулами воды) и додецилсульфатом натрия [142, 206].

В основном, активность фермента регулируется благодаря наличию пропептида. Он взаимодействует с цинком в каталитическом домене, образуя координационную связь. Молекула воды, находящаяся в пропептиде, не связывается с ионом цинка, следовательно, не происходит катализа и расщепления субстрата, из-за чего фермент и остаётся в неактивной форме. В 1990 году было обнаружено, что «цистеиновый выключатель» отвечает за регуляцию фермента в его неактивной форме [252]. Чтобы ММП активировались, необходимо отщепить пропептид от каталитического домена. Зачастую это достигается автокатализом или взаимодействием с другими ММП (рисунок 4) [95, 149].



Примечание - Представлены 2 пути активации про-ММП: с помощью протеиназы и с использованием соединений ртути (HgCl_2); 4-аминофенилацетат ртути (APMA), мочевины, додецилсульфата натрия (SDS) или HOCl .

Рисунок 4 – Активация про-ММП [1]

1.3. Ингибиторы матриксных металлопротеиназ

1.3.1. Эндogenous ингибиторы ММП

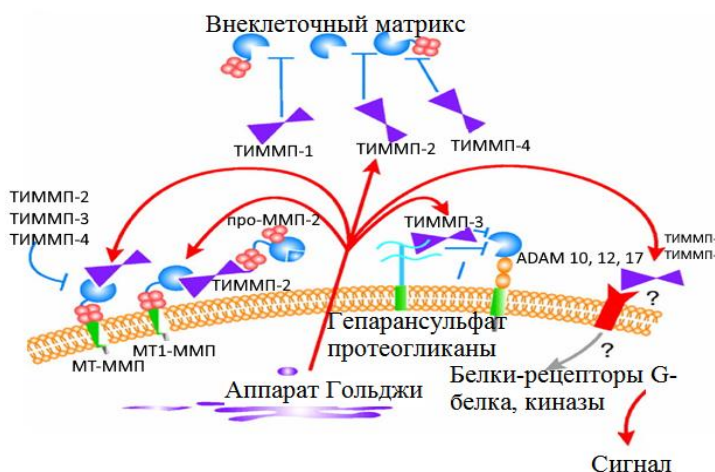
ММП в организме ингибируются $\alpha 2$ -макроглобулином, а так же семейством тканевых ингибиторов металлопротеиназ (ТИММП) [95, 133]. ТИММП представляют собой семейство, состоящее из четырёх ферментов. Это пептидные структуры размером 21-29 кДа. Они не специфичны для каждого типа ММП, хотя наблюдается определённая предпочтительность связывания ТИММП-1 с ММП-9, а ТИММП-2 с ММП-2 [77, 95, 170]. ТИММП связываются с активным центром ММП в соотношении 1:1, блокируя доступ к субстрату [222]. В последовательности генов четырёх ТИММП не выявлено большого сходства, что говорит об уникальной биологической роли каждого эндогенного ингибитора. Например, ТИММП-2 выборочно взаимодействует с МТ-ММП-1, которые участвуют в активации про-ММП-2. ТИММП-3 уникальны в своей способности к взаимодействию с внеклеточным матриксом [206, 246]. Про последнего представителя группы эндогенных ингибиторов, ТИММП-4, известно

немного; однако, предполагается, что он играет одну из основных ролей при связывании ММП в тканях сердца. Функции ТИММП в тканях сердца показаны на таблице 2 [222].

Таблица 2 – Характеристики ТИММП в тканях сердца [222]

ТИММП	Клетка-источник	Модель	Целевая ММП
ТИММП-1	Фибробласты, эндотелиальные клетки, VSMC, кардиомиоциты	ТИММП -1-/-, ИМ	Ремоделирование ЛЖ/ингибирует все ММП, кроме -2 и МТ1-
ТИММП -2	Фибробласты, эндотелиальные клетки, VSMC, кардиомиоциты, макрофаги	-	ингибирует все ММП, кроме ММП-9
ТИММП -3	Фибробласты, VSMC, кардиомиоциты	ТИММП -3-/-, ИМ	Ингибирует ММП -1, -2, -3, -9, -13/повышенная пролиферация и апоптоз
ТИММП -4	Фибробласты, VSMC, кардиомиоциты	-	Ингибирует ММП -1, -3, -7, -9

Все известные ТИММП (ТИММП 1-4) состоят из двух связанных между собой шестью дисульфидными связями доменов: маленького С-концевого (65 аминокислот) и большого N-концевого (125 аминокислот). Последний, который представляет собой остаток Cys, связывается с активным Zn^{2+} -связывающим центром ММП в эквимольном соотношении, вследствие чего и наблюдается ингибирование. С-концевой домен задействован в активации про-ММП [132]. Общее представление о физиологической роли ТИММП в организме показано на рисунке 5 [222]:



Примечание - ММП-матриксная металлопротеиназа; ТИММП 1-4 – тканевый эндогенный ингибитор ММП 1-4; про-ММП-2 – неактивная форма ММП-2; МТ-ММП -- ММП мембранного типа; ADAM – семейство белковых пептидаз, адамализинов.

Рисунок 5 – Представления о работе ТИММП на клеточном уровне [240]

Согласно современным представлениям, ТИММП имеют гораздо более широкий спектр биологических функций, чем полагали ранее. Так, например, недавно стало известно, что ТИММП имеют свои собственные функции в физиологии тканей сердца, причём ММП-

зависимые и независимые функции взаимосвязаны, их роль в «жизни» ВКМ так же важна, как и роль самих ММП.

Известно, что ключевая роль в патологическом ремоделировании миокарда принадлежит фибробластам [69]. После инфаркта нормальные фибробласты разрастаются, превращаясь в миофибробласты, производящие иной, не характерный для нормального миокарда, матрикс, что и приводит к потере функциональности ткани левого желудочка.

Гиперэкспрессия ТИММП активирует миофибробласты таким образом, что они начинают производить высококачественный матрикс. Предположительно эти молекулы взаимодействуют с рядом рецепторов фибробласта.

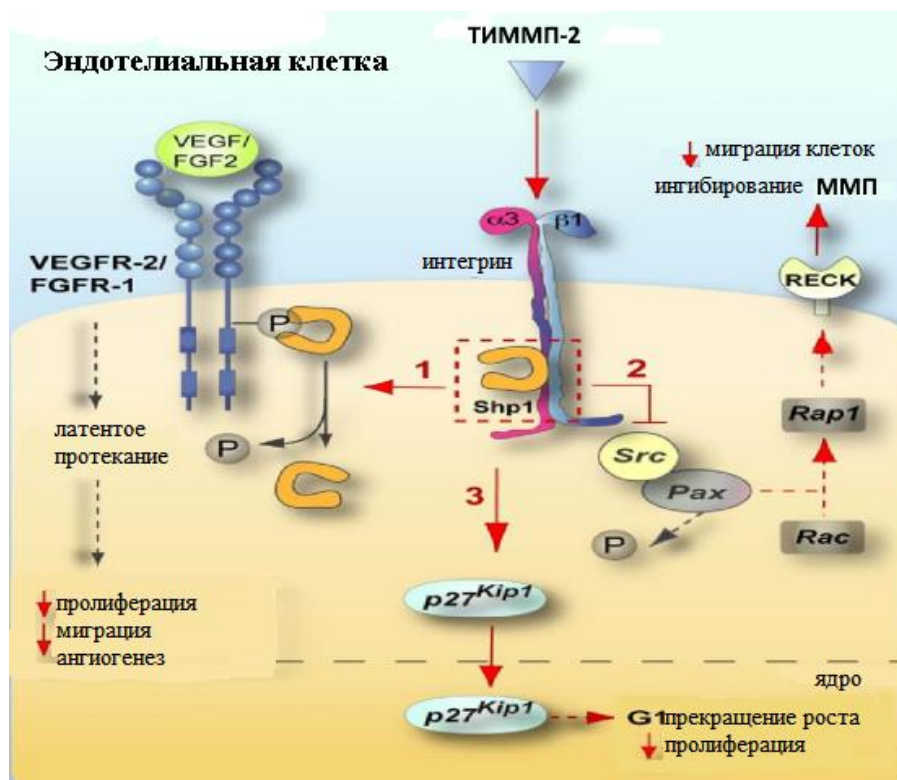
Как показано на рисунке 6, все 4 вида ТИММП участвуют в восстановлении пораженных тканей сердца [222]:



Примечание – ТИММП 1-4 – тканевый эндогенный ингибитор ММП 1-4; ММП-матриксная металлопротеиназа.

Рисунок 6 – ММП-независимая биологическая активность ТИММП [222]

Комплекс ТИММП-2 с $\alpha\beta 1$ -интегрином (образуется на поверхности клетки эндотелия) обладает способностью ингибировать ангиогенез при помощи протеинтирозинфосфатазы Shp1 тремя способами, изображёнными на рисунке 7 [222].



Примечание - MMP-матриксная металлопротеиназа; TIMP-2 – тканевый эндогенный ингибитор MMP-2; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; FGF-2 – фактор роста фибробластов-2; VEGFR-2 – рецептор фактора роста фибробластов-2; FGFR-1 – рецептор фактора роста фибробластов-1; Shp1 – протеинтирозинфосфатаза нерецепторного типа 6; p27Kip1 – ингибитор циклин-зависимой киназы; Rac-сигнальный белок, который контролирует процесс миграции клеток; Rap1 – белок, который подавляет миграцию клеток; RECK – белок, который регулирует активность MMP (особенно MMP-9); Pax – сигнальный белок паксиллин; Src – не связанная с клеточным рецептором тирозинкиназа, участвующая в процессе клеточного роста.

Рисунок 7 – Функции TIMP-2 [222]

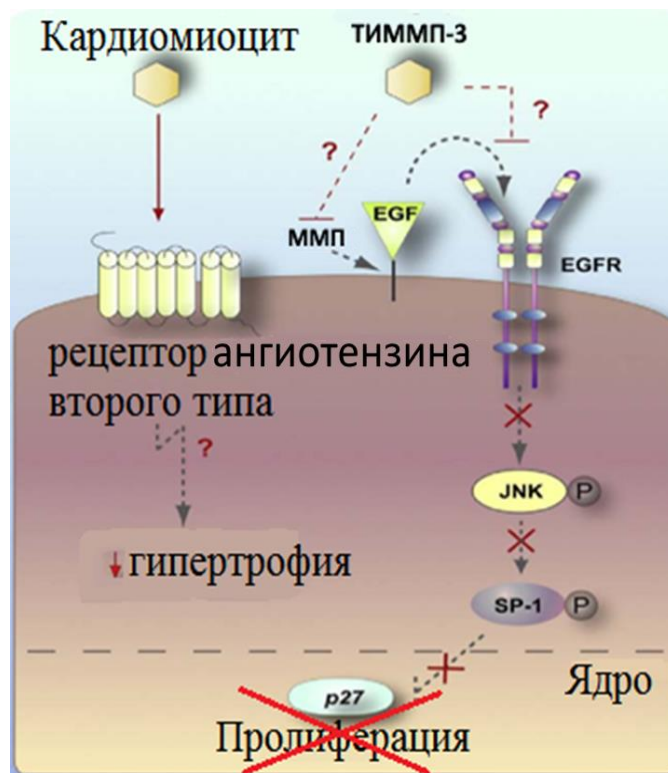
Комплекс TIMP-2 /Shp1 может деактивировать 2 рецептора фактора роста при ангиогенезе: сосудисто-эндотелиальный-2 (VEGFR-2) и рецептор фактора роста фибробластов 1 (FGFR-1). При этом протеинтирозинфосфатаза Shp1 деактивирует VEGFR-2 или FGFR-1, посредством их дефосфорилирования.

Также комплекс TIMP-2 /Shp-1 может ингибировать активность Src тирозинкиназы посредством дефосфорилирования Tyr31/118 у сигнального белка паксиллина. Это приводит к фосфорилированию малого белка Rap1 (подавляет миграцию клеток) с помощью сигнального белка ГТФазы (GTPases) Rac1 (контролирует процесс миграции клеток), что в конечном итоге приводит к синтезу белка RECK, который, будучи связан с мембраной, является ингибитором MMP.

Наконец, этот комплекс в клетках эндотелия человека инициирует синтез ингибитора циклин-зависимой киназы p27Kip1, являющегося ингибитором пролиферации клеток.

Роль TIMP-3 в пролиферации и гипертрофии кардиомиоцитов (рисунок 8), как полагают, связана с взаимодействием с эпидермальным фактором роста (EGF), что, в конечном счете, может привести к подавлению пролиферации, а взаимодействие с рецептором

ангиотензина II типа может играть одну из ключевых ролей в процессе гипертрофии кардиомиоцитов [112]:



Примечание – ММП - матриксная металлопротеиназа; ТИММП-3 – тканевый эндогенный ингибитор ММП-3; EGF - эпидермальный фактор роста; EGFR - трансмембранный рецептор, активирующийся при связывании с эпидермальным фактором роста; JNK - c-Jun N-концевые киназы; SP-1 – фактор транскрипции человека, кодируемый геном SP1; p27 – ингибитор циклин-зависимой киназы.

Рисунок 8 – Функции ТИММП-3 [112, 222]

1.3.2. Синтетические ингибиторы ММП

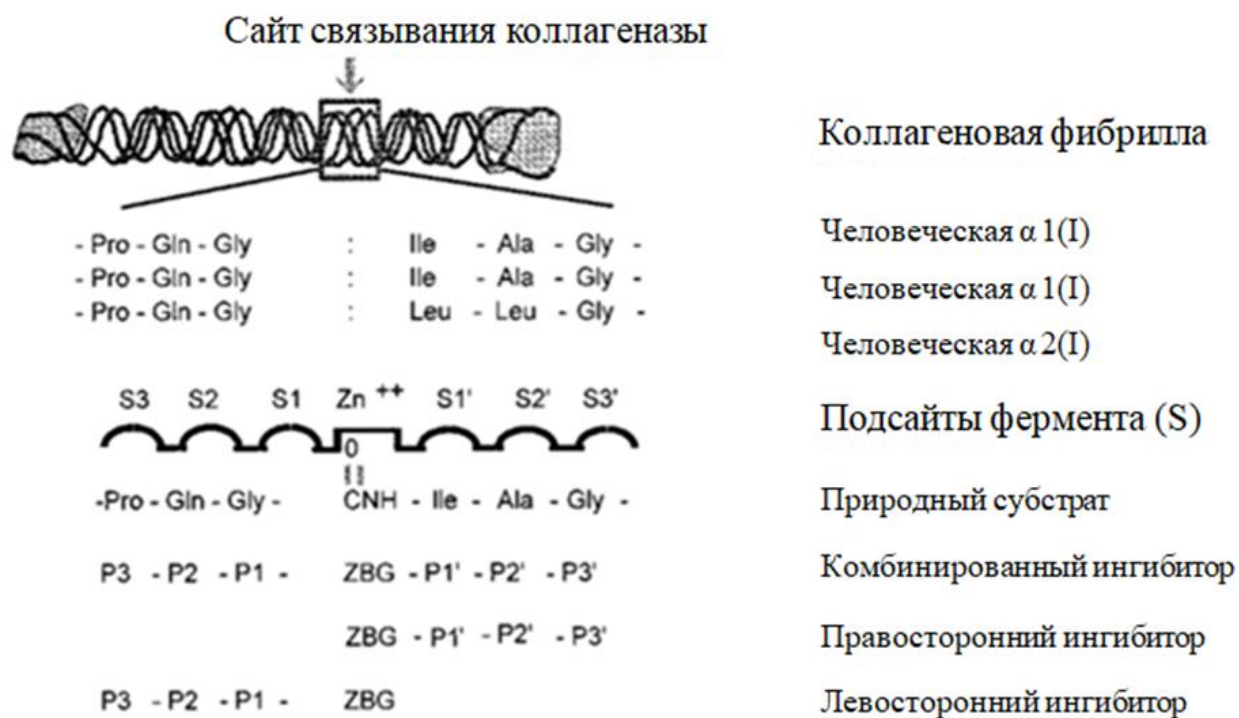
За последние десятилетия стало известно, что ММП играют одну из основных ролей в возникновении и прогрессировании многих патологических состояний. В связи с этим большую популярность обрел поиск новых, оригинальных ингибиторов ММП, что, в частности, позволило сформулировать основные структурные требования к ингибиторам различных ММП.

Основным из них является наличие цинк-хелатирующей группы (ZBG). К таким группам относят гидроксаматную (CONHOH), формилгидроксиламиную, сульфгидрильную (SH), фосфиновую, аминокарбоксильную и карбоксильную группы (COOH) [236]. Также в структуре ингибиторов ММП необходимо наличие, по меньшей мере, одной функциональной группы, способной образовывать водородную связь с энзимами. Последним требованием является

наличие одной или нескольких боковых цепей, которые могут эффективно связываться с ферментами посредством ван-дер-ваальсовых взаимодействий [123].

Указанным требованиям может соответствовать множество соединений с различными структурами, поэтому они были разделены на несколько классов (рисунок 9) [123, 236]:

1. Соединения, которые имеют аминокислотные остатки с обеих сторон от ZBG, например $P_3-P_2-P_1-ZBG-P'_1-P'_2-P'_1$ – смешанные ингибиторы;
2. Соединения, которые имеют аминокислотные остатки только с правой стороны от ZBG, например $ZBG-P'_1-P'_2-P'_3$ – так называемые правосторонние ингибиторы;
3. Соединения, которые имеют аминокислотные остатки только по левую сторону от ZBG, например $P_3-P_2-P_1-ZBG$ – левосторонние ингибиторы;



Примечание – Представлена структура коллагеновой фибриллы человека; S3-S3' – подсайт ММП; PQGCNH(O)IAG – природный субстрат ММП.

Рисунок 9 – Дизайн ингибиторов матриксных металлопротеиназ [239]

Данная классификация основана на специфичности по отношению к определенному субстрату, характерному для конкретной ММП. Эти ингибиторы отличаются друг от друга по силе действия; правосторонние являются более мощным ингибиторами, однако среди левосторонних иногда также встречаются активные ингибиторы [224]. Позднее во всех представленных классах ингибиторов были выделены:

- природные ингибиторы ММП;

- ингибиторы, содержащие карбоксильную группу;
- ингибиторы, содержащие остаток гидроксамовой кислоты;
- ингибиторы на основе тиола;
- ингибиторы, содержащие фосфор;
- ингибиторы на основе сульфонамидов;
- ингибиторы на основе барбитуратов;
- ингибиторы, не содержащие цинк-связывающую группу.

1.3.2.1. Природные ингибиторы ММП

Производные жирных кислот с длинной цепью (олеиновая, элаидиновая и паринаровая кислоты) обладают ингибирующей активностью по отношению к ММП. Паринаровая кислота (цис- и трансизомеры) — ингибитор желатиназ, с $K_i \sim 10^{-6}$ М. Элаидиновая кислота, будучи нанесённой на кожную ткань, также защищает клетки от воздействия желатиназ. Активность данного класса соединений связана с наличием карбоксильной цинк-связывающей группы и длинного углеводородного хвоста, взаимодействующего с S1' сайтом активного центра желатиназ (рисунок 9) [222].

Флавоноиды и подобные структуры (рисунок 10) [112, 156, 216]. Агеладин А - флуоресцентный алкалоид, выделенный из морской губки, ингибирует ММП-1, -8, -9, -12, и -13 со значением $IC_{50} = 1,2; 0,39; 0,79; 0,33$ и $0,47$ мг/мл соответственно; генистеин - (4Н-1-бензоперан-4-он,5,7-дигидрокси-3,4-гидроксифенил) изофлавоноид, промежуточное вещество в синтезе других изофлавоноидов, защищающих растения от микробов [112]. Агеладин А содержится в сое, является ингибитором желатиназ, при этом способствует выделению ТИММП-1. Нобилетин – цитрусовый флавоноид, обладающий ингибирующей активностью против желатиназ. Является веществом, способствующим понижению роста раковых клеток [216].

Доксициклин, также известный как периостат (рисунок 10) — полусинтетическое тетрациклиновое соединение, которое помимо антибактериальной активности может остановить разрушение внеклеточного матрикса в заболеваниях полости рта и в миокарде. Доксициклин был разрешён FDA в 1998 году, и до сих пор остаётся единственным зарегистрированным ингибитором ММП-9 [156].

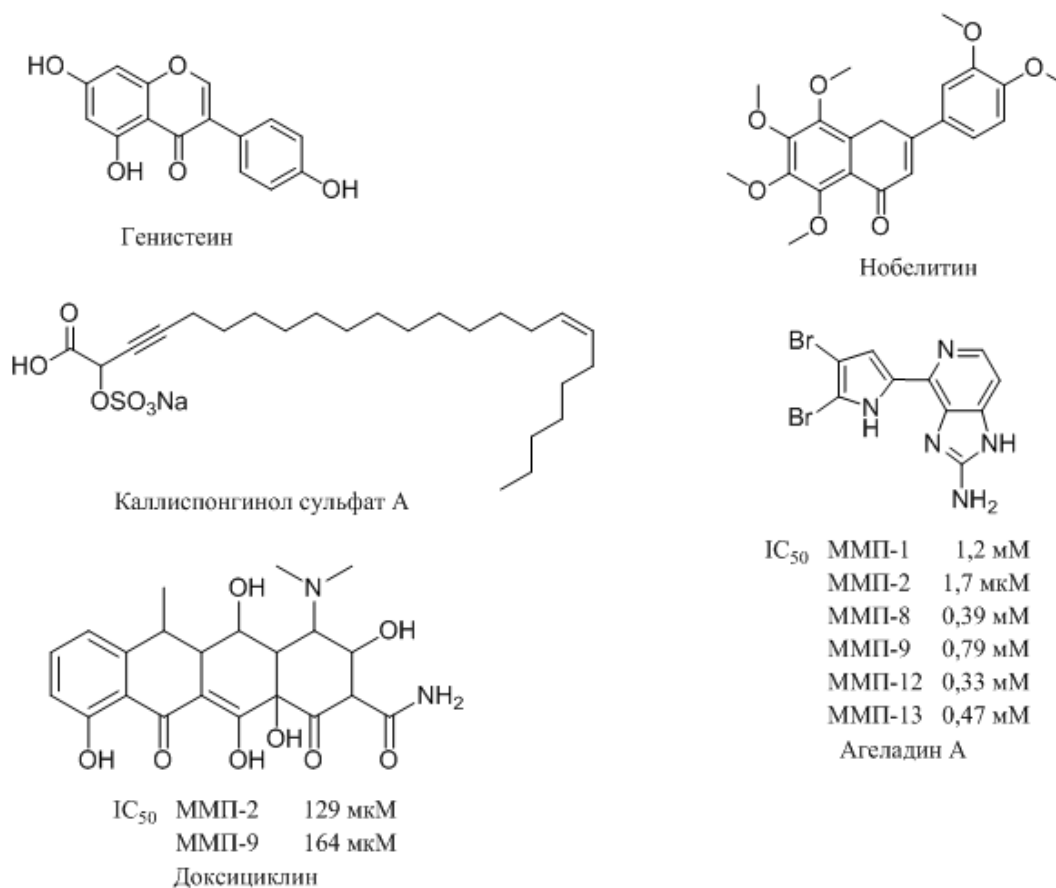


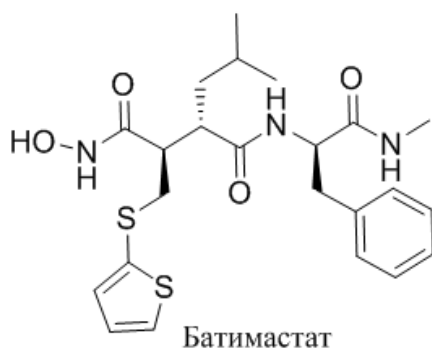
Рисунок 10 – Природные ингибиторы ММП [112, 148, 156, 216]

1.3.2.2. Гидроксаматные ингибиторы ММП

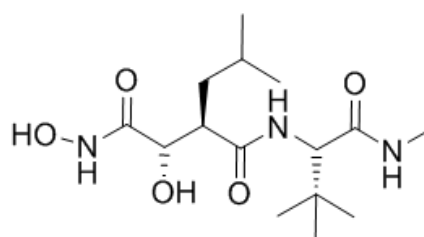
Ингибиторы на основе гидроксамовой кислоты являются самыми изученными и распространенными среди всех соединений этой группы. Все они содержат гидроксаматную цинк-связывающую группу (CONHOH). Данные ингибиторы подразделяются на сукцинильные пептидные и непептидные гидроксаматы, сульфонамидные гидроксаматы, а также сульфонамиды на основе малоновой кислоты. Считается, что из всех представителей этого ряда сукцинильные гидроксаматы обладают наибольшей аффинностью по отношению к ММП. Поэтому, до недавнего времени, они были наиболее широко изученными. Самыми известными ингибиторами данного класса являются батимастат и маримастат (рисунок 11). Многими исследователями было обнаружено, что наличие заместителя в подсайте P₁ приводит к получению ингибиторов ММП широкого спектра действия. Всего было синтезировано множество сукцинильных гидроксаматов пептидной и непептидной природы. Однако только батимастат (BB-94) и маримастат (BB-2516) дошли до стадии клинических испытаний. Они

обладают широким спектром действия и показали хорошую активность *in vivo* в ряде клинических моделей заболеваний [153, 235].

Батимастат (BB-94) проявил высокую ингибирующую активность по отношению к ММП-1, -2, -3, -7 и -9. Он является первым ингибитором ММП, для которого были проведены клинические испытания (I фаза, 1994 год). Из-за плохой растворимости, отсутствия пероральной биодоступности батимастата и наличия побочных эффектов (мышечно-скелетная боль появлялась после 3-5 месяцев применения препарата), клинические испытания этого вещества были прерваны на III фазе [120, 182].



IC ₅₀	ММП-1	10 нМ
	ММП-2	4 нМ
	ММП-3	20 нМ
	ММП-8	10 нМ
	ММП-9	1 нМ
	ММП-14	3 нМ

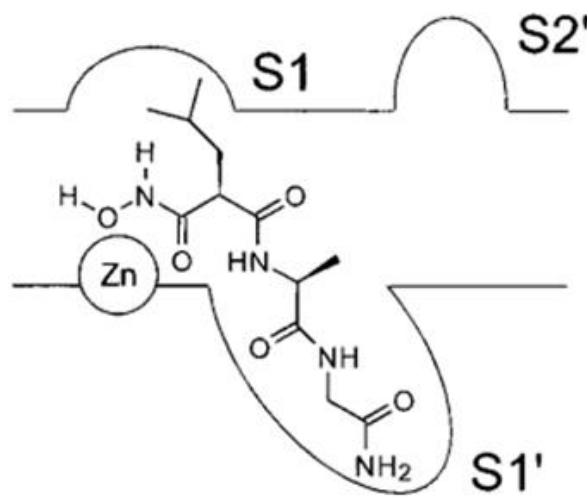


IC ₅₀	ММП-1	5 нМ
	ММП-2	6 нМ
	ММП-3	200 нМ
	ММП-7	20 нМ
	ММП-8	2 нМ
	ММП-9	3 нМ
	ММП-14	1,8 нМ

Рисунок 11 – Батимастат и маримастат [120, 182, 235]

Маримастат (BB-2516) является активным при пероральном применении, с периодом полураспада в плазме крови 8–10 часов. Маримастат прошел III фазу клинических испытаний в отношении нескольких типов рака. Его биодоступность объяснили наличием гидрофильного ОН-фрагмента что, вероятно, может увеличить растворимость соединения в воде. Маримастат – обратимый ингибитор ММП, обладающий высокой аффинностью. Однако оказалось, что и маримастат вызывает скелетно-мышечные боли, но его применяют в таргетной терапии органов ЖКТ [112, 235].

Гидроксаматные ингибиторы на основе малоновой кислоты связываются в активном центре (АЦ) ММП по другому механизму, нежели выше представленные ингибиторы (рисунок 12) [120, 145].



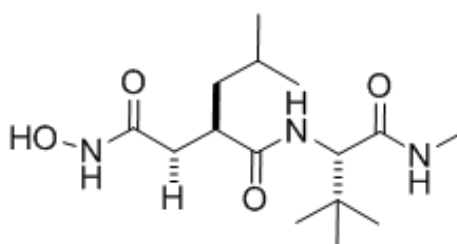
K_i ММП-8 121 мкМ

Примечание – Несубстратоподобное связывание HONH-Mal(i-Bu)-Ala-Gly-NH₂ с ММП-8

Рисунок 12 – Гидроксаматный ингибитор ММП на основе малоновой кислоты. [120].

Гидроксаматный фрагмент связывается с ионом цинка ММП как бидентантный хелатор, таким же образом, как и остальные соединения этого ряда. Из-за отсутствия спейсера между цинк-связывающей и гидрофобной группой, изобутильный фрагмент занимает подсайт S1. Фрагмент Ala-Gly-NH₂ изгибается таким образом, чтобы занять карман S1'.

Модификация заместителя P2' составляющей также влияет на фармакокинетическую активность потенциальных ингибиторов. Трет-бутильная группа в P2' положении (рисунок 13) [184, 235] стерически закрывает амидную связь, также является, по всей вероятности, наиболее предпочтительным заместителем, обеспечивающим наибольшее связывание с субстратом.



Ro 31-9790

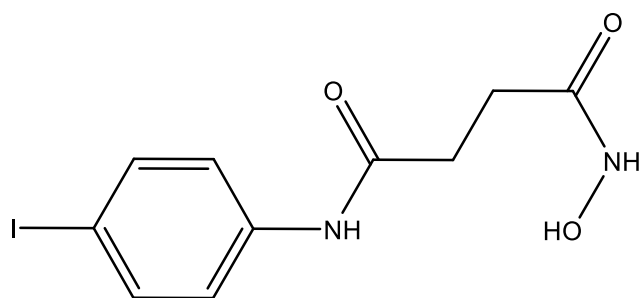
IC_{50}	ММП-1	10 нМ
	ММП-2	8 нМ
	ММП-3	700 нМ
	ММП-14	1,9 нМ

Рисунок 13 – Пример ингибитора с заместителем P2' [184, 235].

Также существуют соединения с заместителями в положении P3'. Однако по своей ингибирующей способности P3'ингибиторы мало чем отличаются от P2' ингибиторов. Ранее предполагали, что P3'ингибиторы из-за своего связывания с метионином способны селективно ингибировать ММП-7, однако позже эта информация была опровергнута [145].

При проведении клинических испытаний было обнаружено, что гидроксаматные ингибиторы являются метаболически лабильными, могут разрушаться до гидросиламина (канцероген) и, в случае пептидных ингибиторов, плохо усваиваются в ЖКТ, а также вызывают скелетно-мышечные боли в качестве побочного эффекта. Однако, эти соединения показали свою эффективность *in vivo*, поэтому их продолжают разрабатывать [65, 155]

На сегодняшний день группа ученых из Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии РАН занимается разработкой ингибиторов ММП на основе гидроксамовой кислоты, производных N-гидроксипутанамида. Йоданилиновое производное N¹-гидрокси-N⁴-фенилбутандиамида показало ингибирующую активность по отношению к ММП-2, -3, -9, -14 при этом с низкой цитотоксичностью (рисунок 14) [51].



IC ₅₀	ММП-2	1,26 мкМ
	ММП-3	> 10 мкМ
	ММП-9	1,06 мкМ
	ММП-14	1,49 мкМ

Рисунок 14 – Ингибитор ММП .йоданилиновое производное N¹-гидрокси-N⁴-фенилбутандиамида [65]

В эксперименте *in vivo*, проведенном на модели меланомы В16, в дозе 300 мг/кг при в/б введении со 2-го по 9-ый день после прививания опухоли йоданилиновое производное проявило высокую противоопухолевую активность (ТРО на 20-й день развития опухоли составило 42,3%). Кроме этого, данное соединение эффективно подавляло процесс метастазирования (ИИМ составил 88,6%) [65]. В связи с этим ингибиторы ММП на основе гидроксамовой кислоты потенциально могут использоваться в противоопухолевой терапии.

1.3.2.3. Ингибиторы ММП, содержащие карбоксильную группу

В ингибиторах на основе карбоновых кислот цинк-связывающей группой является карбоксильная группа ($-\text{COOH}$). Эти ингибиторы проявляют меньшее сродство к ММП, чем остальные. Однако они отличаются хорошей биодоступностью и отсутствием токсичности и побочных эффектов по сравнению с ингибиторами других классов. Также известно, что некоторые карбоксильные ингибиторы действуют как селективные по отношению к ряду ММП, которые имеют глубокий сайт связывания ($\text{S1}'$). К ним относятся ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9 и ММП-13. Таким образом, они являются перспективными для синтеза и последующего применения в клинической практике в качестве селективных ингибиторов некоторых классов ММП [175].

Соединения AG-3433 и BAY 12-9566 (рисунок 15) являются одними из немногих карбоксилатных ингибиторов ММП, которые дошли до клинических исследований (AG-3433 прошел I фазу, BAY 12-9566 дошел до III фазы) как противоопухолевые средства [203]. Они отличаются удлиненным и достаточно громоздким гидрофобным заместителем в месте связывания с сайтом $\text{S1}'$. Кроме того, наличие аминогруппы ($-\text{NH}$) в соединении AG-3433 позволяет образовывать дополнительные связи с аминокислотами АЦ ферментов.

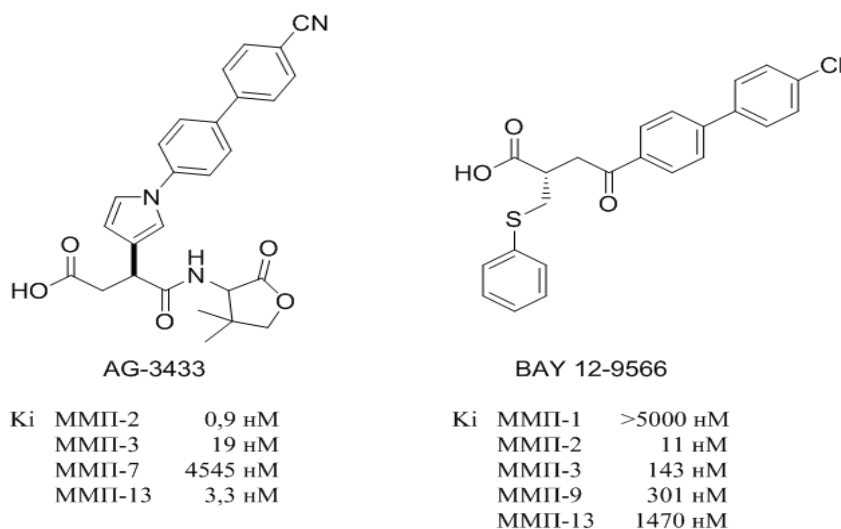


Рисунок 15 – Карбоксильные ингибиторы AG-3433 и BAY 12-9566 соответственно [203]

Еще один яркий представитель карбоксилатных ингибиторов ММП (рисунок 16) [123], дифенилтетразол, также обладает длинной биароматической группой для связывания с $\text{S1}'$ -сайтом в АЦ ММП. Однако, помимо этого, в его структуре присутствует сульфонамидная группа, которая образует сильные водородные связи между одним из ее атомов кислорода и

основными NH-группами Leu181 и Ala182, присутствующие в ММП. В связи с этим, многие производные сульфонил-аминокислот на данный момент синтезированы в качестве ингибиторов ММП [62, 123].

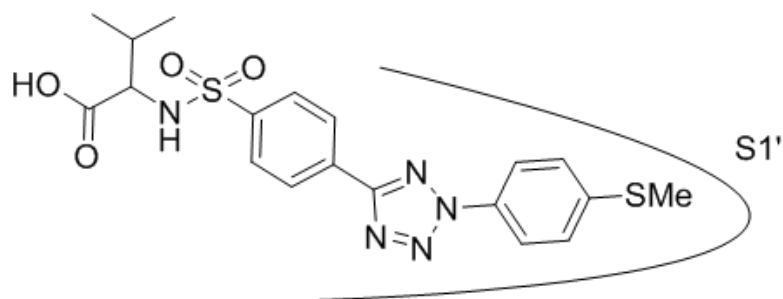


Рисунок 16 – Карбоксилатный ингибитор ММП [123]

1.3.2.4. Ингибиторы ММП с тиольной цинк-связывающей группой

Тиольная группа является монодентантной, ее сродство с ионом цинка в АЦ меньше, чем сродство бидентантных групп, таких как гидроксаматная и карбоксильная. Однако, тиольные ингибиторы являются хорошо растворимыми и легче ионизируются. В результате их ингибиторные свойства почти такие же, как у гидроксаматных и карбоксилатных ингибиторов [224, 234, 235].

Среди ингибиторов ММП, содержащих тиольную цинк-связывающую группу, до клинических испытаний дошло всего два соединения (рисунок 17) [224, 234, 235].

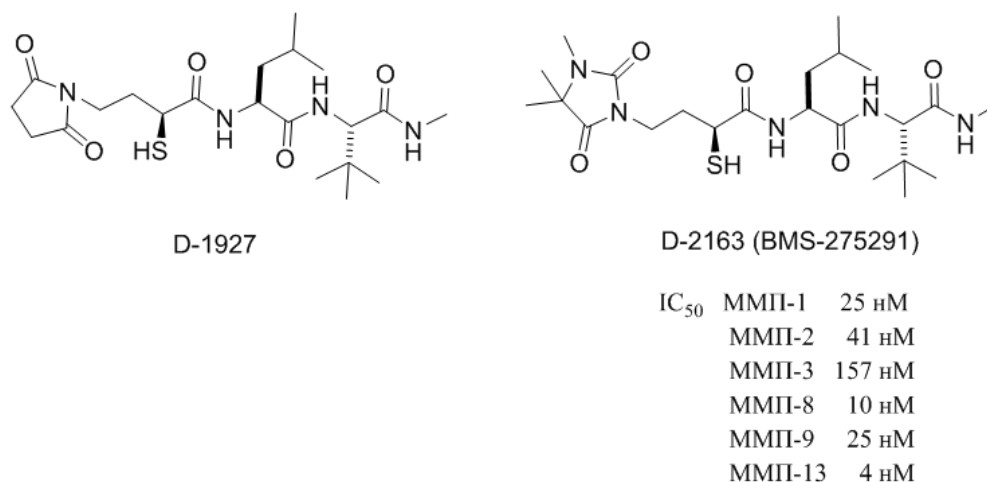
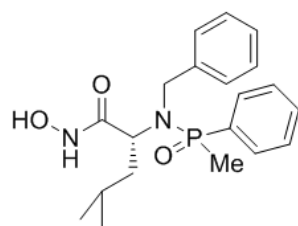


Рисунок 17 – Тиольные ингибиторы ММП D-1927 и D-2163 (BMS-275291) [234].

Соединение D-1927 изначально разрабатывалось как противоопухолевое средство, однако не дошло до клинических исследований по этим показаниям, а дошло до второй фазы клинических испытаний в качестве противовоспалительного средства. Соединение D-2163 (BMS-275291) дошло до третьей фазы клинических исследований как противоопухолевый препарат [234].

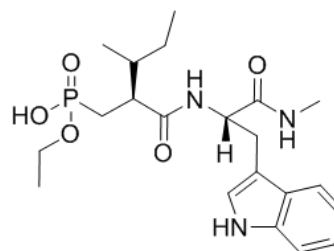
1.3.2.5 Фосфоросодержащие ингибиторы ММП

В основе фосфоросодержащих ингибиторов лежит либо фосфиновая, либо фосоновая кислота для связывания с ионом цинка. Например, на рисунке 18 представлены синтезированные ингибиторы ММП, содержащие фосфор [223, 235]. Эти соединения являются моно- и бидентантными соответственно, что позволяет им связываться с ионом цинка. Данные заместители не могут превзойти гидроксаматную группу по силе связывания цинка, но полностью выполняют роли акцепторов водородных связей и взаимодействуют с ферментом другими способами.



PVG-25727

IC ₅₀	ММП-1	20,5 нМ
	ММП-2	13,3 нМ
	ММП-3	24,4 нМ
	ММП-7	886 нМ
	ММП-8	5,3 нМ
	ММП-9	20,6 нМ
	ММП-13	7,4 нМ



Ki	ММП-1	1,5 мкМ при pH 6,5
		0,9 мкМ при pH 7,5

Рисунок 18 – Фосфоросодержащие ингибиторы ММП [223]

Многие фосфоросодержащие ингибиторы являются селективными ингибиторами ММП-1, ММП-3 и ММП-13. Однако, несмотря на всю их перспективность, ни одно из этих соединений до сих пор не достигло стадии клинических исследований.

1.3.2.6. Ингибиторы ММП на основе сульфонамидов

Эффективность данной группы ингибиторов зависит от электронного окружения атома серы. Повышение положительного заряда на сере облегчает разложение вещества, поэтому при ней предпочтителен электрондонорный заместитель. Сама SO₂-группа отвечает за водородные связи с аминокислотными остатками субстрата. За счёт этого связывания комплекс становится более стабильным (рисунок 19) [224].

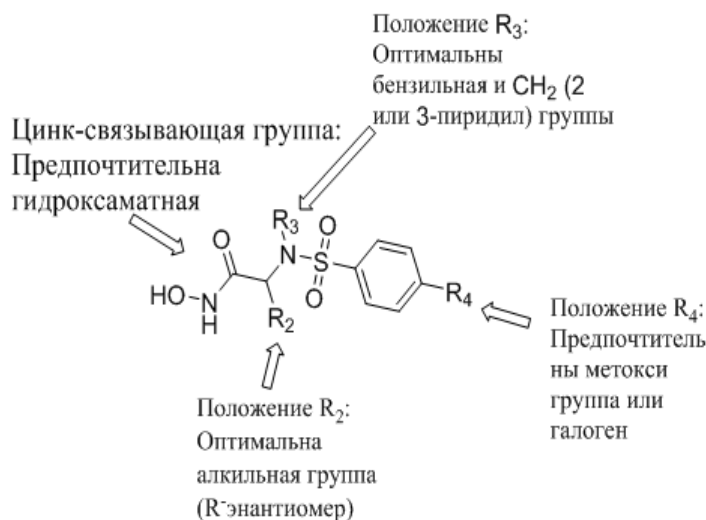
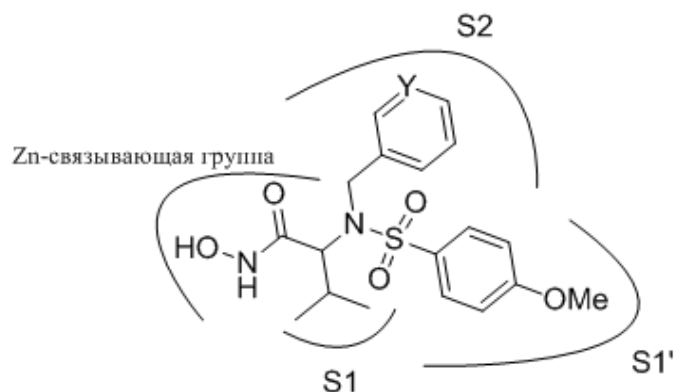


Рисунок 19 – Общая формула сульфамидного ингибитора ММП [224]

Из литературных данных известно, что гидроксаматы, содержащие сульфонамидную группу, являются более эффективными ингибиторами ММП [123, 235]. Некоторые из них дошли до III стадии клинических исследований в качестве противоопухолевых препаратов (AG-3340) (рисунок 21) [203].

Соединение CGS 27023A (рисунок 20) прошло I фазу клинических исследований в качестве противоопухолевого средства, а также препарата против артрита [161, 210]. Важной особенностью представленных структур является наличие алкильной изопропильной группы (R^- энантиомера, при наличии хиральной активности), замедляющей метаболизм цинк-связывающего гидроксаматного участка ингибитора. S-изомер, при этом, практически не активен. Считается, что именно он связывается с подсайтом S1. Более громоздкий пиридилметил или бензильный фрагмент, присутствующий при атоме азота, который, вероятно, связывается с карманом S2; и арилсульфонильная группа для взаимодействия с аминокислотными остатками в кармане S1' (рисунок 20) [123].

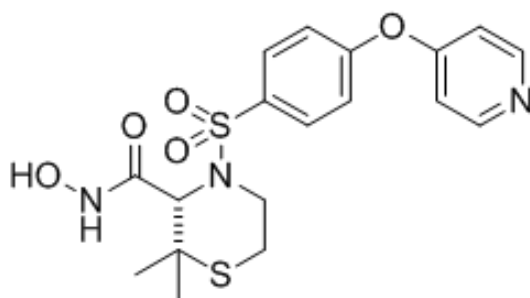


Y = N - CGS 27023A; Y = CH - CGS 25966

K _i	ММП-1	33 нМ	K _i	ММП-3	92 нМ
	ММП-2	20 нМ			
	ММП-3	43 нМ			
	ММП-9	8 нМ			

Рисунок 20 – Сульфонамидные ингибиторы ММП [123, 161, 235]

Примерно в это же время был разработан ингибитор AG-3340 (рисунок 21), с IC₅₀ находящейся в наномолярном диапазоне концентраций [203, 235]. Он прошел II фазу клинических испытаний в качестве противоопухолевого средства и прошел I стадию как препарат против макулодистрофии. Этот ингибитор и ингибиторы похожего строения обладают высокой селективностью и пероральной биодоступностью.

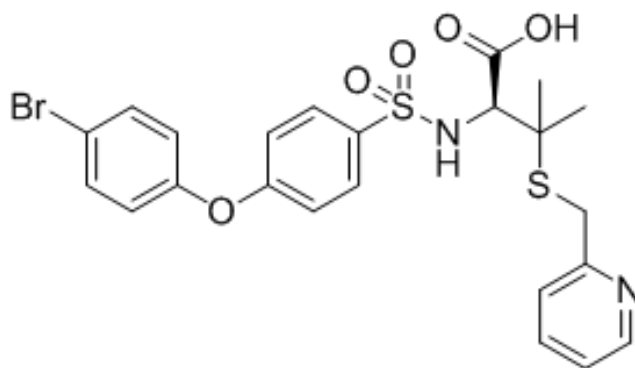


AG 3340

K _i	ММП-1	8,2 нМ
	ММП-2	0,083 нМ
	ММП-3	0,27 нМ
	ММП-7	54 нМ
	ММП-13	0,038 нМ

Рисунок 21 – Ингибитор ММП AG-3340 [203, 235]

Сульфонамидный ингибитор на основе карбоновой кислоты (рисунок 22) в основном проявляет ингибиторную активность по отношению к ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-7 и ММП-13 [68].



Ki	ММП-1	34000 нМ
	ММП-2	7 нМ
	ММП-3	1500 нМ
	ММП-7	75000 нМ
	ММП-13	178 нМ

Рисунок 22 – Сульфонамидный ингибитор ММП на основе карбоновой кислоты [68]

1.3.2.7. Ингибиторы ММП на основе барбитуратов

Эти соединения связывают цинк-ион ММП посредством карбонильного кислорода, кольцевого азота, либо же их комбинации (ионизированного кольца). К этой группе относятся спиробарбитураты и другие 5,5-дизамещённые производные пиперазинов [142, 228].

В 2001 работники компании La-Roche при скрининге противоопухолевых препаратов обнаружили, что 5,5-дизамещённые барбитураты, обладают хорошей ингибирующей активностью по отношению к желатиназам [228, 250]. Группа Гильмера синтезировала 5-пиперазин и гомопиперазин-замещённые барбитураты в 2011 году [226, 250]. Позднее эта же группа ученых изучила ряд димерных соединений с линкерами, содержащими от 2 до 20 атомов углерода [227, 250]. Подобного рода соединения разрабатывались в качестве перорально биодоступных ингибиторов желатиназ А и Б. Представленные на рисунке 23 барбитураты показали хорошую ингибиторную активность по отношению к желатиназам и могут использоваться в качестве противоопухолевых средств [235, 250].

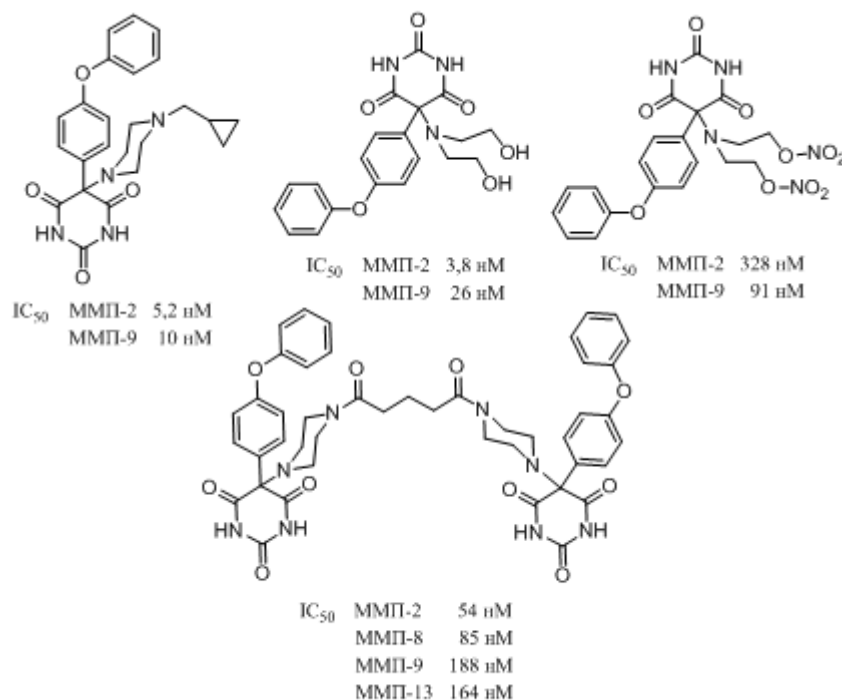


Рисунок 23 – Ингибиторы ММП на основе барбитуратов [250]

1.3.2.8. Ингибиторы, не содержащие цинк-связывающую группу

Многие десятилетия развитие ингибиторов ММП фокусировалось на подборе структур, которые связываются в активном центре фермента и хелатируют каталитический цинк. Однако, из-за высокого сходства между каталитическими доменами ММП и других металлопротеиназ (например, АПФ), ингибиторы первых далеко не всегда оказываются селективными. В связи с этим перспективными оказались структуры, способные связываться с другими доменами ММП и таким образом ингибировать их. В качестве целевого может быть использован гемопексиноподобный домен металлопротеиназ, структурные особенности которого позволят повысить избирательность ингибиторов, вплоть до таких как ингибиторы желатиназ, структура каталитических доменов которых практически идентичная [80].

Хорошим примером подобной модификации ингибитора является Иломастат (Ilomastat). Иломастат по своей природе является ингибитором широкого спектра действия из-за наличия в структуре гидроксаматной группы, которая связывается с ионом цинка металлопротеиназ [204, 235].

Для улучшения селективности Иломастата в 2016 году группа ученых разработала и синтезировала новые аналоги Иломастата с замещенными бензамидными группами вместо

гидроксамовой кислоты [204]. Среди этих аналогов наиболее эффективным оказалось соединение, представленное на рисунке 24б, которое проявляло ингибирующую активность против ММП-2 в пять раз более сильную, чем у Иломастата ($IC_{50} = 0,19$ нМ и $IC_{50} = 0,94$ нМ соответственно). Важно отметить, что аналог демонстрировал более чем 8300-кратную селективность для ММП-2 по сравнению с ММП-9 ($IC_{50} = 1,58$ мкМ). Исследования показали, что связывание аналога с ММП происходит, минуя каталитический домен, а также фармакокинетические свойства у аналога были лучше, чем у исходного Иломастата [204, 250].

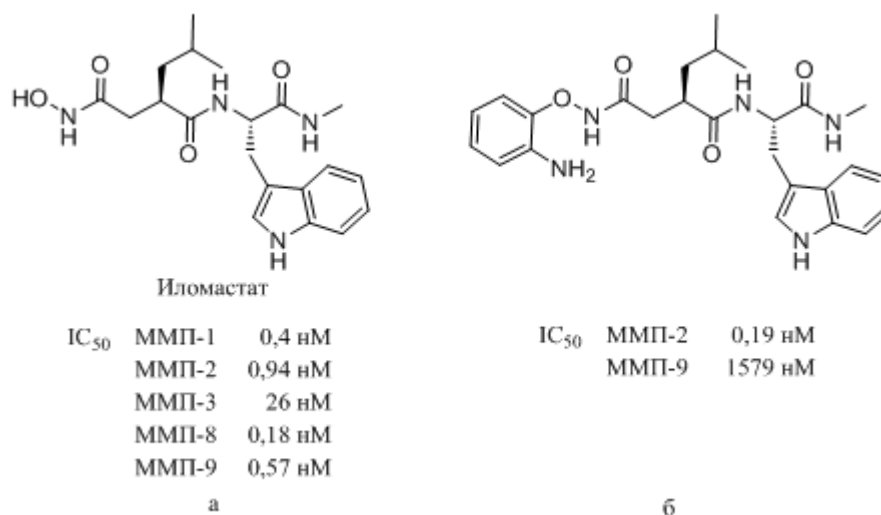


Рисунок 24 – Иломастат (а) и его аналог (б) [204]

Группой ученых из Московского Государственного университета имени М.В. Ломоносова был синтезирован ряд соединений на основе изатина, которые проявляли ингибиторную активность по отношению к ММП-2, -8 и -13 в микромолярном диапазоне (рисунок 25). Одно из этих соединений, представленных на рисунке 24г, показало цитотоксическую активность по отношению к клеткам рака толстой кишки человека (НСТ116) в наномолярной концентрации [27].

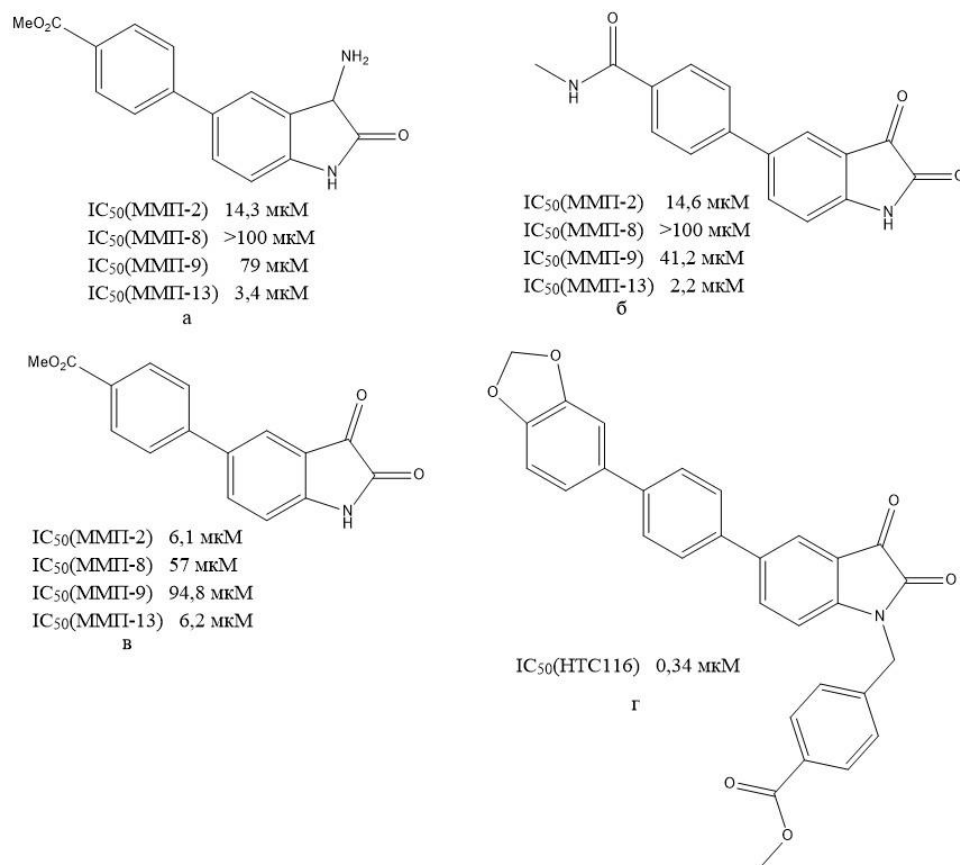


Рисунок 25 – Ингибиторы ММП производные 5-арлизатинов [27]

1.4. Роль ММП в патологических процессах

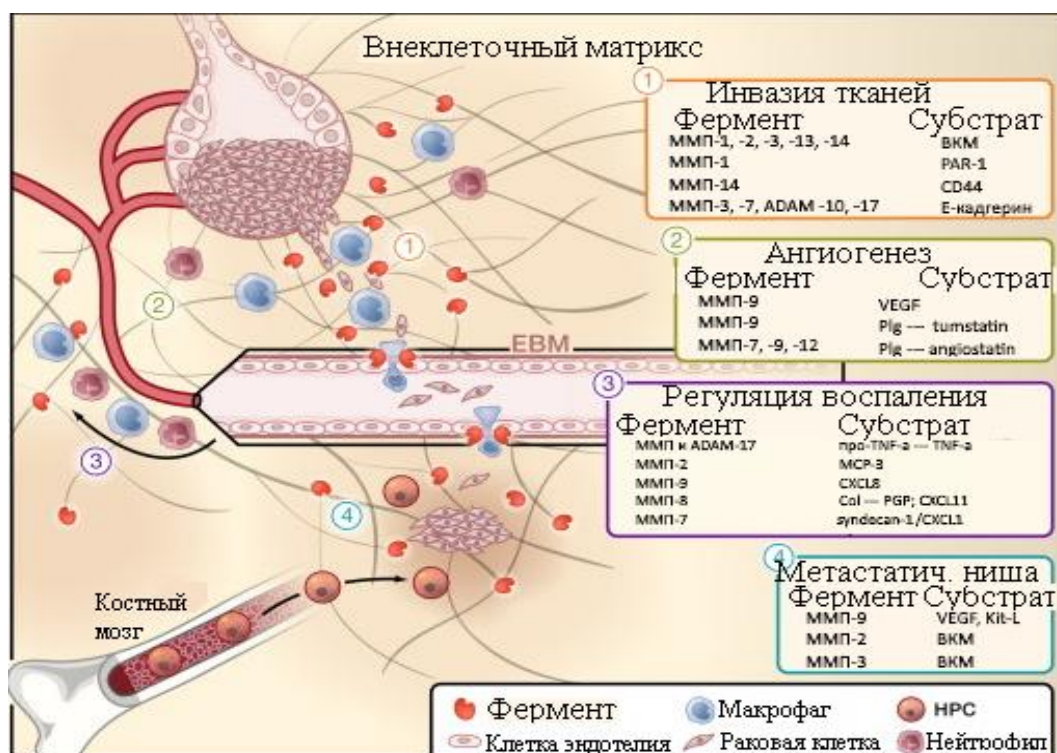
ММП являются важными представителями кальций-зависимых цинк-содержащих эндопептидаз, активных при нейтральном pH. Совокупность их физиологических функций представлена на рисунке 26.

В обычном состоянии активность ММП контролируются эндогенными ингибиторами (ТИММП 1-4) и процессами транскрипции, однако нарушение баланса ММП/ТИММП [124] приводит к возникновению следующих патологических процессов, представленных таблице 3.

Таблица 3 – Патологические процессы, в которых принимают участие ММП [77]

Патологический процесс	Нозология
1	2
Заболевания поджелудочной железы	Сахарный диабет 2-го типа
	Диабетическая нефропатия
Раневой процесс	Заболевания полости рта
Патологии почек	Клубочковые заболевания

1	2
Нейродегенеративные заболевания	Расеянный склероз
	Болезнь Паркинсона
	Болезнь Альцгеймера
	Боковой амиотрофический склероз
Сердечно-сосудистые заболевания	Гипертония
	Атеросклероз
	Инфаркт миокарда
	Аневризмы аорты
	Легочная артериальная гипертензия
Гинекологические заболевания	Синдром поликистозных яичников
	Самопроизвольный аборт
	Преэклампсия
Онкологические заболевания	
Воспалительные заболевания	



Примечание - ММП-матриксная металлопротеиназа; ADAM – семейство белковых пептидаз, адамализинов; ВКМ – внеклеточный матрикс; PAR-1 - протеиназо-активируемые рецепторы; CD44 - интегральный клеточный гликопротеин; Е-кадгерин – мембранный белок, основная молекула клеточной адгезии в эпителиальных тканях; VEGF - фактор роста эндотелия сосудов; Plg – плазминоген; tumstatin – тумстатин, белковый фрагмент, отщепленный от коллагена, который служит антиангиогенным и проапоптотическим агентом; angiostatin – ангиостатин, белок, ингибирующий ангиогенез; TNF- α – фактор некроза опухоли, внеклеточный белок, многофункциональный провоспалительный цитокин; MCP-3 – CCL7, хемотаксический белок-3 моноцитов человека; CXCL8 – интерлейкин 8, провоспалительный хемокин; Col – гликопротеин-Р; CXCL11 - хемокин 11 с мотивом C-X-C, белок, который у человека кодируется геном CXCL11; syndecan-1 - синдекан 1, мембранный белок, протеогликан семейства синдеканов, или трансмембранных гепарансульфатпротеогликанов; CXCL1 - хемокиновый лиганд 1; Kit-L – фактор роста стволовых клеток; НПС – ГСК, гемопоэтические стволовые клетки.

Рисунок 26 – Совокупность функций ММП (адаптировано из [141])

Таблица 4 – Классификация ММП по инициируемым ими нозологическим единицам [77, 224]

Номер ММП	Название фермента	Нозологические единицы
ММП-1	коллагеназа-1	Артрит, злокачественные заболевания, заболевания полости рта
ММП -2	желатиназа А	Злокачественные заболевания, инфаркт миокарда, angina pectoris (сердечный приступ), патологический ангиогенез
ММП -3	стромелизин-1	Злокачественные заболевания, артрит
ММП -7	матрилизин	Злокачественные заболевания
ММП -8	коллагеназа-2	-
ММП -9	желатиназа В	Злокачественные заболевания, инфаркт миокарда, angina pectoris (сердечный приступ)
ММП -10	стромелизин-2	-
ММП -11	стромелизин-3	Злокачественные заболевания
ММП -12	металлоэластаза	Эмфизема
ММП -13	коллагеназа-3	Артрит
ММП -14-17	мембранного типа	Злокачественные заболевания

Изменение экспрессии ММП может повлечь за собой деградацию ВКМ. Это имеет большое значение, поскольку разрушение ВКМ связано с такими процессами как эмбриональное развитие, ангиогенез, восстановление клеток, ремоделирование тканей и др. Изменение ВКМ является первопричиной развития хронических дегенеративных заболеваний и сосудистых осложнений. Кроме того, этот процесс связан с нейродегенерацией и прогрессированием онкологических заболеваний [52, 77].

В генезе патологических состояний основной интерес сосредоточен на балансе и взаимодействии ММП с их эндондогенными ингибиторами (ТИММП 1-4). Именно регуляция ММП/ТИММП играет важную роль в развитии воспаления, фиброзе тканей, аномальном ангиогенезе, деградации матрикса, активации микроглии, аутоиммунных заболеваниях и канцерогенезе [61], а также в процессах, которые включают в себя адгезию, пролиферацию, миграцию клеток и апоптоз [168].

1.4.1. Роль ММП в патогенезе сахарного диабета

За последние десятилетия число людей, страдающих сахарным диабетом (СД) значительно увеличилось. СД входит в первую десятку причин смерти в мире [249]. Сахарный диабет 2 типа (СД2) — это нарушение обмена веществ, характеризующееся высоким уровнем глюкозы в крови в результате изменения секреции или действия инсулина [63]. Для СД2

характерны аномальный жировой обмен, инсулинорезистентность, чрезмерное содержание глюкозы в печени, и др. СД повышает риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и гипергликемии. Гипергликемия вызывает окислительный стресс (ОС), который приводит к синтезу и активации ММП-9 в эндотелиальных клетках сосудов [220]. У людей с СД2 и артериальной гипертензией обнаружены высокие уровни соотношения ТИММП-1/ММП-2 и ТИММП-1/ММП-9, а также повышена секреция фактора некроза опухоли альфа (TNF- α), интерлейкинов 6 и 17 (ИЛ-6 и ИЛ-17) [77, 25]. Концентрация ММП-2 и ММП-9 повышена в крови пациентов, страдающих СД1 и СД2 [54]. ММП-2 лежит в основе патогенеза диабетической кардиомиопатии за счет увеличения содержания внеклеточного коллагена [151]. Нарушение баланса экспрессии ММП и ТИММП приводит к деградации ВКМ и нарушению регуляции ангиогенеза [77, 225]. Гиперэкспрессия ММП-2 и ММП-9 у детей, страдающих СД1, способствует микроангиопатии [100]. Таким образом ММП являются важными маркерами диабета и связанных с ним различных нарушений.

1.4.2 Роль ММП в процессе заживления ран

Заживление ран – это процесс восстановления целостности ткани после повреждения [172]. ММП вносят свой вклад во все фазы раневого процесса, регулируя приток иммунных клеток, облегчая миграцию фибробластов и кератиноцитов и ремоделирование рубцовой ткани. В первые сутки после получения раны ММП, в частности ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-9, ММП-11, ММП-12, ММП-13 и ММП-14 секретируются воспалительными клетками (лимфоциты, Т-макрофаги, моноциты и др.) и разрушают в ране ранее поврежденный матрикс. Нарушение регуляции протеаз приводит к длительному заживлению ран [173, 177, 194, 232].

1.4.3. Роль ММП в заболеваниях почек

Показано, что в почках экспрессируются ММП-2, ММП-3, ММП -9, ММП -13, ММП -14, ММП -24, ММП -25, ММП -27, ММП -28, а также эндогенные ингибиторы ТИММП-1, ТИММП -2 и ТИММП -3 [79, 251]. ММП-2 является важным фактором, ответственным за развитие гломерулосклероза, поскольку мезангиальные клетки с высокой экспрессией ММП-2 обладают большей пролиферативной способностью [178]. Уровень ММП-9 в моче напрямую коррелирует со степенью протеинурии — основного признака повреждения почек, который ускоряет

прогрессирование хронических заболеваний почек (ХБП) до их терминальной стадии, а также значительно увеличивает риск сердечно-сосудистых осложнений [195]. Многие исследователи сходятся во мнении, что прогрессирование ХБП может быть связано с индуцируемыми ММП-7 изменениями во внеклеточном матриксе почек [217]. Также высказывается мнение о том, что ММП-7 может быть более важным фактором, чем другие ММП, в патогенезе заболеваний почек [83, 248].

1.4.4. Роль ММП при заболеваниях тканей зубов

ММП играют важную роль в формирующем амелогенезе и дентиногенезе, в прогрессировании кариеса, воспалении пульпы и периапикальных тканей.

В процессе эмбриогенеза ММП-20 секретируется до ранней фазы созревания эмали и участвует в расщеплении амелогенина, эмалина и амелобластина. В экспериментах на мышах было показано, что ММП-2, -9, -13 экспрессируются в слизистой оболочке челюсти на этапе прорезывания зубов [109, 196].

Кариес – многофакторный процесс, при котором дисбаланс микрофлоры полости рта приводит к увеличению количества бактерий, таких как *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus*. ММП принимают участие в гидролизе органического матрикса деминерализованного дентина в процессе кариеса. ММП-2 провоцирует распространение кариеса под дентиноэмалевой границей [109]. Увеличение активности ММП-2 и ММП-9 наблюдается в дентинных канальцах и вблизи пульпы. Эксперименты *in vivo* показывают, что ингибиторы ММП тетрациклинового ряда (миноциклин, доксициклин и др.) способствуют уменьшению кариеса за счет своей ингибиторной активности по отношению к ММП [35, 241].

Пародонтит – это воспалительное заболевание тканей пародонта (тканей вокруг зуба), состоящий из множества соединительных тканей созданных ВКМ. При пародонтите зафиксирована гиперэкспрессия и активация различных ММП, таких как ММП -1, -2, -8, -9, -10, -14, -20. Избыточная активность ММП в пародонте может контролироваться за счет эндогенных ингибиторов, антител, направленных против ММП, а также синтетических ингибиторов ММП, таких как доксициклин [22, 24, 28, 186].

1.4.5. Роль ММП в нейродегенеративных заболеваниях

В центральной нервной системе (ЦНС) ММП-2 и ММП-9 экспрессируются нейрональными клетками, микроглией и астроцитами. Они разрушают ВКМ, что приводит к увеличению проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и повреждению миелинизированных нервных волокон [170].

ММП принимают участие в патогенезе болезней Альцгеймера и Паркинсона, а также рассеянного и бокового амиотрофического склероза [72, 94].

Болезнь Альцгеймера (БА) – наиболее распространённый тип деменции, которым в той или иной мере страдает около 10% людей старше 70-ти лет. Патогенез БА до настоящего времени остается окончательно не ясным, однако известно, что в ткани мозга происходит формирование бета-амилоидных (A β) бляшек, нейрофибриллярных клубков, а также гибель нейронов и синапсов.

В мозге при БА ММП-2 и ММП-9 экспрессируются, в основном, астроцитами. Провоспалительные цитокины (IL-1 β) также способны стимулировать гиперэкспрессию желатиназ [114, 170]. Экспрессия A β контролирует уровень секретируемых желатиназ, а частности ММП-2 [229]. Предполагают, что ММП-2 при БА играет защитную роль, а избыточная активность ММП-9 коррелирует с нейротоксичностью. Также показано, что уровень экспрессии ММП-9 контролирует ММП-3 [229].

Болезнь Паркинсона – второе по частоте встречаемости нейродегенеративное заболевание после болезни Альцгеймера. При болезни Паркинсона наблюдается гиперэкспрессия ММП [158]. Так, например, аномальная активность ММП-3 способствует разрушению дофаминергических нейронов [160]. Также у пациентов с болезнью Паркинсона в мозгу и спинномозговой жидкости наблюдается увеличение уровня ТИММП-1 и -2 [159].

В связи с тем, что дегенерация дофаминергической системы связано с гиперэкспрессией ММП, ингибиторы ММП могут быть перспективными для лечения болезни Паркинсона.

При рассеянном склерозе гиперэкспрессия ММП-1, -2, -3, -7, и -9 обнаружена вокруг пораженных тканей, а в очаге поражения экспрессируется ММП-12 [200]. Помимо этого, при рассеянном склерозе в плазме крови наблюдаются увеличение уровня ММП-9 и ее эндогенных ингибиторов ТИММП-1 и -2 [152].

Боковой амиотрофический склероз (БАС) - прогрессирующее заболевание нервной системы, при котором в тканях головного и спинного мозга поражаются моторные (двигательные) нервные клетки.

Показано, что при БАС ММП-2, ММП-9, а также ММП-3, могут оказывать прямое нейротоксическое действие за счет деградации белков ВКМ с последующим разрушением ГЭБ и усилением воспалительных процессов, что приводит к повреждению и гибели эндотелиальных клеток и астроцитов [77].

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одной из основных причин заболеваемости и смертности в мире. ЧМТ приводит к вазогенному отеку мозга из-за опосредованной ММП-9 дисфункции ГЭБ и как следствие к повышению внутричерепного давления [208].

1.4.6. Роль ММП в патогенезе онкологических заболеваний

Онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности в мире. От этой патологии в 2018 году в мире умерло 9,6 миллионов человек. Рак легких, предстательной железы, колоректальный рак, рак желудка и печени являются наиболее распространенными видами рака у мужчин, а рак молочной железы, колоректальный рак, рак легких, шейки матки и рак щитовидной железы наиболее распространены среди женщин [5].

Показано, что ММП принимают участие в процессе онкогенеза на нескольких этапах [108, 129]. Также известно, что нарушение баланса между ММП и их эндогенными ингибиторами ТИММП приводит к прогрессированию онкологических заболеваний [9, 76, 113].

Изначально ММП-2 была охарактеризована как фермент, способный разлагать коллаген базальной мембраны. Впоследствии в клинических исследованиях у больных раком гортани была доказана взаимосвязь между экспрессией ММП-2 и наличием метастазов в лимфатических узлах [29, 163]. Продукция ММП-2 опухолевыми клетками обеспечивает их инвазивный потенциал [117, 231].

ММП-9 в здоровых клетках организма принимает участие в процессе ангиогенеза, растворяя стромальные элементы, прокладывает путь для растущих капилляров [49, 57]. При наличии злокачественных новообразований ангиогенная активность ММП-9 способствует росту опухоли и интенсифицирует процесс метастазирования [7].

Показано, что ММП-3 играет важную роль в формировании рака молочной железы [204]. При исследовании особенностей формирования рака молочной железы на трансгенных мышах было показано, что при внедрении в опухоль трансгена человеческого тканевого ингибитора ТИММП-1 (эндогенный ингибитор ММП-3) рост злокачественной опухоли прекращался [29, 119].

ММП-7 была обнаружена в карциноме толстого кишечника, где секретировалась эпителием опухоли, а также в раке почек [10]. Сообщается также о том, что ММП-11 секретируется клетками стромы, окружающими опухоль, и на ранних стадиях онкогенеза, что способствует инвазии и имплантации опухолевых клеток [71].

Таким образом, имеющиеся к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что ММП обладают выраженной проонкогенной активностью, которая реализуется как на ранних стадиях развития злокачественных опухолей, так и в процессе инвазии и метастазирования опухолей.

1.4.7. Роль ММП в воспалительных процессах

ММП играют одну из ключевых ролей при псориазе, остеоартрите, артрите и др. ММП-13 и ММП-1 экспрессируются хондроцитами, при этом ММП-13 способна расщеплять коллаген II в 10 раз быстрее, чем ММП-1 [166]. Экспрессия этих ММП индуцируется за счет медиаторов воспаления, таких как IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-15 и TNF- α как на уровне мРНК, так и на уровне белка, что приводит к разрушению хряща. [94, 169].

Сопутствующая ревматоидному артриту гиперэкспрессия ММП-2, -3 и -9 способствует расщеплению компонентов матрикса суставов, а гиперэкспрессия ММП-13 и ММП-1 приводит к разрушению коллаген, агрекан и протеогликан ВКМ хряща [74].

Болезнь Крона — это хроническое, системное, воспалительное заболевание ЖКТ с образованием язв и рубцов на стенках кишечника и возможным формированием кишечной непроходимости. Известно, что ММП-9 является маркером воспаления при болезни Крона. Концентрация ММП-9 в крови и в тканях слизистой оболочки толстого кишечника коррелирует и зависит от активности заболевания [205].

Псориаз — это хроническое неинфекционное аутоиммунное воспалительное заболевание кожи [165]. При этой патологии ММП-13 и ММП-9 вовлечены в процесс структурных изменений кожи, который вызывается деградацией компонентов ВК, а также принимают участие в патологическом ангиогенезе, миграции кератиноцитов и замедлении эпителизации кожных дефектов [126].

ММП-9 играет важную роль в воспалении дыхательных путей. При бронхиальной астме была выявлена гиперэкспрессия ММП-9 в крови у детей [34]. У больных с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) было выявлено повышенное содержание ММП-9 за счет трансформирующего фактора роста бета (TGF- β), IL-1 β и TNF- α [40].

Во всех этих заболеваниях и других воспалительных процессах провоспалительные цитокины IL-1 β и TNF- α индуцируют активацию сигнальных путей, таких как MAPK, PI3K/AKT/mTOR и NF- κ B, что приводит к нарушению баланса ММП/ТИММП и гиперэкспрессии ММП [155]. Активированные ММП-2, ММП-3, ММП-7 и ММП-9 высвобождают из матрикса TGF- β и обеспечивают биодоступность некоторых ангиогенных факторов, таких как: васкулоэндотелиальный фактор роста (VEGF), рецептор фактора роста фибробластов (FGF), эпидермальный фактор роста (EGF) и инсулиноподобный фактор роста (IGF) [55, 77].

1.4.8. Роль ММП в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смертности населения в мире. По данным ВОЗ в мире в 2019 году от ССЗ умерло 17,9 миллиона человек. Это составляет 32% от всех случаев смерти в мире. 85 % этих смертей пришлось ишемическую болезнь сердца и инсульты. [3, 6].

Предположительно при постинфарктном ремоделировании миокарда основную роль играют ММП-2 и ММП-9 [77].

Гиперэкспрессия желатиназ коррелирует с дисфункцией левого желудочка (ЛЖ) сердца у больных ИМ [39]. Во время ИМ ММП-2/-9 приводят к деградации ВКМ, что способствует увеличению количества воспалительных клеток (полиморфноядерных лейкоцитов) необходимых для удаления некротизированных кардиомиоцитов [94]. Первоначально увеличенное количество воспалительных клеток (полиморфноядерных лейкоцитов) приводит к еще большей экспрессии ММП-2/-9, а затем и их эндогенных ингибиторов ТИММП. Эти процессы приводят к уменьшению соотношения ММП/ТИММП и ремоделированию миокарда. [38, 77, 99].

ММП-2 синтезируется кардиомиоцитами, фибробластами и эндотелиальными клетками и существует в тканях сердца в форме зимогенов [140] и активируется за счет окислительного стресса. ММП-2 экспрессируется как во время, так и после острой фазы ИМ. Уровень ММП-2 резко увеличивается в течение 4-х дней после ИМ, достигает пика на 7-й день и остается на максимуме до 14-ого дня после ИМ [214]. ММП-2 способствует острой механической дисфункции, которая возникает сразу после реперфузии [140] и приводит к увеличению риска хронической сердечной недостаточности (ХСН) в 2,5 раза. У пациентов с ХСН уровень ММП-2 в 4 раза больше как в плазме крови, так и в очаге ишемического некроза, чем у здоровых людей [46].

ММП-9 экспрессируется кардиомиоцитами, эндотелиальными клетками, нейтрофилами, макрофагами и фибробластами. Уровень ММП-9 начинает увеличиваться через несколько минут после ИМ, и достигает максимальной концентрации в течение 1-ого дня после ИМ и остается на высоком уровне до 7-го дня после ИМ. ММП-9 является прогностическим фактором развития ремоделирования ЛЖ после ИМ. [99]. Высокий уровень ММП-9 в плазме крови на ранних стадиях ИМ рассматривают как диагностический маркер развивающейся ХСН [23, 139]. Уровень ММП-9 в тканях миокарда повышается уже через несколько минут после ИМ и остается повышенным в течение первой недели [193]. Раннее повышение уровня ММП-9 после ИМ коррелирует с увеличением числа нейтрофилов, а позднее (на 2-4-й день) – с инфильтрацией макрофагов, что свидетельствует о важной роли ММП-9 в формировании различных стадий воспалительной реакции [44, 105]. У мышей, нокаутных по ММП-9, в зоне инфаркта снижается количество макрофагов, что приводит к уменьшению ремоделирования левого желудочка и уменьшению накопления коллагена [107, 242].

В 2006 году Hudson M.P. с соавт. опубликовали результаты клинического исследования ингибитора ММП PG-116800 (2-((4-(4-метоксибензамидо)фенил)сульфонамидо)-6-морфолино-4-гексиновая кислота) у больных с ОИМ [130]. В этом международном рандомизированном, двойном слепом, плацебо-контролируемом исследовании приняло участие 253 пациентов с ИМ, подъемом сегмента ST на ЭКГ и фракцией выброса от 15% до 40%. Через 24 часа после возникновения ИМ пациенты получали плацебо или PG-116800, терапия продолжалась в течение 90 дней. На основании анализа результатов исследования авторы пришли к заключению, что ингибирование матриксной металлопротеиназы с помощью PG-116800 не привело к уменьшению ремоделирования ЛЖ или улучшению клинических исходов после ИМ. Также было отмечено, что на фоне терапии PG-116800 было зафиксировано увеличение побочных эффектов со стороны опорно-двигательного аппарата.

На данный момент единственным зарегистрированным управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA, США) ингибитором ММП является полусинтетический антибиотик тетрациклинового ряда, доксициклин (глава 1.3.2.1.) [156]. Доксициклин в клинических испытаниях показал значительный кардиопротекторный эффект у больных ОИМ [81]. В этом рандомизированном плацебо-контролируемом исследовании, в котором приняло участие 110 пациентов (ФВ<40%), оценивали эффективность краткосрочной (7 дней) терапии доксициклином. Препарат назначали сразу же после первичного чрескожного коронарного вмешательства у пациентов с ОИМ. Показано, что краткосрочная терапия доксициклином значительно уменьшает негативное ремоделирование левого желудочка сердца: индекс конечно-диастолического объема левого желудочка (LVEDVi) у пациентов, получавших доксициклин, был статистически значимо ($p=0,012$) меньше; также статистически

значимо меньше был размер и степень тяжести инфаркта – соответственно $p = 0,052$ и $p = 0,014$. Ретроспективный анализ этого исследования, проведенный при помощи многомерного регрессионного анализа показал, что существует прямая статистически значимая корреляция между активностью в плазме крови ММП-2 и величиной LVEDVi - через 24 ч $p < 0,05$; и 7-й день: $p < 0,01$ [81]. Авторы этого исследования высказывают предположения о том, что акцептором действия доксициклина преимущественно является ММП-2. Однако из-за противомикробного действия [47] нет возможности применять его в клинической практике как ингибитор ММП-2/-9 для предотвращения ремоделирования ЛЖ сердца у пациентов с ОИМ.

На сегодняшний день в клиническую практику не введено ни одного ингибитора ММП-2/-9, однако часть соединений находится на стадии клинических испытаний (таблица 5).

1.5. Заключение

Анализ литературных данных, посвященных структуре, биологической роли ММП, а также их месту в генезе заболеваний показал, что эти протеазы могут рассматриваться как перспективные биомаркеры для поиска лекарственных средств для лечения сердечно-сосудистых, нейродегенеративных заболеваний, злокачественных новообразований и др.

Есть все основания полагать, что существенная роль в патогенезе ишемических состояний, в частности ишемической болезни сердца, принадлежит желатиназам ММП-2 и ММП-9, повышенная активность которых инициирует развитие патологического ремоделирования миокарда. Согласно проведенным исследованиям, в сыворотке крови пациентов во время острой фазы ишемического инсульта (ИИ) отмечается значительное повышение концентрации ММП-9 [92, 146]. ММП-2 играет роль на поздней стадии ишемии во время формирования глиального рубца в поврежденной области [92].

ММП-2 и ММП-9 принимают участие в механизме опухолевой инвазии и ангиогенеза при опухолевом росте за счет способности разрушать базальную мембрану и компоненты ВКМ [108].

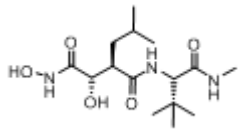
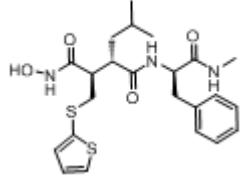
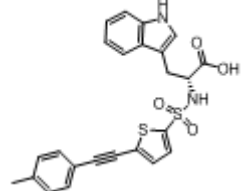
За счет отсутствия специфичности по отношению к другим металлоферментам и внутри семейства ММП, а также за счет низкой пероральной биодоступности, высокой токсичности и нестабильности соединений ингибиторы ММП не проходят клинические испытания. Единственным ингибитором ММП, одобренным для клинического применения, является известный антибиотик доксициклин (Periostat®, CollaGenex Pharmaceuticals Inc., США) [156], который используется для лечения пародонтита (20 мг/кг, 2 раза в день, *p.o.*) [179].

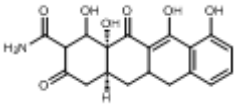
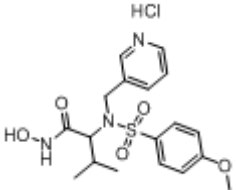
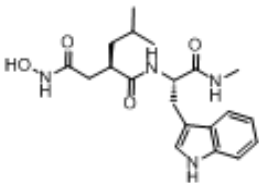
Исходя из сказанного, поиск новых, селективных ингибиторов ММП-2 и ММП-9 представляется актуальной задачей.

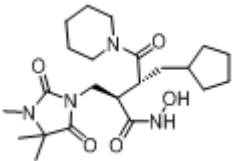
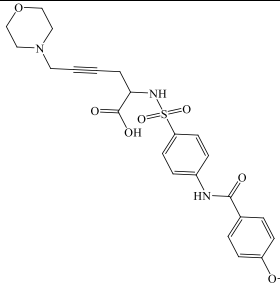
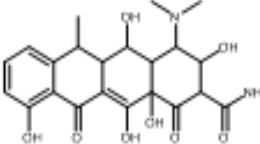
Полученные результаты опубликованы в обзорной статье с соавторами:

Григоркевич, О.С. Матриксные металлопротеиназы и их ингибиторы [Текст] / О.С. Григоркевич, Г.В. Мокров, Л.Ю. Косова // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2019. – №2. – С. 3-16 [18].

Таблица 5– Ингибиторы ММП, дошедшие до клинических исследований [66, 120, 148, 245]

№	Ингибитор ММП, компания разработчик	Структура	IC ₅₀ /K _i [94, 120, 148, 210, 245]	Показания	Статус	Спонсор исследования	Ссылки на клинические исследования
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Маримастат (BB-2516), British Biotech (Великобритания)		IC₅₀ ММП-1 5*10 ⁻⁹ М ММП-2 6*10 ⁻⁹ М ММП-3 2*10 ⁻⁷ М ММП-7 2*10 ⁻⁸ М ММП-8 2*10 ⁻⁹ М ММП-9 3*10 ⁻⁹ М ММП-14 1,8*10 ⁻⁹ М	Рак молочной железы Рак легких	Фаза III, 2004 г Фаза III, 2004 г	Eastern Cooperative Oncology Group (США) ILEX Oncology Services, Incorporated (США)	[88, 89]
2	Батимастат (BB-94), British Biotech (Великобритания)		IC₅₀ ММП-1 1*10 ⁻⁸ М ММП-2 4*10 ⁻⁹ М ММП-3 2*10 ⁻⁸ М ММП-8 1*10 ⁻⁸ М ММП-9 1*10 ⁻⁹ М ММП-14 3*10 ⁻⁹ М	Злокачественный асцит	Фаза II, 1994 г	British Biotech (Великобритания)	[127]
3	S-3304, Shionogi & Co. Ltd (Япония)		IC₅₀ ММП-2 2*10 ⁻⁹ М ММП-9 1*10 ⁻⁸ М	Рак легких	Фаза II, 2006 г	Shionogi (Япония)	[85, 90]

1	2	3	4	5	6	7	8
4	COL-3 (NSC-683551), CollaGenex Pharmaceuticals, Inc. (США)		IC50 ММП-1 $34 \cdot 10^{-6}$ г/мл ММП-8 $48 \cdot 10^{-6}$ г/мл ММП-13 $0,3 \cdot 10^{-6}$ г/мл	Колоректальный рак саркома Капоши	Фаза I, 2003 г Фаза II, 2006 г	National Cancer Institute (NCI) (США) NCI (США)	[84, 104]
5	CGS-27023A, Novartis International AG (Швейцария)		IC50 ММП-1 $33 \cdot 10^{-9}$ М ММП-2 $11 \cdot 10^{-9}$ М ММП-3 $13 \cdot 10^{-9}$ М ММП-9 $8 \cdot 10^{-9}$ М ММП-12 $7,7 \cdot 10^{-9}$ М ММП-13 $6 \cdot 10^{-9}$ М Ki ММП-1 $3 \cdot 10^{-9}$ М ММП-2 $2 \cdot 10^{-8}$ М ММП-3 $1,5 \cdot 10^{-7}$ М ММП-8 $1,9 \cdot 10^{-9}$ М	Колоректальный рак	Фаза II, 2004 г	Novartis (Швейцария)	[60]
6	Иломастат, University Florida (США) of		IC50 ММП-1 $0,4 \cdot 10^{-9}$ М ММП-2 $0,4 \cdot 10^{-9}$ М ММП-3 $0,19 \cdot 10^{-9}$ М ММП-14 $5,2 \cdot 10^{-9}$ М Ki ММП-1 $0,4 \cdot 10^{-9}$ М ММП-2 $0,39 \cdot 10^{-9}$ М ММП-3 $26 \cdot 10^{-9}$ М ММП-8 $0,18 \cdot 10^{-9}$ М ММП-9 $0,2 \cdot 10^{-9}$ М	Язва роговицы	Фаза II, 1994 г	Glycomed Inc. (США)	[115]

1	2	3	4	5	6	7	8
7	RO-32-3555, Roche Holding (Швейцария)		Ki ММП-1 $3 \cdot 10^{-9}$ М ММП-2 $1,5 \cdot 10^{-7}$ М ММП-3 $5,3 \cdot 10^{-7}$ М ММП-8 $4 \cdot 10^{-9}$ М ММП-9 $59 \cdot 10^{-9}$ М ММП-13 $3 \cdot 10^{-9}$ М	Артрит	Фаза III, 2004	Roche Holding (Швейцария)	[164, 179, 235]
9	PG-116800, The Procter & Gamble Company (США)		IC50 ММП-1 $1,1 \cdot 10^{-6}$ М ММП-2 $0,5 \cdot 10^{-9}$ М ММП-3 $7,5 \cdot 10^{-9}$ М ММП-7 $1,6 \cdot 10^{-6}$ М ММП-8 $0,86 \cdot 10^{-9}$ М ММП-9 $1,5 \cdot 10^{-9}$ М ММП-13 $0,43 \cdot 10^{-9}$ М	Постинфарктное ремоделирование миокарда	Фаза II, 2004 г	Procter and Gamble (США)	[130]
9	Доксициклин, Pfizer Inc.		IC50 ММП-1 $>400 \cdot 10^{-6}$ М ММП-2 $1,3 \cdot 10^{-4}$ М ММП-3 $3 \cdot 10^{-5}$ М ММП-7 $2,8 \cdot 10^{-5}$ М ММП-9 $1,6 \cdot 10^{-4}$ М ММП-13 $2 \cdot 10^{-6}$ М	Постинфарктное ремоделирование миокарда Амилоидоз сердца Укрепление сердечной мышцы после сердечного приступа	Фаза II, 2011 г Фаза III, 2023 г Фаза II, 2025 г	Careggi Hospital (Италия) IRCCS Policlinico S. Matteo (Италия) University of Alberta (Канада)	[86, 87, 91]

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Молекулярный докинг

В данном исследовании был выполнен молекулярный докинг с применением программного обеспечения Glide версии 2022-4 build 134 от Schrödinger с целью выявления потенциальных соединений, способных связываться с ферментами ММП-2 и ММП-9, используя соответствующие кристаллические структуры из Protein Data Bank (PDB), в данном случае PDB ID: 1HOV (ММП-2 с SC-74020) и PDB ID: 5CUH (ММП-9 с LTQ). Для этого исследуемые соединения были предварительно подготовлены с помощью инструмента LigPrep силовое поле OPLS4, а структуры ферментов были обработаны с использованием инструмента Protein Preparation Wizard в программе Maestro 13.5 от Schrödinger. При этом были выполнены различные этапы, включающие удаление воды и нативных ингибиторов, добавление недостающих атомов и ионов, исправление пропущенных атомов, а также оптимизация геометрии протеина. Подготовка соединений также осуществлялась с помощью инструмента LigPrep в среде Maestro 13.5 согласно протоколу [70, 197]. Для определения позиции докируемого центра были выделены нативные ингибиторы из структур PDB 1HOV (RMSD = 1,730) или PDB 5CUH (RMSD = 0,652) и использованы для генерации гридбокса вокруг молекулы SC-74020 или LTQ равноудаленным на 20 Å. Этот докируемый центр был равномерно распределен вокруг молекулы SC-74020 или LTQ с целью охвата потенциальных участков связывания активного центра ММП-2 или ММП-9, способных образовывать связи с соответствующим ферментом. Молекулярный докинг был проведен для предложенных соединений с использованием программы Glide версии 2022-4 build 134, с алгоритмом XP высокого предсказания. Для оценки связывания ингибитор-цинк использовали модуль Epik. После докинга была выполнена визуализация докированных комплексов в программе Maestro 13.5 для анализа взаимодействий между ингибитором и ферментом, а также для оценки их связывающего потенциала (рисунок 27).

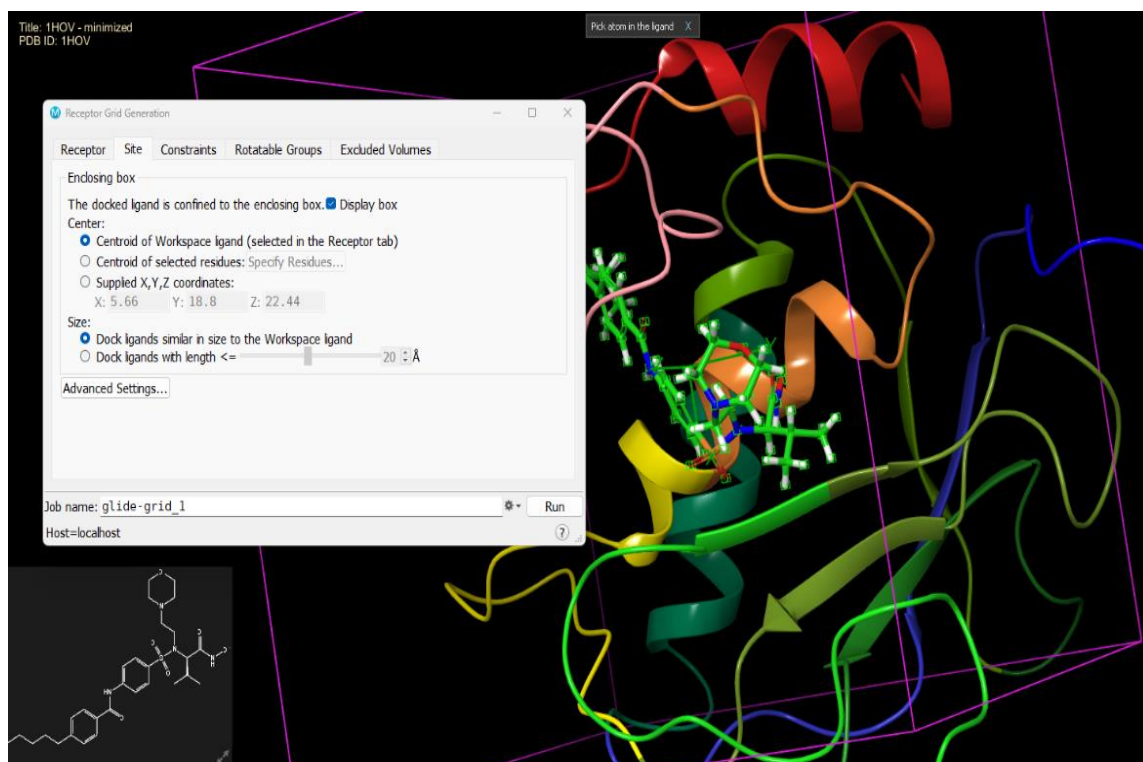


Рисунок 27 – Координаты сетки стыковки на расстоянии 20 Å от лиганда SC-74020 в активном центре 1HOV проекция 3D.

2.2. Экспериментальная химическая часть

2.2.1. Исходные вещества и вспомогательные реагенты

Исходные вещества: использовали коммерческие п-хлорбензоилхлорид («Alfa Aesar», Великобритания), о-хлорбензоилхлорид («Alfa Aesar», Великобритания), п-фторбензоилхлорид («Alfa Aesar», Великобритания), о,п-дихлорбензоилхлорид («Alfa Aesar», Великобритания), анилин («Sigma», США), 2,6-диметиланилин («Sigma», США).

N-бензамиды. Исходные N-бензамиды были получены с использованием стандартных методик [96, 188, 212, 221, 230]: 4-хлорфенил-N-бензамид (т.пл. 194-196 °C); 2-хлорфенил-N-бензамид (т.пл. 116-118 °C); 4-фторфенил-N-бензамид (т.пл. 183-184 °C); 2,4-дихлорфенил-N-бензамид (т.пл. 142-145 °C); 4-хлор-N-(2,6-диметилфенил)бензамид (т.пл. 175-176 °C).

Реагенты: триэтиламин («Acros Organics», Германия), этилацетат («Химмед», РФ), хлорсульфоновая кислота («Merk», Германия), L-пролин («Reanal», Венгрия), гидроксид натрия («Химмед», РФ), соляная кислота («Химмед», РФ), D,L-пиперидин-2-карбоновая кислота

(«abcg», Германия), L-оксипролин («Reanal», Венгрия), N-метилантраниловая кислота («Реахим», РФ), тетрагидрофуран («Химмед», РФ), дихлорметан («Химмед», РФ), ацетон (АО «ЭКОС-1», РФ), силикагеле 60 Å, с размером частиц 130-270 меш. («Sigma Aldrich», США).

Используемые растворители и реагенты очищали стандартными методами [2].

2.2.2. Аналитические методы

Для определения состава и строения полученных соединений нами были использованы следующие аналитические методы.

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Для ВЭЖХ использовали хроматографическую систему со спектрофотометрическим детектором Wellchrom 2001 («KNAUER», Германия) на обращено-фазовом сорбенте. Стальная аналитическая колонка 250 × 4,6 мм Диасфер-С16, 5 мкм («BioChemMack», РФ). Объем петли – 20 мкл. Подвижная фаза А (0,5 мл раствор ТФУ в 50 мл ацетонитрила и 950 мл воды), подвижная фаза Б (0,5 мл раствор ТФУ в ацетонитриле). Режим хроматографического элюирования 1: градиент: от 0% до 100% Б (0 – 30 мин), 100% Б (30 – 35 мин), от 100% до 0% Б (35 – 36 мин), 0% Б (36 – 40 мин). Режим хроматографического элюирования 2: градиент: от 0% до 38% Б (0 – 10 мин), от 38% до 100% Б (10 – 11 мин), 100 % Б (11-16 мин), от 100% до 0% Б (16 –17 мин), 0% Б (17 – 21 мин).

Скорость потока 0,9 мл/мин. Детектирование при длине волны 220 нм. Анализ проводили при комнатной температуре.

Хроматография в тонком слое силикагеля. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинах Kieselgel 60 («Merck», Германия). Использованы системы растворителей: гексан-этилацетат = 2:1 (А); хлороформ-метанол-вода =26:14:3 (Б); хлороформ:метанол =1:1 (В); диоксан:вода=9:1 (Г). Значения R_f соответственно обозначены: $R_f(X)$ – значение R_f в системе X; X = А, Б, В или Г. Качественное обнаружение соединений на ТСХ проводили облучением в УФ-свете при длине волны 254 нм с помощью УФ-лампы («Vilber Lourmat», Франция).

ЯМР-спектроскопия. Спектры регистрировали при 18 °С в растворах ДМСО-*d*6 или CDCl₃ в шкале δ , м.д. ¹H- и ¹³C- ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре Bruker Fourier 300 (Германия) с рабочей частотой 300 МГц. В качестве внутреннего стандарта использовали тетраметилсилан.

Температуру плавления синтезированных соединений измеряли в открытых капиллярах с использованием автоматического прибора OptiMelt MPA 100 («Stanford Research Systems», США) и не корректировали.

Поляриметрия. Величины оптического вращения измеряли на автоматическом цифровом поляриметре ADP 440 («Bellingham and Stanley», Великобритания) при длине волны линии D спектра натрия (589,3 нм) и длине кюветы 0,5 дм.

Величины удельных оптических вращений рассчитывали по формуле:

$$[\alpha]_D = (\alpha \times V) / (l \times a), \text{ где}$$

α – наблюдаемое оптическое вращение в градусах; V – объем раствора в мл; l – толщина слоя в дм; a – навеска вещества в г.

Элементный анализ проводили на приборе для определения углерода и водорода с четырьмя электрическими печами (600-900 °С, тип МА-Г/6Р, завод ЛЭТО, Россия) в токе кислорода и на аппарате для определения азота с тремя такими же электрическими печами в токе углекислого газа. Данные элементного анализа соединений относительно процентного содержания С, Н и N отклоняются от теоретических данных не более чем на 0,4%.

Масс-спектрометрия. Для получения масс-спектра соединения растворяли в 1% ДМСО/ 0,1% муравьиной кислоте в ацетонитриле/ 0,1% муравьиной кислоте в воде (по объему) с конечной концентрацией = 0.1 мМ через шприцевой насос (скорость потока - 5 мкл/мин) при ионизации электроспреем (H-ESI режим) на масс-спектрометре по типу - тройной квадруполь TSQ Altis (серийный № TSQ-A-10461, производитель «ThermoFisher Scientific», США). Проводили сканирование в режиме полного ионного тока при регистрации положительных ионов (positive Q1(TIC - total ion current, full) mode). Для регистрации и обработки данных использовали программное обеспечение «Xcalibur» (v.4.2.28.14, «ThermoFisher Scientific», США).

2.2.3. Синтез производных L-пролина и его циклических аналогов

Для синтеза производных L-пролина и его циклических аналогов был отобран наиболее простой, быстрый и дешевый метод, позволяющий достигнуть высоких выходов (более 70%). Реакция протекает в воде в присутствии гидроксида натрия, при температуре 75°C. Жесткие условия проведения реакции не приводят к рацемизации L-пролина и его циклических аналогов, что являлось важнейшим условием [101]. Исходные арилсульфонилхлориды были получены аналогично описанной ранее методике [96].

1-({4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-L-пролин (I(АЛ-828))

4-[(4-хлорбензоил)амино]бензолсульфонилхлорид. К 500 ммоль (58,26 г) хлорсульфоновой кислоты присыпали при перемешивании 100 ммоль (23,17 г) 4-хлорфенил-N-бензамида и перемешивали смесь при температуре 45°C в течение 4 ч, после чего ее при перемешивании

выливали в 300 г льда. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой до нейтрального значения среды и сушили при температуре 80°C в течение 3 ч, получая 24,75 г 4-[(4-хлорбензоил)амино]бензолсульфонилхлорида в виде белого порошка. Выход 75%. Т.пл. 163-165°C. $R_f = 0,67$ (А). ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 7.58 (д, 2 H, C^3H , C^5H , $^3J = 8.5$ Гц); 7.60 (д, 2H, C^3H , C^5H , $^3J = 8.4$ Гц); 7.73 (д, 2H, C^2H , C^6H , $^3J = 8.5$ Гц); 7.99 (д, 2 H, C^2H , C^6H , $^3J = 8.4$ Гц); 10.43 (с, 1 H, NH)

1-({4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-L-пролин (I(АЛ-828))). К раствору 12 ммоль (1,4 г) L-пролина и 24 ммоль (1,2 г) гидроксида натрия в 50 мл воды присыпали 12 ммоль (4,0 г) 4-[(4-хлорбензоил)амино]бензолсульфонилхлорида и реакционную смесь перемешивали при температуре 75°C в течение 45 минут, после чего – в течение суток при комнатной температуре. Затем к раствору прикапывали 0,1 М HCl до значения pH 1, выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой до нейтрального значения среды и сушили при 80°C в течение трех часов, получая 3,6 г 1-({4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-L-пролина в виде белый порошка. Выход 70% очищенного продукта (чистота 90 % по данным ОФ ВЭЖХ (режим элюирования 1), время удерживания $\tau = 19,20$ мин). Т.пл. 215-217°C. $[\alpha]^{22}_D -84^\circ$ (с 1, метанол). $R_f = 0,56$ (Б). Элементный анализ: найдено (%): C, 52.69; H, 4.28; N, 6.85; S, 7.64; Cl, 8.69. $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_5\text{SCl}$. вычислено (%): C, 52.88; H, 4.19; N, 6.85; S, 7.84; Cl, 8.67. ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 1.56, 1.85 (уш. м, 4 H, $\text{ProC}^\beta\text{H}_2$, , $\text{ProC}^\gamma\text{H}_2$); 3.16, 3.36 (два м, 2 H, $\text{ProC}^\delta\text{H}_2$); 4.10 (дд, 1 H, $\text{ProC}^\alpha\text{H}$, $^3J = 7.8$ Гц; $^3J = 4.4$ Гц); 7.64 (д, 2 H, C^3H , C^5H , $^3J = 8.8$ Гц); 7.83 (д, 2 H, C^3H , C^5H , $^3J = 8.8$ Гц); 8.00 (д, 2 H, C^2H , C^6H , $^3J = 8.8$ Гц); 8.02 (д, 2 H, C^2H , C^6H , $^3J = 8.8$ Гц); 10.69 (с, 1 H, NH). H-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+ - 409,17; 411,03$ m/z.

1-({4-[(2-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-L-пролин (II(МЛ-269)))

4-[(2-хлорбензоил)амино]бензолсульфонилхлорид. Получали аналогично 4-[(4-хлорбензоил)амино]бензолсульфонилхлориду из хлорсульфоновой кислоты и 2-хлорфенил-N-бензамида. Белый порошок. Выход 77%. Т.пл. 121-123°C. $R_f = 0,48$ (А). ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 7.42-7.61 (м и д, 6 H, C^3H , C^5H , C^3H , C^4H ; C^5H , C^6H , $^3J = 8.8$ Гц); 7.66 (д, 2 H, C^2H , C^6H , $^3J = 8.8$ Гц); 10.57 (с, 1 H, NH).

1-({4-[(2-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-L-пролин (II(МЛ-269))). Получали аналогично АЛ-828 из L-пролина и 4-[(2-хлорбензоил)амино]бензолсульфонилхлорида. Белый порошок. Выход 72%. Т.пл. 215-217°C. $[\alpha]^{22}_D -87^\circ$ (с 1, метанол). $R_f = 0,72$ (Б). Элементный анализ: найдено (%): C, 52.82; H, 4.44; N, 6.95; S, 7.80; Cl, 8.67. $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_5\text{SCl}$. вычислено (%): C, 52.88; H, 4.19; N, 6.85; S, 7.84; Cl, 8.67. ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 1.60, 1.85 (два м, 4 H, $\text{ProC}^\gamma\text{H}_2$, $\text{ProC}^\beta\text{H}_2$); 3.18, 3.38 (два м, 2 H, $\text{ProC}^\delta\text{H}_2$); 4.10 (дд, 1 H, $\text{ProC}^\alpha\text{H}$, $^3J = 8.1$ Гц; $^3J = 4.4$ Гц); 7.43-7.66 (м, 4 H, C^3H , C^4H , C^5H , C^6H); 7.83 (д, 2 H, C^3H , C^5H , $^3J = 8.8$ Гц); 7.95 (д, 2 H, C^2H , C^6H , $^3J = 8.8$ Гц); 10.96 (с, 1 H, NH).

1-({4-[(4-фторбензоил)амино]фенил}сульфонил-L-пролин (III(КМ-29))

4-[(4-фторбензоил)амино]бензолсульфонилхлорид. Получали аналогично 4-[(4-хлорбензоил)амино]бензолсульфонилхлориду из хлорсульфоновой кислоты и 4-фторофенил-N-бензамида. Белый порошок. Выход 75%. Т.пл. 210-211°C. $R_f = 0,81$ (А). ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 7.36 (т, 2 H, C^3H , C^5H , $^3J_1 = ^3J_2 = 8.8$ Гц); 7.59 (д, 2 H, C^3H , C^5H , $^3J = 8.3$ Гц); 7.75 (д, 2 H, C^2H , C^6H , $^3J = 8.3$ Гц); 8.06 (м, 2 H, C^2H , C^6H); 10.38 (с, 1 H, NH).

1-({4-[(4-фторбензоил)амино]фенил}сульфонил-L-пролин (III(КМ-29))). Получали аналогично АЛ-828 из L-пролина и 4-[(4-фторбензоил)амино]бензолсульфонилхлорида. Белый порошок. Выход 69%. Т.пл. 96-97°C. $[\alpha]^{22}_D - 111^\circ$ (с 1, метанол). $R_f = 0,71$ (Б). Элементный анализ: найдено (%): С, 55.01; Н, 4.19; N, 7.37; S, 8.17. $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_5\text{SF}$. вычислено (%): С, 55.10; Н, 4.37; N, 7.14; S, 8.17. ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 1.56, 1.86 (два м, 4 H, $\text{ProC}^\alpha\text{H}_2$, $\text{ProC}^\beta\text{H}_2$); 3.17, 3.36 (два м, 2 H, $\text{ProC}^\delta\text{H}_2$); 4.10 (дд, 1 H, $\text{ProC}^\alpha\text{H}$, $^3J = 8.1$ Гц; $^3J = 4.4$ Гц); 7.38 (д-д, 2 H, C^3H , C^5H , $^3J_1 = ^3J_2 = 8.8$ Гц); 7.83 (д, 2 H, C^3H , C^5H , $^3J = 8.8$ Гц); 8.02 (д, 2 H, C^2H , C^6H , $^3J = 8.8$ Гц); 8.05 (д, 2 H, C^2H , C^6H , $^3J = 8.8$ Гц); 10.64 (с, 1 H, NH).

1-({4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил)-2-пиперидинкарбоновая кислота (IV(МЛ-292))

При попытке провести реакцию взаимодействия L,D-пипеколиновой кислоты с соответствующими производными арилсульфонилхлорида аналогично реакции с L-пролином, выход оказался недостаточно высоким. В связи с этим реакцию проводили другим методом, в присутствии более щадящего основания, избытка триэтиламина, в растворе вода/тетрагидрофуран в соотношении 1/1 без нагревания [101].

1-({4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил)-2-пиперидинкарбоновая кислота (IV(МЛ-292)). К раствору 15 ммоль (1,94 г) D,L-пипеколиновой кислоты и 50 ммоль (5,06 г) триэтиламина в 20 мл воды и 20 мл тетрагидрофурана прибавляли 12 ммоль (4,0 г) 4-[(4-хлорбензоил)амино]бензолсульфонилхлорида и реакционную смесь перемешивали в течение суток. К раствору прибавляли 35 мл дихлорметана и прикапывали 0,1 М HCl до значения pH = 1 для водного слоя. Смесь перемешивали, органический слой отделяли, промывали водой, профильтровывали через бумажный фильтр и упаривали досуха. Остаток перекристаллизовывали из смеси дихлорметан-гексан (1:1) и сушили при 80°C в течение 3 часов, получая 3,15 г 1-({4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил)-2-пиперидинкарбоновую кислоту в виде белого порошка. Выход 62%. Т.пл. 102-107°C. $R_f = 0,87$ (Б). Элементный анализ: найдено (%): С, 53.88; Н, 4.75; N, 6.34; S, 7.70; Cl, 8.48. $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_5\text{SCl}$. вычислено (%): С, 53.97; Н, 4.53; N, 6.62; S, 7.58; Cl, 8.38. ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 1.02-2.08 (м, 6 H, PprC^3H_2 , PprC^4H_2 и PprC^5H_2); 3.19, 3.65 (оба м, по 1 H, PprC^6H_2); 4.56 (м, 1 H, PprC^2H); 7.63 (д, 2 H, C^3H , C^5H , $^3J =$

8.8 Гц); 7.78 (д, 2 Н, C³H, C⁵H, ³J = 8.8 Гц); 7.98 (д, 2 Н, C²H, C⁶H, ³J = 8.8 Гц); 8.01 (д, 2 Н, C²H, C⁶H, ³J = 8.8 Гц); 10.66 (с, 1 Н, NH).

1-({4-[(2-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил)-2-пиперидинкарбоновая кислота (V(МЛ-293))

Получали аналогично IV(МЛ-292) из D,L-пипеколиновой кислоты и 4-[(2-хлорбензоил)амино]бензолсульфонилхлорида. Белый порошок. Выход 67%. Т.пл. 210-212 °С. R_f = 0,87 (Б). Элементный анализ: найдено (%): С, 54.09; Н, 4.50; N, 6.79; S, 7.35; Cl, 8.30. C₁₉H₁₉N₂O₅SCl. вычислено (%): С, 53.97; Н, 4.53; N, 6.62; S, 7.58; Cl, 8.38. ЯМР ¹H (ДМСО-*d*₆, δ, м.д.): 1.23-1.78 (м, 6 Н, PprC³H₂, PprC⁴H₂ и PprC⁵H₂); 3.30, 3.76 (оба м, по 1 Н, PprC⁶H₂); 4.69 (м, 1 Н, PprC²H); 7.43-7.67 (м, 4 Н, C³H, C⁴H, C⁵H, C⁶H); 7.83 (д, 2 Н, C³H, C⁵H, ³J = 8.8 Гц); 8.01 (д, 2 Н, C²H, C⁶H, ³J = 8.8 Гц); 10.16 (с, 1 Н, NH).

1-({4-[4-хлорбензамино]-3,5-диметилфенил}сульфонил)-L-пролин (VI(ГО-10))

4-(4-хлоробензамино)-3,5-диметилбензенсульфонилхлорид. Получали аналогично 4-[(4-хлорбензоил)амино]бензолсульфонилхлориду из хлорсульфоновой кислоты и 4-хлор-N-(2,6-диметилфенил)бензамида. Белый порошок. Выход 70%. Т.пл. 140-141 °С. R_f = 0,95 (А). ЯМР ¹H (ДМСО-*d*₆, δ, м.д.): 2.15 (3Н, с, CH₃(3)), 2,4 (3Н, с, CH₃(5)); 7.07 (1Н, д, C³H, ³J = 7.8 Гц); 7.6 (2Н, д, C²H, C⁶H, ³J = 7.3 Гц); 7,64 (1Н, д, C⁵H, ³J = 7.8 Гц), 8.03 (2Н, д, C²H, C⁶H, ³J = 8.2); 9.86 (с, 1Н, NH).

1-({4-[4-хлорбензамино]-3,5-диметилфенил}сульфонил)-L-пролин (VI(ГО-10)). Получали аналогично I(АЛ-828) из L-пролина и 4-(4-хлоробензамино)-3,5-диметилбензенсульфонилхлорида. Белый порошок. Выход 71%. Т.пл. 124-125 °С. [α]²²_D -60° (с 1, метанол). R_f = 0,86 (Б). ЯМР ¹H (ДМСО-*d*₆, δ, м.д.): 1.93, 2.15 (4Н, два м, ProC^βH₂, ProC^γH₂); 2.25, 2.44 (6Н, два с, CH₃(3), CH₃(5)); 3.26, 3.33 (2Н, два м, ProC^δH₂); 4.28 (1Н, дд, ProC^αH, ³J = 8.9 Гц, ³J = 2.5 Гц); 7.37 (1Н, д, C²H, ³J = 8.3 Гц); 7.62 (2Н, м, C³H, C⁵H); 7.76 (1Н, д, C⁶H, ³J = 8.2 Гц); 8.03 (2Н, м, C²H, C⁶H); 10.07 (1Н, с, NH).

1-({4-[4-хлоробензамино]-3,5-диметилфенил}сульфонил)-пиперидин-2-карбоновая кислота (VII(ГО-47))

Получали аналогично IV(МЛ-292) из D,L-пипеколиновой кислоты и 4-хлор-N-(2,6-диметилфенил)бензамида. Белый порошок. Выход 57 %. Т.пл. 138-140 °С. R_f = 0,64 (Б). Элементный анализ: ЯМР ¹H (ДМСО-*d*₆, δ, м.д.): 1,25 (2Н, м, PprC⁴H₂); 1,63 (3Н, м, PprC³H₂, PprC⁵H); 2.08 (1Н м, PprC⁵H); 2.24, 2.38 (6Н, два с., CH₃(3), CH₃(5)); 3.33 (2Н, м, PprC⁶H₂); 4.46 (1Н, с, PprC²H); 7.36 (1Н д, C²H, ³J = 8.2 Гц); 7.64 (2Н, д, C³H, C⁵H, ³J = 8.5 Гц); 7.82 (1Н, д, C⁶H, ³J = 8.2 Гц); 8.02 (2Н, д, C²H, C⁶H, ³J = 8.5 Гц); 10.05 (1Н, с, NH).

1-({4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил)-(2S,4R)-4-гидрокси-2-пирролидин-2-карбоновая кислота (VIII(ГГМ-10))

Получали аналогично I(АЛ-828) из L-гидроксипролина и 4-[(4-хлорбензоил)амино]бензолсульфонилхлорида. Белый порошок. Выход 17%. Т.пл. 132-134 °С(разл.). $[\alpha]^{22}_D$ -85° (с 1, метанол). R_f = 0,37 (Б). ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 1.96 (уш. м, 2 H, $\text{ProC}^\beta\text{H}_2$); 3.13 (м, 1 H, $\text{ProC}^\delta\text{H}$); 3.46 (м, 2 H, $\text{ProC}^\delta\text{H}$, $\text{ProC}^\gamma\text{H}$); 4.06 (м, 1 H, $\text{ProC}^\alpha\text{H}$); 4.22 (с, 1 H, CH-OH); 7.64 (м, 2 H, C^3H , C^5H); 7.81 (м, 2 H, C^2H , C^6H); 7.99 (м., 4 H, C^2H , C^3H , C^5H , C^6H); 10.67 (с, 1 H, NH), 12.77 (с, 1 H, C(O)-OH).

1-({4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-о-(N-метиламино)бензойная кислота (IX(ГГМ-14))

Получали аналогично I(АЛ-828) из N-метилантрапиновой кислоты и 4-[(4-хлорбензоил)амино]бензолсульфонилхлорида. Белый порошок. Выход 40 %. R_f = 0,81 (Б). Т.пл. 199-201 °С (разл.). Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 3.17 (с, 3 H, CH_3); 6.87 (м, 1 H, $\text{C}^{6''}\text{H}$); 7.6 (м, 2 H, C^3H , C^5H); 7.62 (м, 4 H, $\text{C}^{4''}\text{H}$, C^2H , $\text{C}^{6'}\text{H}$, $\text{C}^{3''}\text{H}$); 7.65 (м, 1 H, $\text{C}^{5''}\text{H}$); 7.74 (м, 4 H, C^2H , C^6H , C^3H , C^5H); 10.71 (с, 1 H, NH), 12.95 (с, 1 H, C(O)-OH).

1-({4-[(2,4-дихлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-(2S,4R)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновая кислота (X(ГГМ-27))

4-[(2,4-дихлорбензоил)амино]бензолсульфонилхлорид. Получали аналогично 4-[(4-хлорбензоил)амино]бензолсульфонилхлориду из хлорсульфоновой кислоты и 2,4-дихлорфенил-N-бензамида. Белый порошок. Выход 69%. Т.пл. 121-122 °С. R_f = 0,94 (Б). Элементный анализ: найдено (%): C, 42.31; H, 2.49; N, 4.07; S, 8.79; Cl, 29.17. $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{NO}_3\text{SCl}_3$. вычислено (%): C, 42.82; H, 2.21; N, 3.84; S, 8.79; O, 13.16; Cl, 29.17. ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 7.51-7.75 (м, 7 H, C^2H , C^3H , C^5H , C^6H , C^3H , C^5H , C^6H); 10.66 (с, 1 H, NH).

1-({4-[(2,4-дихлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-(2S,4R)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновая кислота (X(ГГМ-27))). К раствору 3,16 г (24 ммоль) L-гидроксипролина и 1,92 г (48 ммоль) гидроксида натрия в 70 мл воды присыпали 8 г (22 ммоль) 4-[(2,4-дихлорбензоил)амино]бензолсульфонилхлорида и реакцию смесь перемешивали при температуре 75°С в течение 4 ч, после чего – в течение суток при комнатной температуре. Реакционную массу фильтровали от взвеси и к прозрачному раствору прикапывали 0,1 М HCl до значения pH 1. Выпадало аморфное вещество. Раствор декантировали и вещество затирали в добавленной воде. Образованный белый осадок отфильтровывали, промывали водой до нейтрального значения среды и сушили при комнатной температуре. Получали 7,1 г (70%) технического продукта 1-({4-[(2,4-дихлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-(2S,4R)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновой кислоты в виде порошкообразного белого вещества.

Очистка. Очистку проводили с применением колоночной хроматографии на силикагеле 60 Å, с размером частиц 130-270 меш. в системе хлороформ:метанол = 1:1. Собранные фракции упаривали на ротационном испарителе при температуре 90 °С. Получали 3,2 г (45%) 1-({4-[(2,4-

дихлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-(2*S*,4*R*)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновой кислоты (ГГМ-27) в виде белого порошкообразного вещества. Чистота 99,46 % по данным ОФ ВЭЖХ (режим элюирования 2), время удерживания $\tau = 13,58$ мин. Т.пл. 105-120 °С с разложением. $[\alpha]^{22}_D = -74,04^\circ$ ($c = 1$ м/В, метанол). $R_f = 0,59$ (Б), $R_f = 0,5$ (В); $R_f = 0,73$ (Г).

Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 1.96 (уш. м, 2 H, $\text{ProC}^\beta\text{H}_2$); 3.13 (уш.дд., 1 H, $\text{ProC}^\delta\text{H}$, $^2J = 12$ Гц); 3.46 (уш.дд., 1 H, $\text{ProC}^\delta\text{H}$, $^2J = 12$ Гц); 4.05 (т., 1 H, $\text{ProC}^\alpha\text{H}$, $^3J = 7.84$ Гц), 4.22 (м., 1 H, $\text{ProC}^\gamma\text{H}$), 4.86 (с, 1 H, CH-OH); 7.56 (дд, 1 H, C^{10}H , $^3J_1 = 1.96$ Гц, $^3J_2 = 8.29$ Гц); 7.67 (д, 1 H, C^9H , $^3J = 8.29$ Гц); 7.78-7.81 (м, 3 H, C^{12}H , C^3H , $\text{C}^{3'}\text{H}$); 7.90 (д., 2 H, C^4H , $\text{C}^{4'}\text{H}$, $^3J_1 = 8,75$ Гц); 10.94 (с, 1 H, NH), 12.74 (с, 1 H, C(O)-OH).

Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 173,73 (с, 1 C(O)-OH); 164,99 (с, 1 C(O)-NH); 143,05 (с, 1 C^5H); 135,71 (с, 2 C^{11}H , C^{13}H); 132,43 (с, 1 C^2H); 131,70 (с, 1 C^8H); 130,86 (с, 1 C^9H); 129,75 (с, 1 C^{12}H); 129,17 (с, 2 C^3H , $\text{C}^{3'}\text{H}$); 128,00 (с, 1 C^{10}H); 119,72 (с, 2 C^4H , $\text{C}^{4'}\text{H}$); 68,91 (с, 1 $\text{ProC}^\gamma\text{H}$); 60,15 (с, 1 $\text{ProC}^\alpha\text{H}$); 56,80 (с, 2 $\text{ProC}^\delta\text{H}$); 39,52 (с, 2 $\text{ProC}^\beta\text{H}_2$).

Н-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z : рассчитано для $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ 458,01 (100.0%) + H^+ , 460.01 (63.9%) + H^+ , найдено 459,1; 461,04.

Натриевая соль 1-({4-[(2,4-дихлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-(2*S*,4*R*)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновой кислоты (X-Na(ГГМ-27-Na))). К суспензии 0,033 г (0,072 ммоль) 1-({4-[(2,4-дихлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-(2*S*,4*R*)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновой кислоты X(ГГМ-27) в 10 мл дистиллированной воды прикапывают раствор 0,003 г (0,072 ммоль) гидроксида натрия в 5 мл дистиллированной воды. После растворения осадка, полученный раствор фильтровали на бумажном фильтре и упаривали досуха, получая 0,01 г натриевой соли 1-({4-[(2,4-дихлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-(2*S*,4*R*)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновой кислоты в виде белого порошка. Выход 3%. Т.пл. > 250 °С. $R_f = 0,56$ (Б). Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 1.23, 1.59 (уш. м, 2 H, $\text{ProC}^\beta\text{H}_2$); 1.91, 2.94 (два м, 2 H, $\text{ProC}^\delta\text{H}_2$); 3.89 (м, 1 H, $\text{ProC}^\alpha\text{H}$); 4.25 (м, 1 H, $\text{ProC}^\gamma\text{H}$); 4.81 (м, 1 H, CH-OH); 7.57 (дд, 1 H, $\text{C}^{3'}\text{H}$, $^3J = 1.86$ Гц, $^3J_2 = 8.20$ Гц); 7.67 (д, 1 H, C^5H , $^3J = 8.29$ Гц); 7.78 (д, 1 H, C^6H , $^3J = 1.86$ Гц); 7.84 (дд, 4 H, C^2H , C^6H , C^2H , C^6H , $^3J_1 = 4.19$ Гц, $^3J_2 = 9.13$ Гц); 11.00 (с, 1 H, NH).

2.3. Экспериментальная биологическая часть

После синтеза сконструированных ранее соединений были проведены *in vitro* эксперименты для определения констант ингибирования некоторых из полученных соединений по отношению к матриксным металлопротеиназам 2-го и 9-го типов (ММП-2 и ММП-9), а также

эксперимент по выявлению нейропротекторной активности. На следующем этапе для изучения спектра фармакологической активности для синтезированных соединений были проведены *in vivo* эксперименты по выявлению антигипоксической, противоопухолевой, антиметастатической активностей и определению острой токсичности. Для одного из соединений были проведены *ex vivo* и *in vivo* эксперименты по изучению кардиопротективного эффект. Исходя из это ниже представлены подробное описание использованных методов.

2.3.1. Препараты и реагенты

В исследовании были использованы соединения, сконструированные и синтезированные нами в отделе химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» (см. разделы 2.1.-2.2.).

Для растворения соединений использовалась вода с сопротивлением 19 мОм, 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.

Для *ингибиторного анализа* использовали: субстрат для определения констант ингибирования по отношению к ММП-2/-9 (Mca-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂·TFA) («Sigma-Aldrich», США); активная ММП-2 человека («Calbiochem®», США); активная ММП-9 человека («Calbiochem®», США).

Нейропротекторная активность: клетки НТ-22, среда для культивирования клеток DMEM («HyClon», США); эмбриональная сыворотка (FBS) («Invitrogen», США), L-глутамин («ICN», США), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (MTT) («Sigma-Aldrich», США), диметилсульфоксид («AppliChem», Германия).

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

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

Гистология: раствор формалина 10% забуференный (ООО «Биовитрум», Российская Федерация); раствор для гистологической проводки на основе изопропилового спирта IsoPrep («Эрго Продакшн», Российская Федерация); парафин Leica Paraplast («Leica Biosystems», США); эозин 1% водный раствор («Эрго Продакшн», Российская Федерация); галлоцианин-хромовые квасцы («Serva», Германия); набор для окраски по Ван-Гизону, 100 тестов/упак. («Эрго

Продакшн», Российская Федерация); среда для заключения препаратов Leica CV Mount («Leica Byosystems», США).

Реагенты для определения содержания ММП-2 или ММП-9 в плазме крови крыс с острым инфарктом миокарда: наборы SEA100Ra для иммуноферментного определения крысиной ММП-2 («R&D Systems», США) и RMP900 для иммуноферментного определения крысиного ММП-9 («R&D Systems», США).

Используемые растворители и реагенты очищали стандартными методами [2].

2.3.2. Методы регистрации

Калибровка автоматических одно- и многоканальных пипеточных дозаторов «Лайт» («Thermo Scientific», Российская Федерация) объемом 500-5000 мкл, 100-1000 мкл, 10-100 мкл, 1-10 мкл, 1-2,5 мкл была проведена на аналитических весах Adventurer Pro точностью 0,0001 г («OHAUS», США) при температуре 25 °С.

2.3.3. Животные

Исследования проводили на беспородных мышах-самцах массой тела 21-24 г (120 особей), на беспородных мышах-самках массой тела 21-24 г (120 особей), инбредных мышах-самцах линии C57BL/6 массой 25-30 г (120 особей) и беспородных белых крысах-самцах массой 180-200 г (136 особей).

Экспериментальные животные были получены из питомника лабораторных животных филиала «Столбовая» ФГБУ науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (Московская обл.). Организацию и проведение работ осуществляли в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами», ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» и Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» (протокол № 05 от 05.03.2024 г.).

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)).

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

2.3.4. Клеточные линии

2.3.4.1. Клетки гиппокампа мыши линии HT-22

Исследования окислительного стресса проводились на иммортализованных клетках гиппокампа мыши линии HT-22, любезно предоставленных профессором Ф. Виегантом (F. Wiegant) из Утрехтского (Utrecht University) университета (Голландия).

Все манипуляции с клетками выполнялись в строго стерильных условиях. Клетки линии HT-22 культивировали при температуре 37 °C, в 5% CO₂ в среде ДМЕМ, содержащей 5% FBS. Смену культуральной среды производили через 24 ч после посева клеток и затем каждые 3 дня. Рассев на культуральные флаконы общей площадью 75 см² («Costar-Corning», США) осуществляли каждую неделю. После достижения монослоя клетки подсчитывали в камере Горяева и рассеивали с плотностью 3,5 тыс. на лунку в 96-луночные планшеты («Costar-Corning», США), предварительно покрытые раствором поли-*D*-лизина (0,1 мг/мл) («BD Bioscience», США) 1 ч. Эксперименты проводились на 3-й день после посева клеток при образовании монослоя.

2.3.4.2. Перевивание и накопление опухолевых штаммов карциномы легкого Льюис (англ. *Lewis Lung Carcinoma, LLC*) и аденокарциномы Ca755 на мышцах линии C57BL/6

Штаммы опухолевых клеток LLC и аденокарциномы Ca755 в объеме по 4 млн. клеток получены из банка клеточных культур ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина" Минздрава

России. Для проведения экспериментов необходимо не менее 350 млн опухолевых клеток каждой линии, поэтому их нужно было перевить и накопить, что было сделано на 40 самцах мышей и 30 самках мышей линии C57BL/6. Образцы культур хранятся в холодильнике при температуре – 80°.

После получения образцов культур из банка клеточных культур ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина" Минздрава России перевивание опухолевых клеток проводили на самцах и самках мышей линии C57BL/6 в стерильных условиях. Помещения обрабатывали ультрафиолетовыми лампами, стерилизовали шприцы, пробирки и хирургические инструменты. Для получения 1-ой генерации клеток размороженную взвесь опухолевых штаммов вводили мышам внутримышечно в область бедра по 0,5 мл в стерильном растворе Хенкса. Через 12-14 дней опухоль 1-ой генерации извлекали, взвешивали, 1 грамм опухолевых клеток помещали в 10 мл раствора Хенкса для получения дозы клеток опухоли 10 мг в 0,1 мл раствора Хенкса, что примерно соответствует дозе 1 миллиону живых клеток опухоли, которую затем проверяли на счетчике клеток и дополняли. Затем в чашках Петри опухоль разрезали на мелкие кусочки, очень осторожно гомогенизировали в стеклянных гомогенизаторах. Неиспользованный опухолевой материал хранится в холодильнике при температуре – 80 °C.

2.3.5. Методы исследования

2.3.5.1. Эксперименты *in vitro*

2.3.5.1.1. Ингибиторная активность синтезированных соединений по отношению к ММП-2 и ММП-9

Для изучения полученных соединений на предмет эффективности ингибирования в отношении ММП-2/-9 был выбран флуориметрический метод [111].

Для эксперимента был выбран субстрат (7-метоксикумарин-4-ил)ацетил-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-N-3-(2,4-динитрофенил)-L- α,β -(диаминопропионил)-Ala-Arg-NH₂ (Mca-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂). При взаимодействии ММП-2/-9 и этого субстрата, в последнем происходит разрушение пептидной связи (-Leu-Dpa-), образование пептида, содержащего Mca-группу, а также Dpa-Ala-Arg-NH₂. В данном случае прибор измеряет флуоресценцию

метоксикумарина, квантовый выход флуоресценции которого около 0,6 [31]. Также известно, что вещества, содержащие ароматические группы не тушат флуоресценцию кумаринового производного [111].

Инкубационная смесь содержала 10 мкл ММП-2 ($2 \cdot 10^{-9}$ М) или ММП-9 ($2 \cdot 10^{-9}$ М) в инкубационном буфере (50 mM Tris-HCl, pH7,5, 0,2 М NaCl, 5 mM CaCl₂, 20 мкМ ZnSO₄, 0,05% Lubrol PX), 75 мкл этого же буфера и 10 мкл соответствующего ингибитора в ДМСО в конечных концентрациях 1×10^{-5} - 5×10^{-5} М. Смесь инкубировали 30 мин при 25 °С. Затем добавляли 5 мкл (1 мкг/мл) субстрата (Mca-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂) в H₂O. Флуоресценцию регистрировали на микропланшетном ридере Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX при 37°C каждую минуту в течении 10 мин при длинах волн возбуждения и испускания 325 нм и 393 нм соответственно [111].

2.3.5.1.2. Модель окислительного стресса в культуре клеток гиппокампа мыши линии HT-22

Окислительный стресс моделировали на культуре immortalized клеток гиппокампа линии HT-22 внесением в культуральную среду перекиси водорода в конечной концентрации 1,5 mM. Время инкубации составляло 30 мин, после чего среду заменяли на нормальную и определяли жизнеспособность клеток через 4 ч с использованием МТТ-теста. Нейропротекторное действие исследовали при внесении препарата в культуральную среду за 24 ч до повреждения и сразу после повреждения клеток в диапазоне концентраций от 10^{-5} до 10^{-9} М [137].

2.3.5.1.3. Оценка жизнеспособности нейронов в культуре с помощью МТТ-теста

МТТ-тест отражает энергетическое состояние клетки (митохондриальное дыхание) и уровень обменных процессов, т.е. жизнеспособность клеток. МТТ (3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолий бромид) представляет собой водорастворимую соль тетразолия желтого цвета, легко проникающую в клетки. В живых клетках МТТ превращается в нерастворимые в воде кристаллы формазана фиолетового цвета. По окончании реакции их (кристаллы) растворяют

в органических растворителях (изопропанол, диметилформамиде, диметилсульфоксиде) и измеряют поглощение на спектрофотометре.

По окончании эксперимента среду культивирования заменяли раствором МТТ (0,5 мг/мл) и инкубировали 30 мин при температуре 37 °С. Затем отбирали раствор МТТ из лунок и добавляли для растворения формазана ДМСО. Через 15 мин измеряли светопоглощение на спектрофотометре «Multiscan EX» («Thermo Scientific», Российская Федерация) при длине волны 600 нм [219].

2.3.5.2. Эксперименты *in vivo*

2.3.5.2.1. *Определение полулетальной дозы*

Опыты проводились с использованием стандартных методов, применяемых для определения острой токсичности согласно методическим рекомендациям, утвержденным Фармакологическим комитетом МЗ РФ [12].

Полулетальные дозы (ЛД₅₀) синтезированных соединений изучали в опытах на беспородных мышах-самцах массой тела 21-24 г. Соединения вводили внутривентриально или интрагастрально. В качестве растворителя использовали 1% Tween-80 в воде или 1% крахмал в воде. Острую токсичность каждого соединения определяли, как минимум, в пяти различных дозах, количество животных в каждой серии – 6. Летальность животных оценивали через 24 ч после введения синтезированных нами соединений.

2.3.5.2.2. *Противоопухолевая активность на модели карциномы легкого Льюиса*

Исследование противоопухолевой и антиметастатической активности АЛ-828 было проведено на экспериментальной модели эпидермоидной карциномы лёгкого Льюис (англ. Lewis Lung Carcinoma, LLC), полученной из банка клеточных культур НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей научного медицинского исследовательского центра онкологии имени Н.Н. Блохина. Взвесь опухолевых клеток LLC (50 мг в 0,5 мл раствора Хэнкса на мышь) перевивали 40 самцам мышей линии C57BL/6 подкожно в область подмышечной впадины.

Максимальная прививочная доза составляла не менее 5×10^6 клеток/мышь. День подкожной прививки клеток опухолевого штамма считался нулевым днём развития опухоли. В настоящей работе в качестве позитивного контроля был выбран гемцитабин (2'-дезоксидифторцитидин гидрохлорид), который вошёл в первую линию противоопухолевой терапии и успешно применяется в клинической практике при лечении многих видов злокачественных новообразований, в частности немелкоклеточного рака лёгких [21]. Лиофилизат гемцитабина растворяли в изотоническом растворе натрия хлорида (ООО «Мосфарм», Россия) и вводили внутривенно (в/в) в дозе 50 мг/кг на 2-й день и 9-й день развития опухоли. Суммарная доза в 100 мг/кг гемцитабина является субтерапевтической, её выбрали с целью лимитирования токсического действия. Животным опытных 3-й и 4-й групп вводили АЛ-828 с 1-го по 14-й день развития опухоли в дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг, выбранных на основе пилотных исследований фармакологической активности ингибиторов ММП-2, который разводили в 1% водном крахмале (по ОФС.1.3.0001 ГФ РФ 15 издания «Реактивы. Индикаторы»). В экспериментальных группах было по 10 животных:

1) группа активного контроля с LLC: животные, не получавшие лекарственную терапию; животным с LLC 14 дней в/в вводили 1% водный крахмал;

2) группа животных, которым вводили в/в гемцитабин двукратно на 2-й и 9-й дни развития опухоли (суммарная доза 100 мг/кг);

3) группа животных с LLC, которым вводили в/в в течение 14 дней АЛ-828 в дозе 10 мг/кг;

4) группа животных с LLC, которым вводили в/в в течение 14 дней АЛ-828 в дозе 30 мг/кг.

Были изучены следующие параметры: ингибирование роста опухоли по объёму, средняя продолжительность жизни (СПЖ), индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) по сравнению с активным контролем. Противоопухолевый эффект регистрировали на 7-, 9-, 15-е, а также на 21-е сутки развития опухоли (7-е сутки после окончания 2-недельного введения АЛ-828). Расчёт объёма опухоли проводили после измерения трех её размеров по формуле: $V = A \times B \times C$

на 7-, 9-, 15-е, а также на 21-е сутки развития LLC. Измерение объёма опухоли проводили инженерным микрометром. Торможение роста опухоли (ТРО, %) вычисляли по формуле:

$$\text{ТРО \%} = [(V_{\text{контроля}} - V_{\text{опыта}}) / V_{\text{контроля}}] \times 100 \%,$$

где $V_{\text{контроля}}$ — средний объём опухолей в группе активного контроля, (мм^3);

$V_{\text{опыта}}$ — средний объём опухолей в опытной группе, (мм^3).

Согласно методическим рекомендациям, критерии противоопухолевой активности препарата должны учитываться через 7 дней после окончания его введения и ТРО должно быть не менее 70 % [53].

Метастазы в 4 долях правого и одной доли левого лёгкого мышей выявляли под лупой с 8-кратным увеличением (Magnifer Lamp 8608 E-D XB с кольцевой люминесцентной подсветкой). При оценке интенсивности метастазирования использовали следующие показатели: частоту метастазирования LLC вычисляли в процентах (по отношению числа животных с метастазами к общему числу животных в группе); подсчитывали среднее количество метастазов у одного животного в группе; величину различия метастазирования опухоли между активным контролем и опытными группами оценивали по индексу ингибирования метастазирования. Индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) определялся по формуле:

$$\text{ИИМ} = (A_k \times B_k) - (A \times B) / (A_k \times B_k) \times 100 \%,$$

где A_k , A — частота метастазирования в лёгких у мышей контрольной группы и опытной;
 B_k , B — среднее число метастазов в лёгких в контрольной и опытной группах.

Степень метастатического поражения лёгких в зависимости от количества и размера метастазов, согласно методическим рекомендациям [26, 53], оценивали по следующим критериям: к лёгкой степени метастатического поражения относится (ЛСП):

- 0) отсутствие у ряда животных-опухоленосителей метастазов в лёгких;
- 1) количество метастазов меньше 10 с диаметров не больше 1 мм;
- 2) количество метастазов от 10 до 30 с диаметром 1 мм.

К высокой степени метастатического поражения относится (ВСП):

- 3) количество больше 30 метастазов различных размеров, однако отсутствуют сливные;
- 4) тяжёлое поражение лёгочной ткани, менее 100 штук, однако отсутствуют сливные метастазы;
- 5) массивное поражение лёгких, более 100 метастазов, наличие сплошных опухолевых узлов.

2.3.5.2.3. Противоопухолевая активность на модели аденокарциномы молочной железы Ca755

Изучение противоопухолевой активности исследуемого соединения было проведено на экспериментальной модели аденокарциномы молочной железы Ca755, полученной из банка клеточных культур ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина". Штамм поддерживался двукратным пассированием культуры для получения необходимого для эксперимента количества. Взвесь опухолевых клеток (10 мг в 0,1 мл раствора Хэнкса на мышь) аденокарциномы Ca755 имплантировали самкам мышей линии C57BL/6 п/к в область

подмышечной впадины. Стандартная прививочная доза составляла не менее 1×10^6 клеток/мышь. День подкожной прививки клеток опухолевого штамма считается нулевым днем развития опухоли. В качестве позитивного контроля был использован противоопухолевый препарат доксорубин, который вводили в/б в дозе 4 мг/кг на 2-й и 4-й день развития опухоли с целью лимитирования токсического действия. Животным вводили исследуемое соединение и в течение 14 дней в двух дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг. В качестве растворителя использовали суспензию 1% крахмала (по ОФС.1.3.0001 ГФ РФ 15 издания «Реактивы. Индикаторы») в воде. В экспериментальных группах было по 10 животных:

- 1) группа активного контроля с аденокарциномой молочной железы Ca755: животные, не получавшие лекарственную терапию; животным 14 дней в/б вводили 1% водный крахмал;
- 2) группа животных с аденокарциномой молочной железы Ca755, которым вводили в/б доксорубин двукратно на 2-й и 4-й дни развития опухоли (суммарная доза 8 мг/кг);
- 3) группа животных с аденокарциномой молочной железы Ca755, которым вводили в/б в течение 14 дней ГГМ-27 в дозе 1 мг/кг (суммарная доза 14 мг/кг);
- 4) группа животных с аденокарциномой молочной железы Ca755, которым вводили в/б в течение 14 дней ГГМ-27 в дозе 10 мг/кг (суммарная доза 140 мг/кг).

Были изучены следующие параметры: ингибирование роста опухоли по объему и средняя продолжительность жизни (СПЖ) по сравнению с активным контролем. Противоопухолевый эффект регистрировали на 9, 15 а также и 21 сутки развития опухоли (7 сутки после окончания 2-х недельного введения исследуемого соединения). Расчет объема опухоли проводили после измерения 3-х ее размеров по формуле:

$$V = A \times B \times C$$

на 9, 15 а также на 21 сутки развития аденокарциномы Ca755. Измерение объема опухоли проводили инженерным микрометром. Торможение роста опухоли (ТРО%) вычисляли по формуле [53]:

$$\text{ТРО\%} = [V_{\text{контроля}} - V_{\text{опыта}}] / V_{\text{контроля}} \times 100\%, \text{ где}$$

$V_{\text{контроля}}$ — средний объем опухолей в группе активного контроля, (мм^3);

$V_{\text{опыта}}$ — средний объем опухолей в опытной группе, (мм^3).

Согласно методическим рекомендациям, критерии противоопухолевой активности препарата должны учитываться через 7 дней после окончания его введения и ТРО должно быть не менее 70 % [26, 53].

2.3.5.2.4. Антигипоксическая активность

Нормобарическая гипоксия с гиперкапнией в гермообъеме («баночная» гипоксия) является часто используемым методом оценки противогипоксической активности веществ. Нормобарическую гипоксию моделировали в соответствии с рекомендациями «Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [3] путем постепенного увеличения содержания углекислого газа в воздухе за счет дыхания (гипоксия с гиперкапнией в гермообъеме). За 1 ч до начала эксперимента животным одинакового веса (разброс не более 2-х г на группу) внутрибрюшинно (в/б) вводили или исследуемое соединение (суспензия в 1% водном Tween-80), или эталонный препарат пирацетам (суспензия в 1% водном Tween-80). Животные контрольной группы получали аналогичный объем (0,8 мл на 1 кг массы) суспензии Tween-80. По прошествии 1 ч животных помещали по одному в герметически закрытые сосуды вместимостью 250 мл (высота 10 см, диаметр 5,8 см) и фиксировали наступление смерти по времени последнего агонального вдоха. Животные были рандомизированы по массе и разделены на 9 групп по 10 мышей в каждой: 1-я группа: контроль (1% Tween-80 в воде); 2-я группа: АЛ-828 в дозе 30 мг/кг (АЛ-828 + 1% Tween-80 в воде); 3-я группа: АЛ-828 в дозе 10 мг/кг (АЛ-828 + 1% Tween-80 в воде); 4-я группа: АЛ-828 в дозе 5 мг/кг (АЛ-828 + 1% Tween-80 в воде); 5-я группа: АЛ-828 в дозе 1 мг/кг (АЛ-828 + 1% Tween-80 в воде); 6-я группа: АЛ-828 в дозе 0,1 мг/кг (АЛ-828 + 1% Tween-80 в воде); 7-я группа: АЛ-828 в дозе 0,01 мг/кг (АЛ-828 + 1% Tween-80 в воде); 8-я группа: АЛ-828 в дозе 0,001 мг/кг (АЛ-828 + 1% Tween-80 в воде); 9-я группа: пирацетам в дозе 1000 мг/кг (пирацетам + 1% Tween-80 в воде). Животные контрольной группы получали эквивалентный объем раствора 1% Tween-80 в воде.

2.3.5.2.5. Модель экспериментального инфаркта миокарда

Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 180-200 г. Операцию проводили по методу Ганса Селье (Selye János) [199]. Исследуемое соединение АЛ-828 вводили крысам внутривенно 1 раз в сутки в течение 3 дней, предшествующих воспроизведению инфаркта и с 1-го по 7-й день после ИМ в дозе 30 мг/кг. В качестве положительного контроля использовали ингибитор металлопротеиназ антибиотик доксициклин, который вводили по аналогичной схеме в дозе 40 мг/кг/сут. В качестве растворителя использовали 1% Tween-80 в воде.

Крысу, находящуюся под эфирным наркозом, фиксировали на операционном столике в положении на спине. Удаляли шерсть с кожи в области грудной клетки, которую затем обрабатывали 70% раствором спирта. Кожу разрезали вдоль грудины, с помощью специально изготовленных ранорасширителей раздвигали грудные мышцы. Ткани по краям раны изолировали стерильным бинтом. Торакотомию производили в 5-ом межреберье, ребра раздвигали, сердце извлекали из грудной клетки и осторожно отводили кверху ушко левого предсердия. С помощью стерильной атрауматической иглы с нитью 3/0 под левую коронарную артерию, в 2-3 мм от ее начала подводили лигатуру, которую завязывали, нитку обрезали. Сердце возвращали в грудную полость, стягивали мышцы. Рану, после внесения в нее антибиотика (цефазолин-натрий), послойно ушивали. Операционное поле обрабатывали спиртовым 5% раствором йода. Операцию проводили с максимально возможным соблюдением правил асептики и антисептики, использовали только стерильные резиновые перчатки, инструменты и шовный материал. Ложнооперированным крысам подводили лигатуру под коронарную артерию, не завязывая ее. Через 24 ч после заключительного введения препаратов крысам проводили эвтаназию в соответствии с ГОСТом 33215-2014 с помощью транслокации шейных позвонков, сердца извлекали из грудных клеток для дальнейших морфологических исследований.

2.3.5.2.6. Морфологические исследования

Проводили эвтаназию и патологоанатомическое вскрытие крыс, сердца извлекали для последующих морфометрических и микроскопических исследований. Вырезали фронтальные сегменты сердец (толщиной 3 мм), захватывающие левый и правый желудочки, фиксировали в 10% забуференном растворе формалина. После окончания фиксации осуществляли стандартную гистологическую проводку (автоматизированный тканевой процессор «Leica TP1020», Германия) и заливку образцов в парафиновые блоки с использованием гомогенизированной парафиноподобной среды Paraplast и системы заливки тканей с графическим дисплеем («Tissue-Tek®ТЕК™», США). Готовили гистологические срезы сердец (толщиной 5 мкм) с помощью ротационного микротомы («Accu-Cut®SPM™», США).

Полученные срезы помещали на стекло с полилизинным покрытием («Menzel», Германия), просушивали, депарафинировали, окрашивали галлоцианин-хромовыми квасцами с последующей докраской 1% водным раствором эозина, а также пикрофуксином по Ван-Гизону. Заключали в синтетическую монтирующую среду Bio Mount («Bio-Optica Milano SPA», Италия) под покровные стекла («Эрго Продакшн», Российская Федерация). Микропрепараты

фотографировали цифровой зеркальной камерой Canon EOD 1000 с использованием макрообъектива. Фотографии сердец сохраняли в формате Jpeg и анализировали с помощью программы Adobe Photoshop CS5. Морфометрические измерения производили на поперечном срединном срезе сердца, оценивали абсолютную площадь левого желудочка (ЛЖ), абсолютную и относительную площадь очага некроза, абсолютные и относительные площади полости ЛЖ, минимальный и максимальный диаметры полости ЛЖ, толщину передней стенки ЛЖ, межжелудочковой перегородки, правого желудочка (ПЖ). Срезы изучали в проходящем свете с использованием микроскопа Nikon eclipse 55i при увеличении x100, x200, x400. Сохраняли изображения микроскопической картины миокарда фотокамерой Nikon DS-Fi1 с помощью программы визуализации изображений NIS Elements BR для Nikon.

2.3.5.2.7. *Выявление влияния соединений на содержание ММП-2 и ММП-9 в плазме крови крыс с острым инфарктом миокарда*

Изучение влияния соединения АЛ-828 на содержание ММП-2 или ММП-9 в плазме крови крыс с острым инфарктом миокарда проводилось по методу, отработанному в ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» ранее [32, 33].

Эксперимент проводили на беспородных крысах-самцах массой 180-200 г. Животные были рандомизированы на 4 группы по 6 особей в каждой: 1-ая – интактная, 2-ая – контрольная – инфаркт миокарда, 3-я – инфаркт миокарда + референтный препарат доксициклин, 4-ая – группа, получавшая исследуемое соединение. Референтный препарат доксициклин (40 мг/кг/сут.) и исследуемое соединение АЛ-828 в дозе 30 мг/кг/сут. вводили внутривентрикулярно через зонд в 0,5 мл физиологического раствора в течение 3 дней, предшествующих эксперименту. В качестве растворителя использовали 1% Tween-80 в воде. Анестезированных (уретан 1300 мг/кг, внутривентрикулярно) животных интубировали и переводили на искусственное дыхание. После торако- и перикардотомии идентифицировали левую коронарную артерию и производили ее одномоментную перевязку на уровне выхода сосуда из-под ушка сердца. Через 3 ч после перевязки коронарной артерии кровь животных забирали, центрифугировали 20 мин при 2000 об, забирали сыворотку, хранили при -20 °С до иммуноферментного определения содержания ММП-2 и/или ММП-9 в плазме.

2.3.5.2.8. Иммуноферментное определение ММП-2 и ММП-9

Определение содержания ММП-2 и ММП-9 в плазме крови крыс проводили наиболее распространённым неконкурентным методом – «сэндвич» - метод иммуноферментного анализа. с помощью автоматического биохимического и иммуноферментного анализатора («Chem Well 2910 Combi», США). В работе использовали наборы SEA100Ra для иммуноферментного определения крысиной ММП-2 и RMP900 для иммуноферментного определения крысиной ММП-9. Анализ проводили согласно инструкции производителя.

2.3.5.2.9. Гемодинамическое исследование

Наркотизированных уретаном (1300 мг/кг, в/б) крыс фиксировали на подогреваемом столике («Kent Scientific», США) в положении на спине. Выделяли и катетеризировали правую сонную артерию и правую бедренную вену. Для регистрации кардиоэлектрических потенциалов во II стандартном отведении использовали игольчатые электроды.

Соединения АЛ-828 в дозе 30 мг/кг/сут и доксициклин в дозе 40 мг/кг/сут вводили интрагастрально за 3 дня до проведения эксперимента. В качестве контроля использовали 1% Tween-80 в воде.

Для прямой катетеризации сосудов использовали политетрафторэтиленовые катетеры собственной сборки с внутренним диаметром 0,6 мм. Для регистрации параметров периферической гемодинамики катетеры подключались к датчикам артериального (АРТ300, «Hugo Sachs Electronic») и венозного (P75, «Hugo Sachs Electronic», Германия) давления. Сигналы с датчиков давления и сигналы с игольчатых электродов ЭКГ посредством цифро-аналогового преобразователя («Hugo Sachs Electronic», Германия) коммутировались через устройство сбора данных PowerLab 8/35 («ADInstruments», Австралия), а далее передавались на персональный компьютер, где с помощью программного обеспечения LabChart 8 («ADInstruments», Австралия) вёлся мониторинг, регистрация и первичная обработка получаемых данных [134].

С помощью описанной системы регистрации артериального давления получали следующие параметры периферического артериального давления: максимальное давление во время цикла (систолическое АД); давление в начале цикла (диастолическое АД); среднее арифметическое давление в текущем цикле (среднее АД); разница между диастолическим и систолическим (пульсовое давление); венозное давление. Запись параметров артериального

давления велась непрерывно. Для извлечения параметров использовали участки продолжительностью 20 секунд в фоне.

2.3.5.2.10. Оценка влияния соединения на структуру ЭКГ

Наркотизированных уретаном (1300 мг/кг, в/б) крыс фиксировали на подогреваемом столике («Kent Scientific», США) в положении на спине. ЭКГ (стандартные отведения) регистрировали перед введением и через 3 дня после введения исследуемых веществ при помощи ветеринарного компьютерного электрокардиографа «Поли Спектр 8/В» («Нейрософт», Россия) с пакетом прикладных программ «Поли Спектр» («Нейрософт», Россия), продолжительность записи 1 минута.

Исследуемые соединения АЛ-828 в дозе 30 мг/кг/сут и доксициклин в дозе 40 мг/кг/сут вводили интрагастрально за 3 дня до проведения эксперимента. В качестве контроля использовали 1% Tween-80 в воде.

Для анализа структуры ЭКГ во II-ом стандартном отведении оценивали следующие показатели [58]:

RR min	—	минимальная частота сердечных сокращений за период наблюдения;
RR max	—	максимальная частота сердечных сокращений за период наблюдения;
RR mean	—	среднее значение ЧСС за период наблюдения;
PQ интервал	—	время проведения возбуждения по предсердиям и атриовентрикулярному узлу;
QRS комплекс	—	фаза деполяризации желудочков сердца;
QT интервал	—	период от начала деполяризации до окончания реполяризации желудочков сердца;
QTc интервал	—	корректированный интервал QT, позволяющий оценить истинную величину QT, вне зависимости от величины частоты сердечных сокращений.

2.3.6. Статистическая обработка результатов

Константы ингибирования каждого ингибитора рассчитывали с помощью линейного регрессионного анализа, выполненного с использованием программного обеспечения OriginPro

8 (OriginLab, Corp., США) по методу Диксона. Скорости реакции измеряли по первым 10 мин и строили зависимость начальной скорости реакции (V_0) от начальной концентрации ингибитора ($[I_0]$) - $1/V_0([I_0])$.

Статистическую обработку остальных экспериментов проводили с помощью стандартного пакета программ «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.

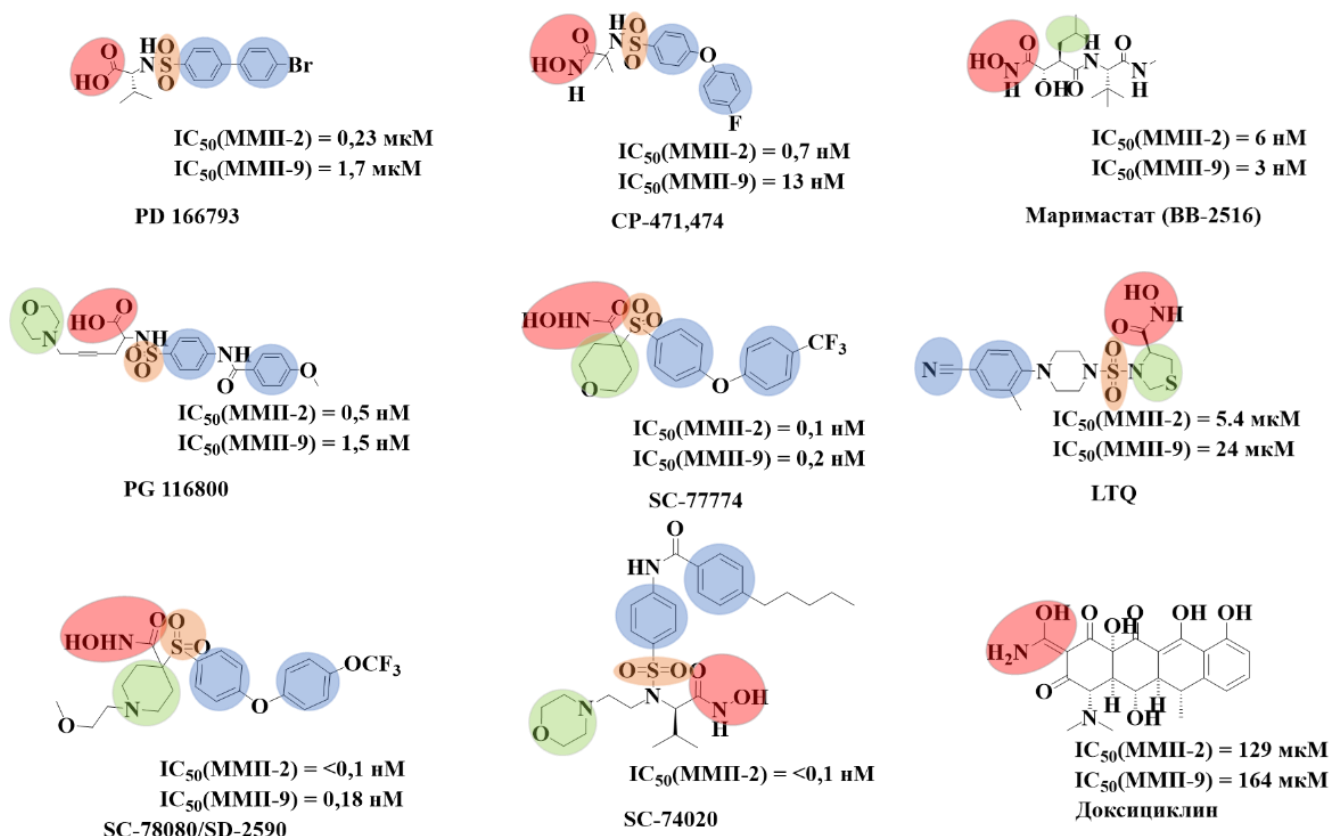
Полученные результаты описывали с помощью средних арифметических и их стандартных ошибок. Критический уровень значимости $\alpha = 0,05$.

ГЛАВА 3. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Конструирование потенциальных ингибиторов ММП-2 и ММП-9

Исследования по поиску и внедрению в широкую клиническую практику лекарственных средств, селективно блокирующих гиперактивность ММП-2 и ММП-9 (син. желатиназы А и В), проводятся уже в течении долгого времени [156, 235], однако эта проблема все ещё далека от своего окончательного разрешения.

Самой большой группой ингибиторов желатиназ являются сульфонамиды (рисунок 28) [138], такие как, PD 166793 [179] и CP-471,474 [192]. Другой большой группой ингибиторов являются гидроксаматные (рисунок 28) [224]. D.P. Becker и др. синтезировали алкилсульфонилгидроксаматы SC-78080/SD-2590 и SC-77774 показали, что они селективно ингибируют ММП-2 и ММП-9 [67]. Гидроксаматный ингибитор маримастат (BB-2516) дошел до клинических исследований, но показал низкую биодоступность при пероральном применении [79]. Антибиотик тетрациклинового ряда доксициклин (рисунок 28) обладает цинк-хелатирующими свойствами и обладает умеренной константой ингибирования желатиназ. Доксициклин был разрешен управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA, USFDA) в 1998, и до сих пор остаётся единственным зарегистрированным ингибитором ММП [156]. Соединение LTQ (рисунок 28) было получено в качестве селективного ингибитора ADAM-10, оно также оказалось активным по отношению к ММП-2 и ММП-9 [78].



Примечание – Цинк-связывающая группа выделена красной окружностью; ароматическая группа - синей окружностью; гидрофобная группа - зеленой окружностью; SO₂-группа – усиливает связывание водородными связями.

Рисунок 28 – Ингибиторы ММП-2 и ММП-9 [67, 78, 80, 138, 156, 181, 192, 224]

Описанные ингибиторы не обладают высокой селективностью к ММП-2 и ММП-9, поэтому их применение осложнено побочными эффектами, так как металлопротеазы участвуют во многих критически важных процессах, начиная от белкового катаболизма и заканчивая процессингом нейропептидов.

Таким образом, ранее, на основании структур описанных ингибиторов ММП-2 и ММП-9 [183] были выделены структурные требования к ингибиторам желатиназ [236].

Основным структурным требованием к ингибиторам ММП-2 и ММП-9 является наличие цинк-хелатирующей группы. К таким группам относят гидроксаматную, формилгидроксиламиновую, сульфгидрильную, фосфиновую, аминокарбоксильную и карбоксильную группы [236]. 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 [236], так как именно сайт S1' в активном центре ММП-2 и ММП-9 по структуре отличается от соответствующих сайтов других ММП [183]. Для этого используют производные сульфонида, содержащие биароматическую и/или амидную группы, а также тройную связь или тетразол [213]. Следующим структурным требованием к селективным ингибиторам ММП-2 и ММП-9 является

наличие циклического алифатического участка для связывания с S1-сайтом. Лучше всего с S1 связываются фрагменты, содержащие циклический алифатический участок [183]. Сродство к желатиназам увеличивают группы, способные образовывать прочные водородные связи с аминокислотами активного центра. К таким группам в случае ингибиторов ММП относятся amino- и карбонильная группы [236, 243].

На основании приведенных выше структурных требований к селективным ингибиторам ММП-2 и ММП-9 нами сконструированы их новые предполагаемые ингибиторы на основе *N*-замещенных-[бензоиламино(фенилсульфонил)]-циклических аминокислот [17]. Они содержат в себе необходимые структурные элементы для связывания с активным центром желатиназ: цинк-связывающую карбоксильную группу, протяженную биароматическую липофильную группу для связывания с сайтом S1', гидрофобную группу (циклический участок) для связывания с сайтом S1, и сульфонильную группу как акцептор водородной связи (рисунок 29).

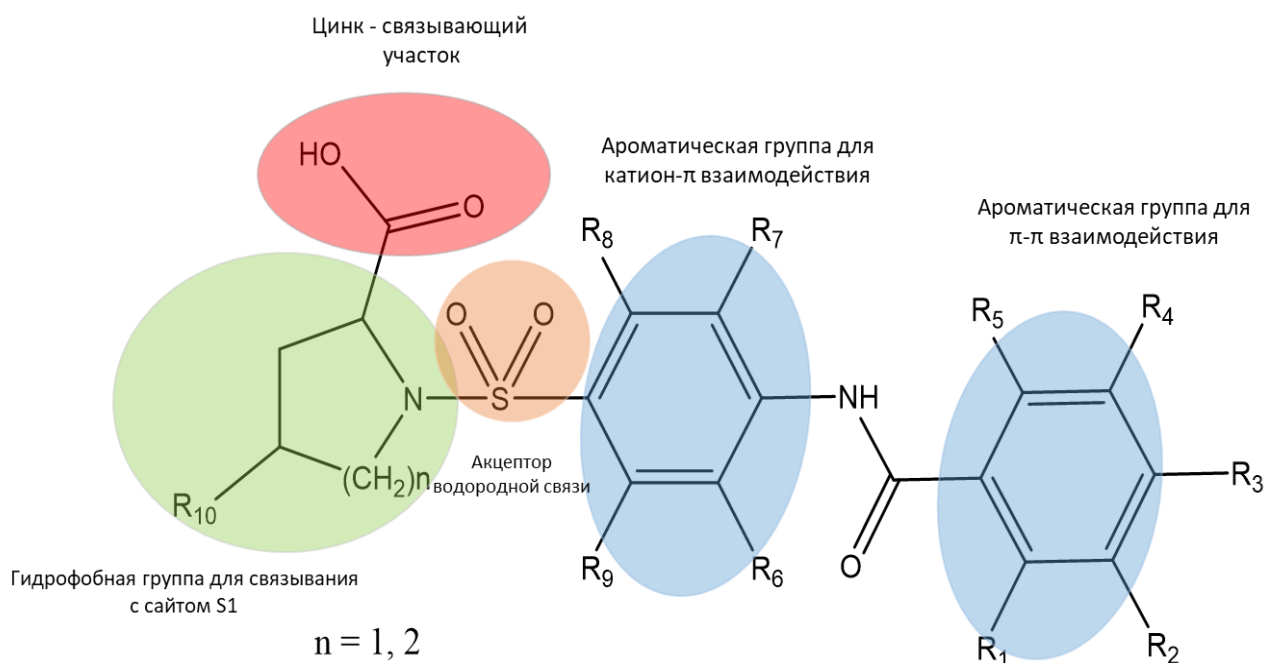


Рисунок 29 – Группа *N*-замещенных-[бензоиламино(фенилсульфонил)]-циклических аминокислот, возможных ингибиторов ММП-2 и ММП-9 [17]

Эта группа включала следующие соединения (рисунок 30):

- 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-хлорбензамино]-3,5-диметилфенил}сульфонил)-пиперидин-2-карбоновая кислота.
- VIII(ГГМ-10): 1-({4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил)-(2S,4R)-4-гидроксипирролидин-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)-(2S,4R)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновая кислота.

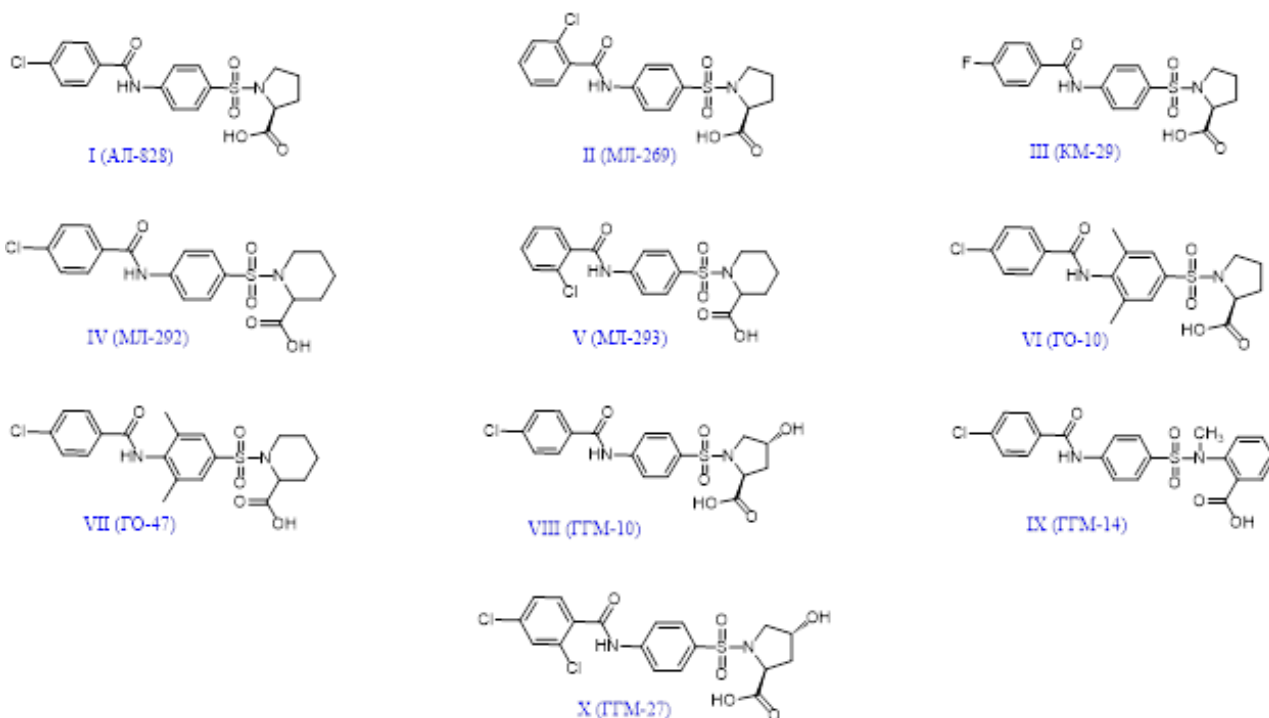


Рисунок 30 – Новые предполагаемые селективные ингибиторы ММП-2 и ММП-9

Таким образом с применением фармакофорного подхода было сконструировано 10 предполагаемых селективных ингибиторов ММП-2 и ММП-9.

Полученные результаты опубликованы в патентах:

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 [41].

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 [42].

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 [43].

Полученные результаты опубликованы в статье с соавторами:

Григоркевич, О.С. Дизайн, синтез и фармакологическая активность нового ингибитора матриксной металлопротеиназы-9 [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, А.Д. Дурнев // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52. – № 1. – С. 8-14 [17].

3.2. Молекулярный докинг

Для теоретической оценки перспективности предложенных соединений (рисунок 27) в качестве ингибиторов ММП-2/-9 нами проведен молекулярный докинг.

Для молекулярного докинга использовались 3D структуры ММП-2 в комплексе с ингибитором SC-74020 (PDB ID: 1HOV) и ММП-9 в комплексе с ингибитором LTQ (PDB ID: 5CUH), взятые из базы данных Protein Data Bank. Ингибиторы удаляли с помощью Schrodinger Protein Preparation Wizard с использованием стандартного протокола [70, 197]. Подготовка соединений также осуществлялась с помощью инструмента LigPrep. Позиция гридбокса была сгенерирована вокруг молекулы SC-74020 или LTQ с радиусом 20 Å. Молекулярный докинг был

проведен с использованием программы Glide v8.1. с алгоритмом XP высокого предсказания. Для оценки связывания ингибитор-цинк использовали модуль EpiK. Визуализация докированных комплексов была проведена в программе Maestro 13.5.

Соединения докировали в активный центр моделей ММП-2 и ММП-9, в результате чего были получены значения оценочных функций, характеризующих энергию взаимодействия «лиганд-белок» (docking score) (таблица 6). Для корректной оценки получившихся данных нами были получены значения оценочных функций для некоторых известных ингибиторов желатиназ (рисунок 28) [67, 78, 80, 138, 156, 181, 192, 224]. В результате был выделен интервал значений docking score для связывания ингибиторов в активном центре желатиназ: от -11 до -7 для ММП-2 и от -10 до -5 для ММП-9.

Таблица 6 – 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.

В качестве примера на рисунках 31-32 представлены визуализированные результаты молекулярного докинга соединения I(АЛ-828) по отношению к активному центру ММП-2 (1HOV) и ММП-9 (5CUH) в 2D и 3D-проекциях.

По данным докирования соединение АЛ-828 может связываться с активным центром ММП-2 (1HOV) таким образом, что карбоксильная группа образует связь с каталитическим

ионом цинка, сульфонильная группа образует водородную связь с аминокетной группой основной цепи Leu83, дополнительная стабилизация ингибиторного комплекса происходит благодаря катион- π взаимодействию одного из ароматических колец соединения АЛ-828 с цинком и π - π стекингу этого же ароматического кольца с ароматическим кольцом His120 (рисунок 31).

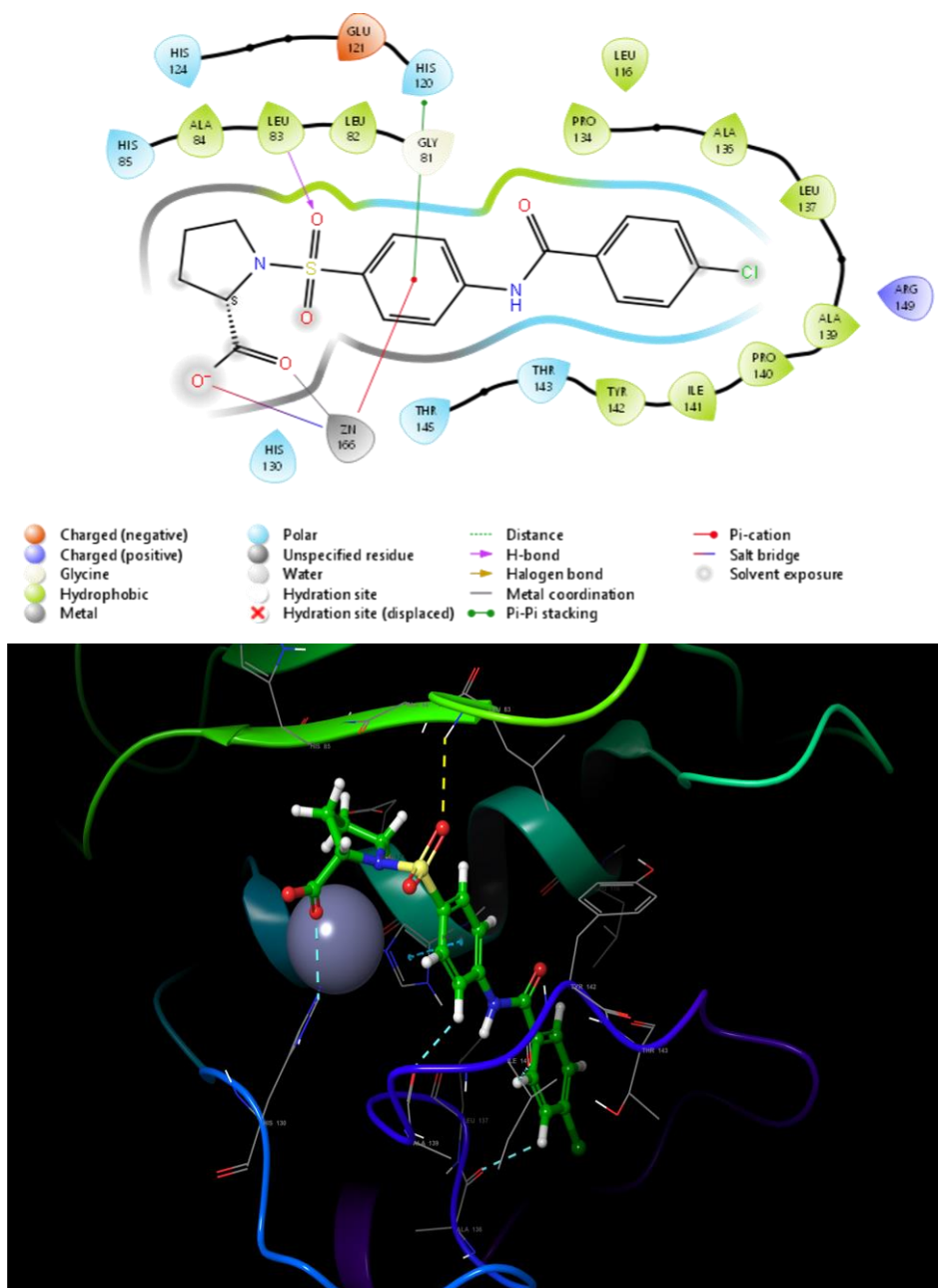


Рисунок 31 – Результат молекулярной стыковки соединения АЛ-828 с 1HOV 2D и 3D проекции

По данным докинга соединение АЛ-828 может связываться с активным центром ММП-9 (5СУН) таким образом, что карбоксильная группа образует связь с каталитическим ионом цинка, сульфонильная группа образует водородные связи с аминокетной группой основной цепи Leu188 и Ala189, и дополнительная стабилизация ингибиторного комплекса происходит благодаря катион- π взаимодействию одного из ароматических колец соединения АЛ-828 с цинком (рисунок 32).

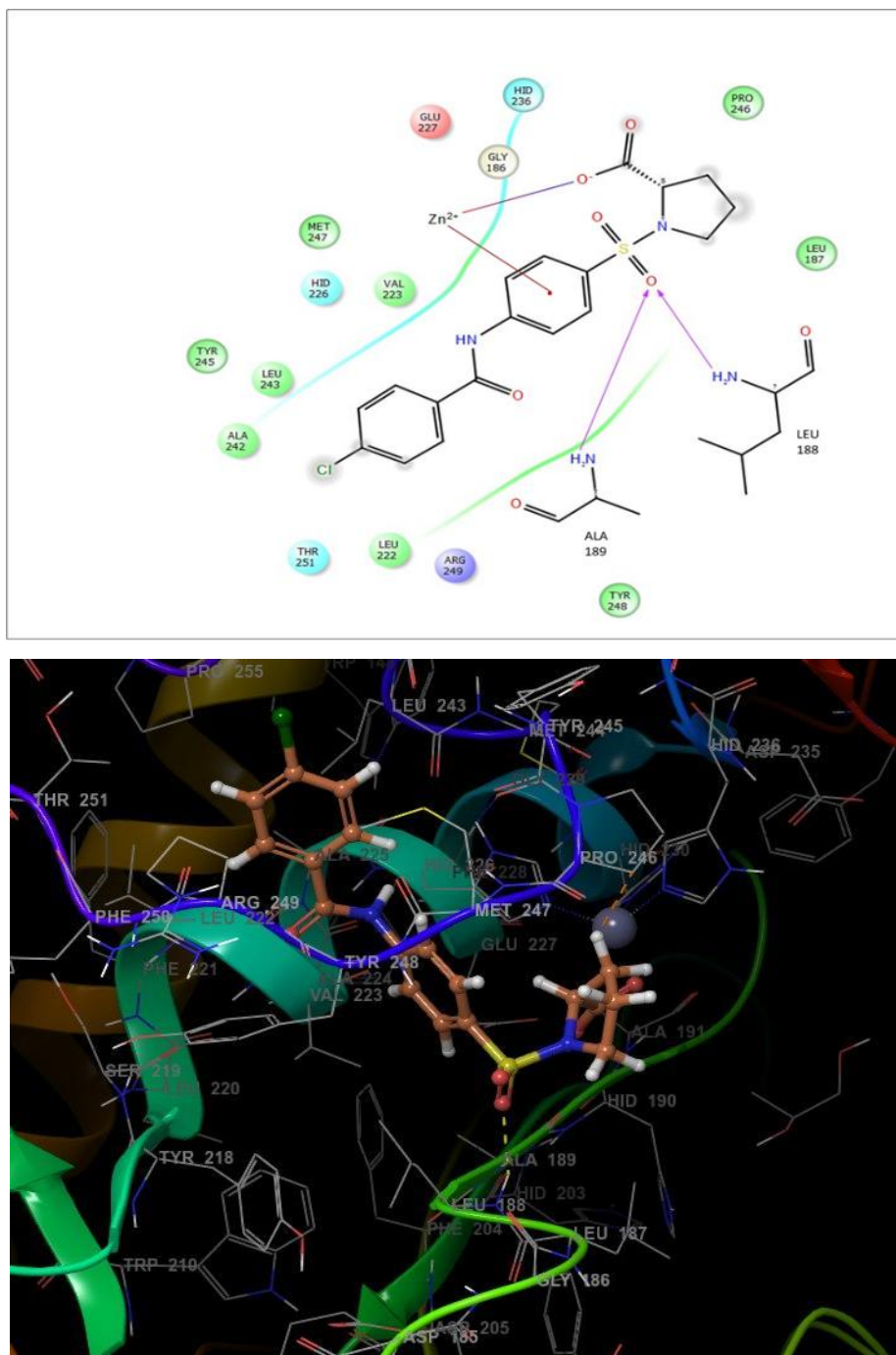


Рисунок 32 – Результат молекулярной стыковки соединения АЛ-828 с 5CUH 2D и 3D проекции

Как видно из таблицы 6 на основании значений величин оценочных функций, характеризующих энергию взаимодействия «лиганд-белок» (docking score), сконструированные соединения (рисунок 30) соответствуют потенциальным ингибиторам ММП-2 и ММП-9.

Таким образом с применением метода молекулярного докинга в программе Glide от Schrodinger было сконструировано 10 предполагаемых ингибиторов ММП-2 и ММП-9.

Полученные результаты опубликованы в патентах:

1. Патент 2820516 C1 Российская Федерация, СПК C07C 311/44; A61K 31/63. Производное антралиновой 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 [42].

2. 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 [43].

Полученные результаты опубликованы в статьях с соавторами:

1. Григоркевич, О.С. Дизайн, синтез и фармакологическая активность нового ингибитора матриксной 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 [17].

2. Григоркевич, О.С. Получение нового ингибитора матриксных металлопротеиназ 2-го и 9-го типов 1-({4-[(2,4-дихлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-(2S,4R)-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. Пантлеев, 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 [20].

Полученные результаты опубликованы в тезисах с соавторами:

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 [121].

3.3. Синтез сконструированных ингибиторов

Сконструированные соединения были синтезированы по общей схеме (рисунок 33).

Исходные арилсульфонилхлориды были получены в две стадии. На первой стадии было проведено ацилирование соответствующего анилина производными бензоилхлорида в этилацетате в присутствии триэтиламина. Полученные бензамиды вводили в реакцию с хлорсульфоновой кислотой при температуре 45 °С и получали арилсульфонилхлориды. На следующей стадии было проведено ацилирование циклических аминокислот арилсульфонилхлоридами и были получены производные циклических аминокислот (I-X). Для получения солей некоторых из производных циклических аминокислот (I-X) исходные кислоты смешивали с гидроксидом натрия в эквимольных соотношениях в воде.

Структура соединений подтверждена методом ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии. Хроматографическая гомогенность подтверждена методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) и ОФ ВЭЖХ, химическая чистота – данными элементного анализа и масс-спектрометрии.

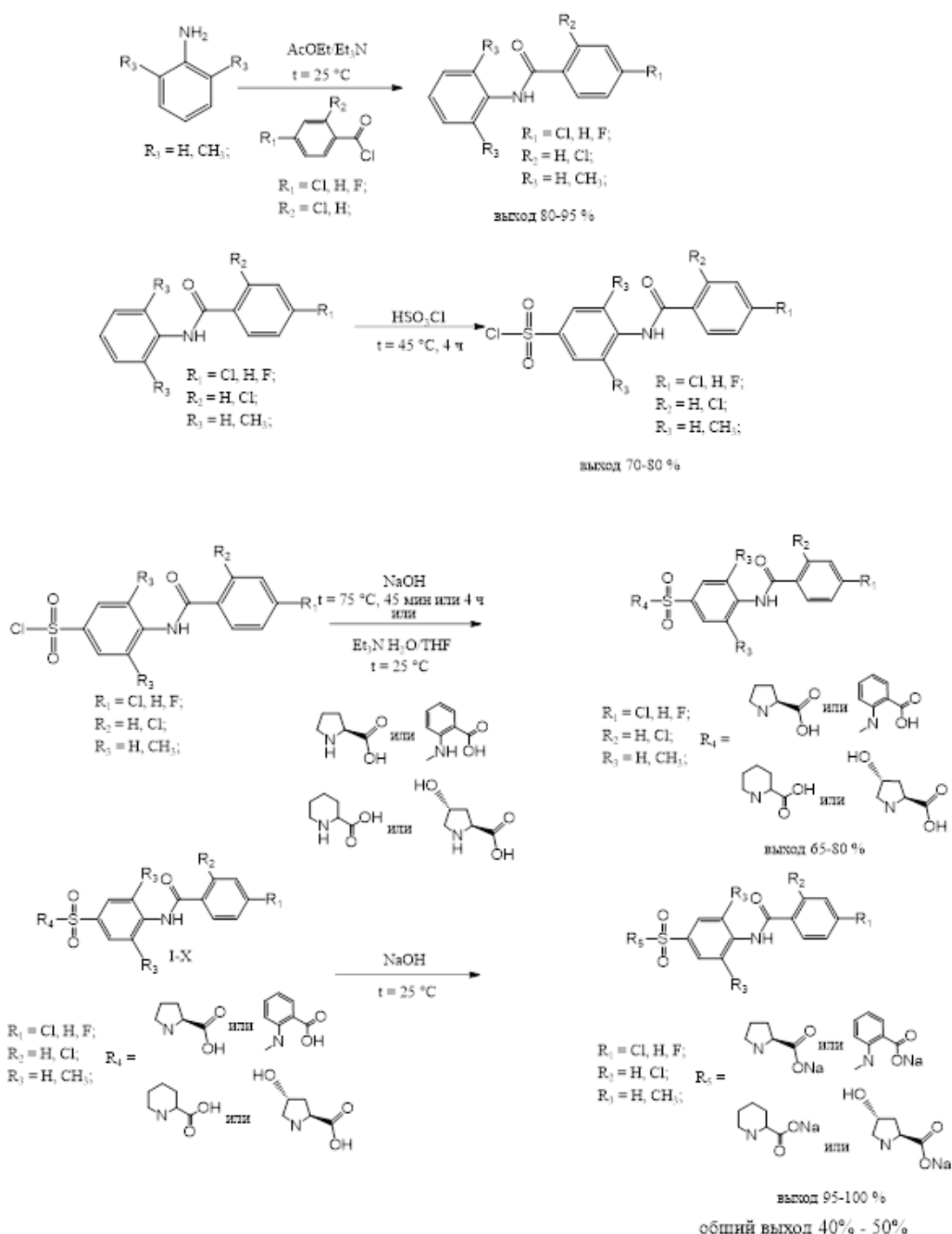


Рисунок 33 – Схема синтеза предполагаемых ингибиторов ММП-2 и ММП-9

Расшифровка спектров ^1H ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии представлена на примере соединения ГГМ-27.

В спектре соединения ГГМ-27 (рисунок 34) присутствуют сигналы протонов дигалогенозамещенного бензольного кольца при 7,56-7,79 м.д., а также сигналы протонов сульфо-замещенного бензольного кольца при 7,81-7,92 м.д. Наличие электроноакцепторных заместителей смещает сигналы протонов бензольных колец в более сильное поле по сравнению с бензолом. Присутствует характерный узкий сигнал протона амидной группы при 10,94 м.д. и

уширенный сигнал протона карбоксильной группы -COOH при 12,74. Характерные сигналы L-оксипролина (Pro) лежат в сильном поле: триплет CH- α 4,05 м.д., уширенный мультиплет CH- γ 4,22 м.д., два уширенных дублета CH₂- δ 3,13 м.д. и 3,46 м.д. ($^2J=11$ Гц), уширенный мультиплет CH₂- β 1,96 м.д., и уширенный сигнал -OH группы при 4,86 м.д.

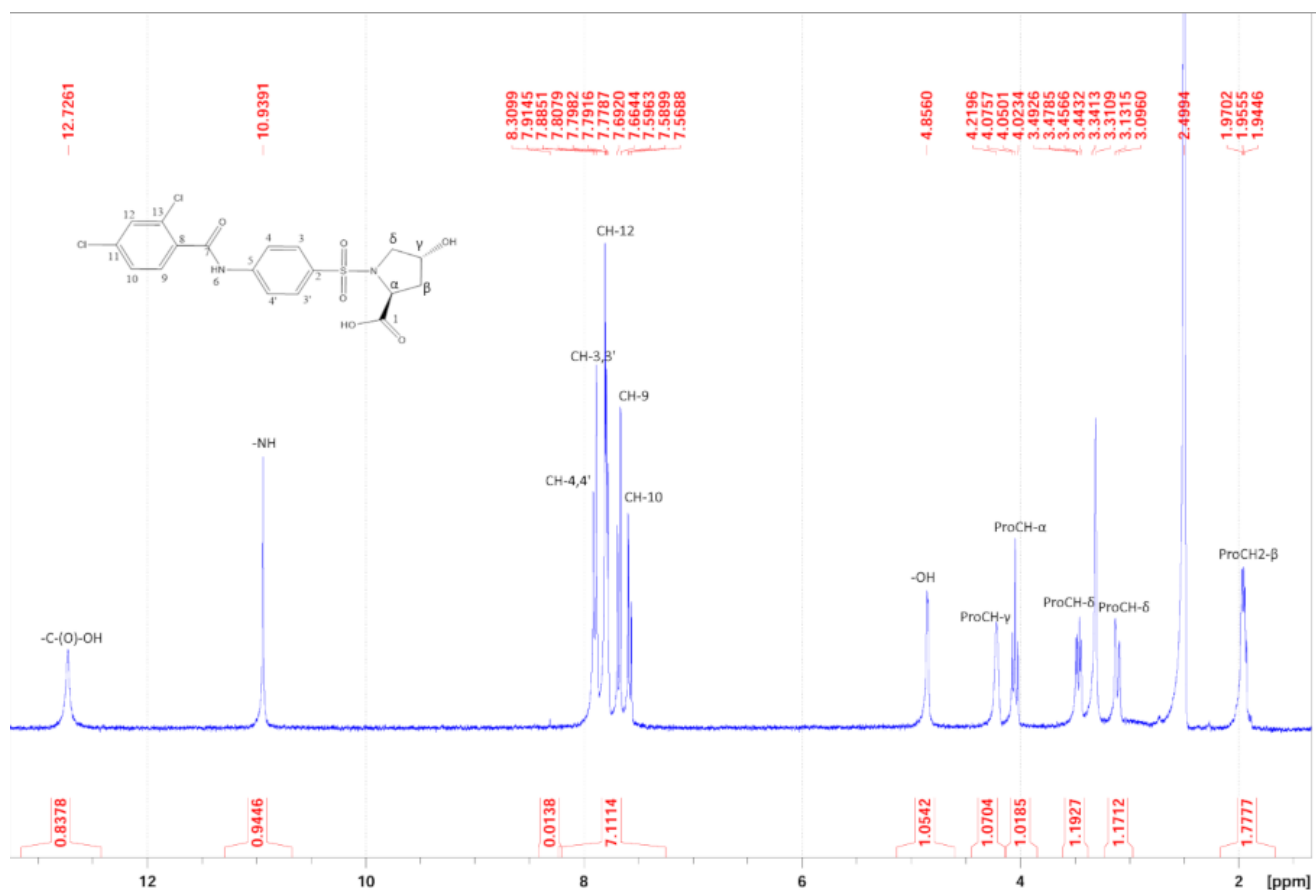


Рисунок 34 – ^1H ЯМР-спектр соединения ГГМ-27

Состав $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ был подтвержден методом масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением (H-ESI) в результате сканирования в режиме регистрации полного ионного тока (режим Q1). В масс-спектре исследуемого соединения наиболее интенсивными ионами являются пики m/z 459,08 (100,0%) и m/z 461,04 (68,6%), молекулярно-массовое распределение которого находится в соответствии с расчетными значениями для формулы $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ $-\text{[M+H]}$ m/z : 458,01 (100.0%) + H^+ , 460.01 (63.9%) + H^+ , полученными в программе ChemBioDraw Ultra 14.0. Таким образом подтверждена структура соединения ГГМ-27 (рисунок 35).

Таким образом разработана универсальная высокотехнологичная общая схема синтеза получения сконструированных ингибиторов, с помощью которой было синтезировано 10 соединений.

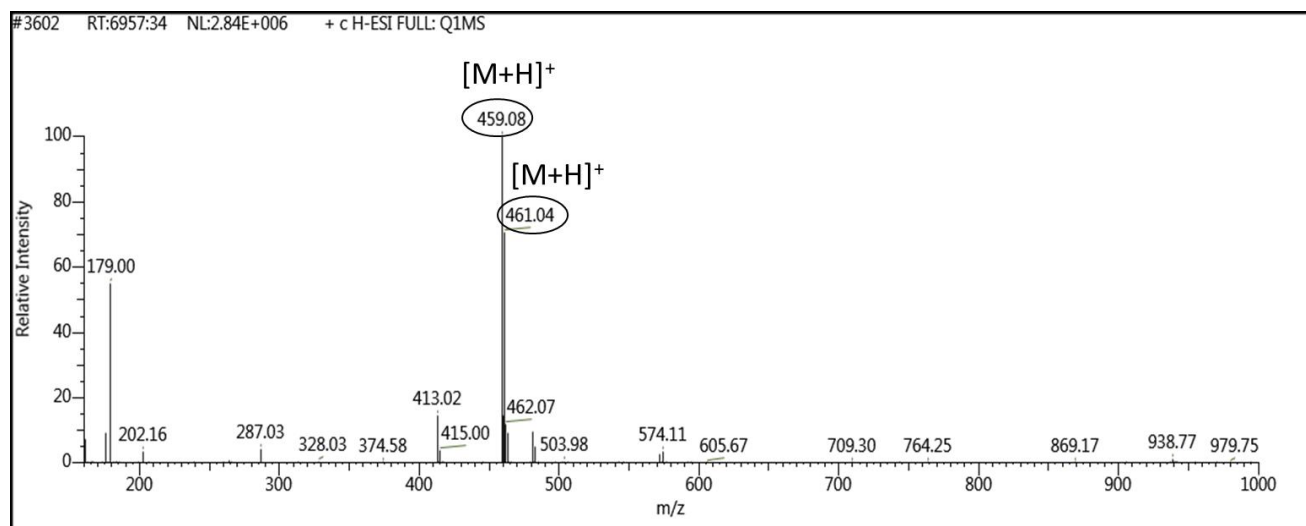


Рисунок 35 – Масс-спектр соединения ГГМ-27

Полученные результаты опубликованы в статьях с соавторами:

1. 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. Ионова, С.А. Крыжановский, Т.А. Гудашева, А.Д. Дурнев // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2018. – Т. 52, № 1. – С. 8-14. [17].

2. Григоркевич, О.С. Получение нового ингибитора матричных металлопротеиназ 2-го и 9-го типов 1-({4-[(2,4-дихлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-(2S,4R)-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. Пантिलеев, 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 [20].

Полученные результаты опубликованы в патентах:

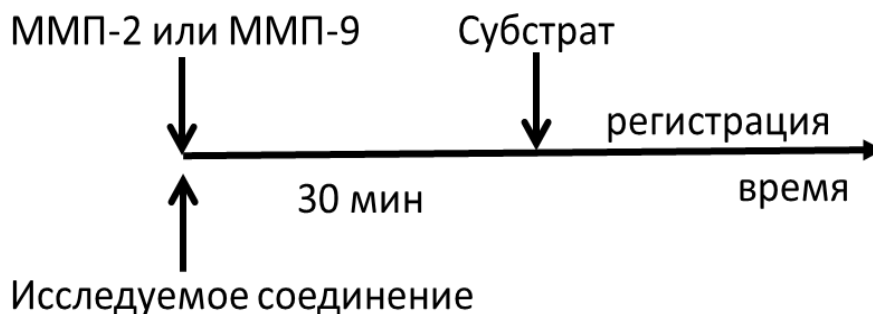
1. Патент 2646752 С2 Российская Федерация, СПК С07D 207/48; С07D 211/96; А61К 31/401; А61К 31/445. Ингибиторы цинк-зависимых металлопротеиназ (ММП-2 и ММП-9) в ряду бензоиламино(фенилсульфонил)-замещенных циклических аминокислот как потенциальные лекарственные средства, препятствующие постинфарктному 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 [41].

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 [42].

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 [43].

3.4. Ингибиторная активность соединений АЛ-828, МЛ-269 и ГГМ-27 по отношению к ММП-2 и ММП-9¹

Для определения ингибиторной активности полученных соединений был проведен *in vitro* эксперимент в присутствии субстрата Mca-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂ и активных рекомбинантных белков ММП-2 и ММП-9 человека. Эксперимент проводился для соединений АЛ-828, МЛ-269 и ГГМ-27 (таблица 7) по следующей схеме:



¹ 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.

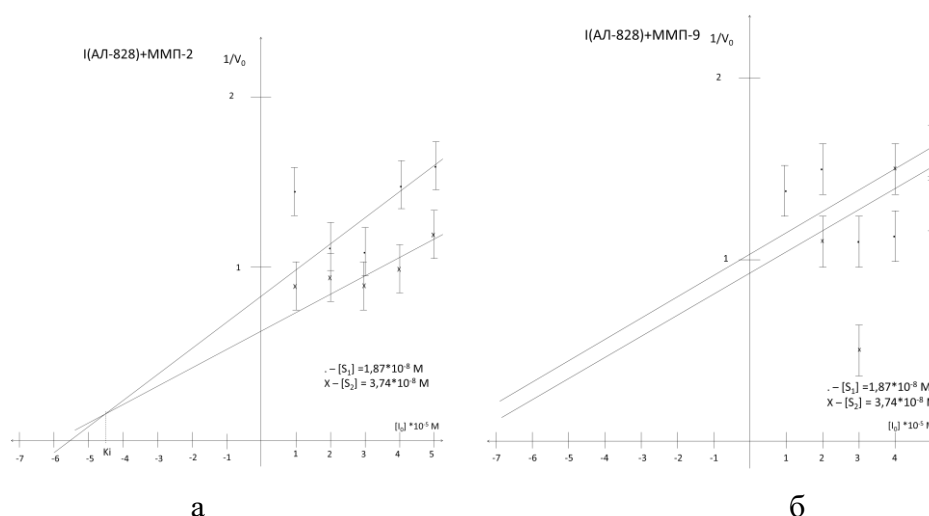
Таблица 7 – Ингибиторная активность по отношению к ММП-2 и ММП-9

Ингибитор	$K_{i\text{ММП-2}}$, М	$K_{i\text{ММП-9}}$, М
АЛ-828	$4,5 \cdot 10^{-5}$	Не ингибирует
МЛ-269	$8,25 \cdot 10^{-5}$	Не ингибирует
ГГМ-27	$9,4 \cdot 10^{-5}$	$9,0 \cdot 10^{-4}$
Доксициклин	лит: $IC_{50} = 1,29 \cdot 10^{-4}$	лит: $IC_{50} = 1,64 \cdot 10^{-4}$

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

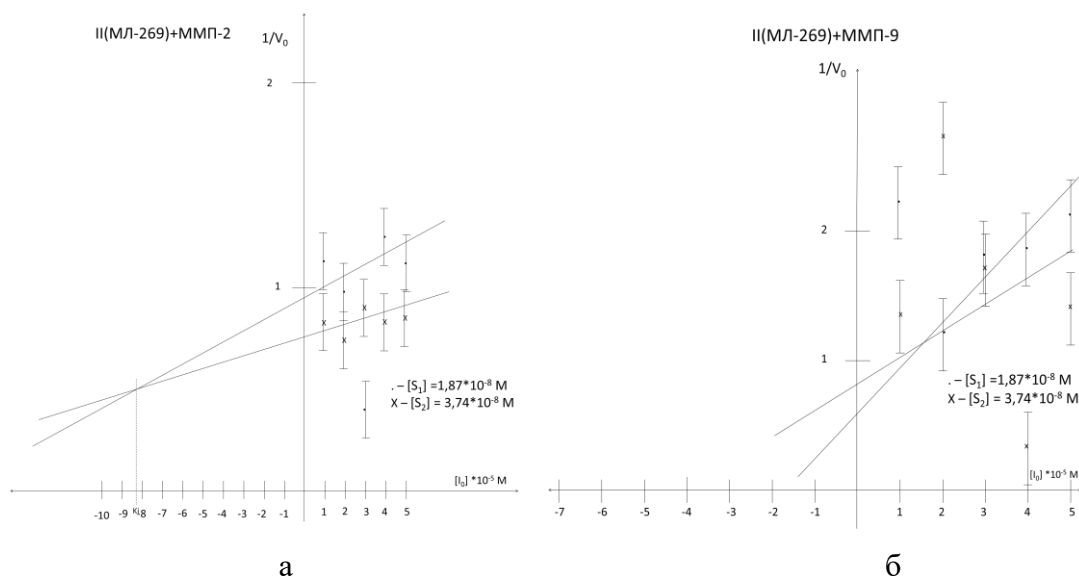
Определение ингибирующей способности изучаемых соединений показало, что соединения АЛ-828 и МЛ-269 ингибировали ММП-2 (значения K_i составили $4,5 \times 10^{-5}$ М и $8,25 \times 10^{-5}$ М соответственно). Не наблюдали заметного влияния соединений АЛ-828 и МЛ-269 на кинетику реакции гидролиза синтетического субстрата Mca-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂ матричной металлопротеиназой 9-го типа.

Соединение ГГМ-27 помимо селективной ингибиторной активности по отношению к ММП-2 ($K_i = 9,4 \cdot 10^{-5}$ М), также ингибировало ММП-9, но в концентрации на порядок меньше ($K_i = 9,0 \cdot 10^{-4}$ М). Интерпретация полученных данных на построенных графиках (рисунок 36-38) позволяет сделать вывод о конкурентном механизме ингибирования ММП-2 соединениями АЛ-828, МЛ-269 и ГГМ-27 (рисунок 36а-38а). Механизм ингибирования ММП-9 соединением АЛ-828 по данным графика (рисунок 36б) является неконкурентным. Для соединения ГГМ-27 механизм ингибирования ММП-9 является конкурентным (рисунок 38б). По ингибирующей активности по отношению к ММП-2 и ММП-9 соединения АЛ-828, МЛ-269 и ГГМ-27 превышают известный ингибитор желатиназ – доксициклин.



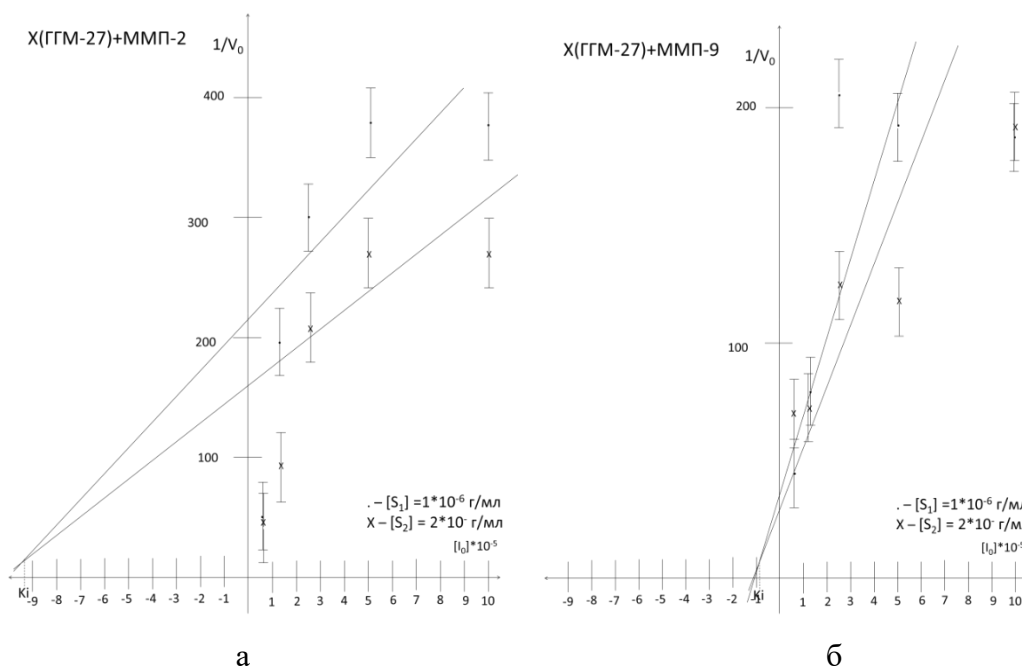
Примечание – K_i ингибитора рассчитывали с помощью линейного регрессионного анализа по методу Диксона ($[I_0] - 1/V_0([I_0])$). Скорости реакции измеряли по первым 10 мин. V_0 – начальная скорость реакции, $[I_0]$ – начальная концентрация ингибитора.

Рисунок 36 – Определение K_i соединения АЛ-828 по отношению к ММП-2 (а) и ММП-9 (б).



Примечание – K_i ингибитора рассчитывали с помощью линейного регрессионного анализа по методу Диксона ($[I_0]$ – $1/V_0([I_0])$). Скорости реакции измеряли по первым 10 мин. V_0 – начальная скорость реакции, $[I_0]$ – начальная концентрация ингибитора.

Рисунок 37 – Определение K_i соединения МЛ-269 по отношению к ММП-2 (а) и ММП-9 (б).



Примечание – K_i ингибитора рассчитывали с помощью линейного регрессионного анализа по методу Диксона ($[I_0]$ – $1/V_0([I_0])$). Скорости реакции измеряли по первым 10 мин. V_0 – начальная скорость реакции, $[I_0]$ – начальная концентрация ингибитора.

Рисунок 38 – Расчет K_i соединения ГГМ-27 по отношению к ММП-2 (а) и ММП-9 (б).

Таким образом, для трех синтезированных соединений из десяти (соединения под шифрами АЛ-828, МЛ-269 и ГГМ-27) была выявлена ингибирующая активность по отношению к ММП-2 и ММП-9.

Полученные результаты опубликованы в статье с соавторами и в патенте:

1. Григоркевич, О.С. Поиск селективных ингибиторов матриксной металлопротеиназы 2-го типа в ряду производных бензоиламино(фенилсульфонил)-замещенных 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 [19].

2. 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 исследований и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий». – № 2023118642, заявл. 14.07.2023; опубликов. 18.09.2024. Бюл. № 26 [43].

3.5. Выявление нейропротекторной активности у АЛ-828 и ГГМ-27¹

Хорошо известна 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 [170, 244]. Несколько исследований выявили участие активации ММП-2 и ММП-9 в окислительном стрессе и клеточном апоптозе при церебральной ишемии [118, 125].

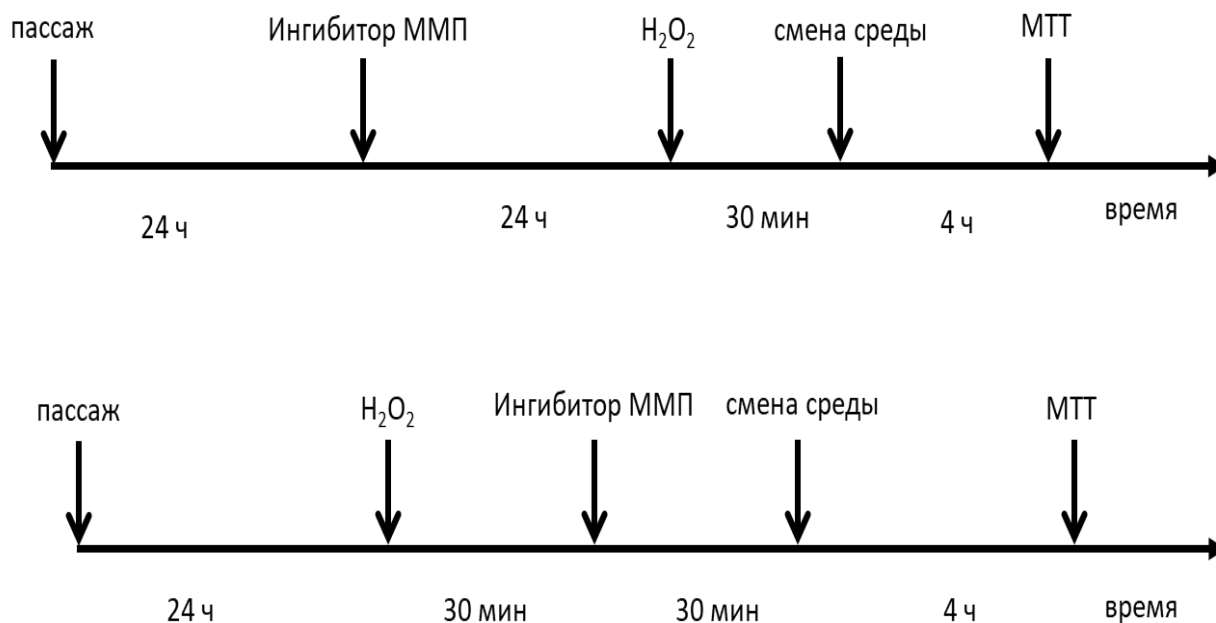
В связи с этим нами были проведены эксперименты по выявлению нейропротекторной активности ингибиторов желатиназ на примере АЛ-828 и ГГМ-27 на модели окислительного стресса на клетках линии НТ-22 [137] в интервале концентраций 10^{-5} - 10^{-8} М. Соединения вносили за 24 ч до и сразу после внесения повреждающего агента.

Для эксперимента были отобраны два соединения. Соединение АЛ-828, в связи с тем, что оно обладает селективной ингибирующей активностью по отношению к ММП-2, которая по величине эффекта превышает ингибирующую активность соединения МЛ-269. И соединение

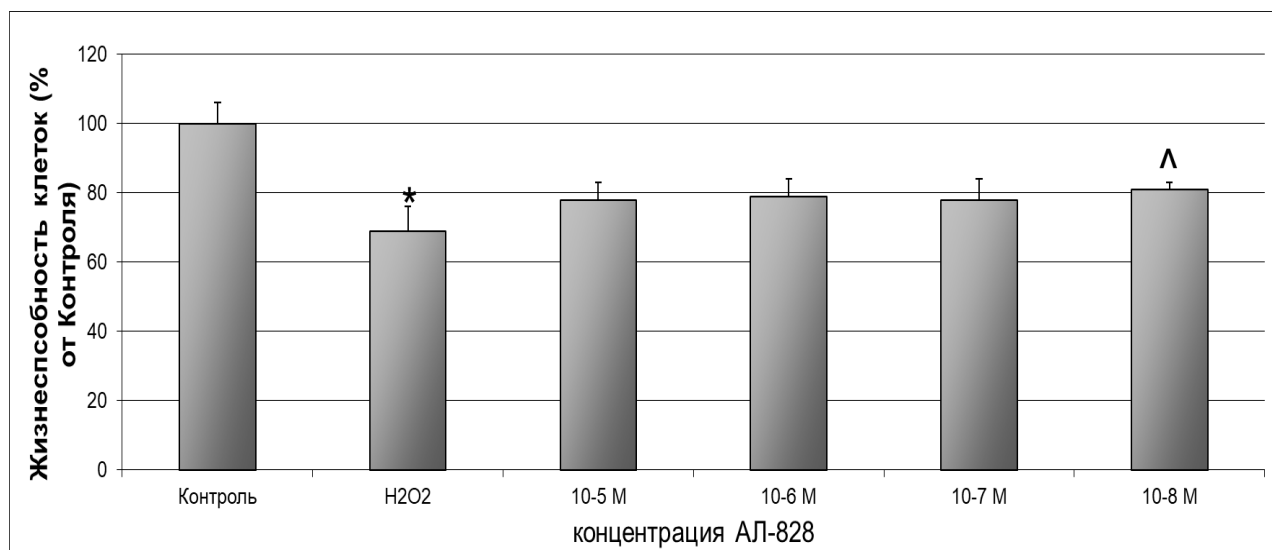
¹ Исследования по выявлению нейропротекторной активности проводили совместно с лабораторией молекулярной фармакологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» (руководитель к.б.н. Зайнуллиной Л.Ф.) в группе фармакологии нейропротекции с н.с. С.В. Николаевым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

ГГМ-27, потому что оно обладает ингибирующей активностью по отношению как к ММП-2, так и к ММП-9.

В соответствии с дизайном эксперимента, опыт проводили по следующей схеме:



Окислительный стресс, вызванный H₂O₂ (1,5 mM), приводил к достоверному снижению жизнеспособности гиппокампальных клеток линии НТ-22. Из-за плохой растворимости АЛ-828 растворяли в 2% ДМСО (конечная концентрация ДМСО в лунке составляла 0,02%), что является приемлемой концентрацией для исследований. Для соединения АЛ-828 нейропротекторный эффект наблюдался в концентрации 10⁻⁸ M (рисунок 39, таблица 8).



Примечание — * p<0,05 по сравнению с контролем, ^ p<0,05 относительно повреждения

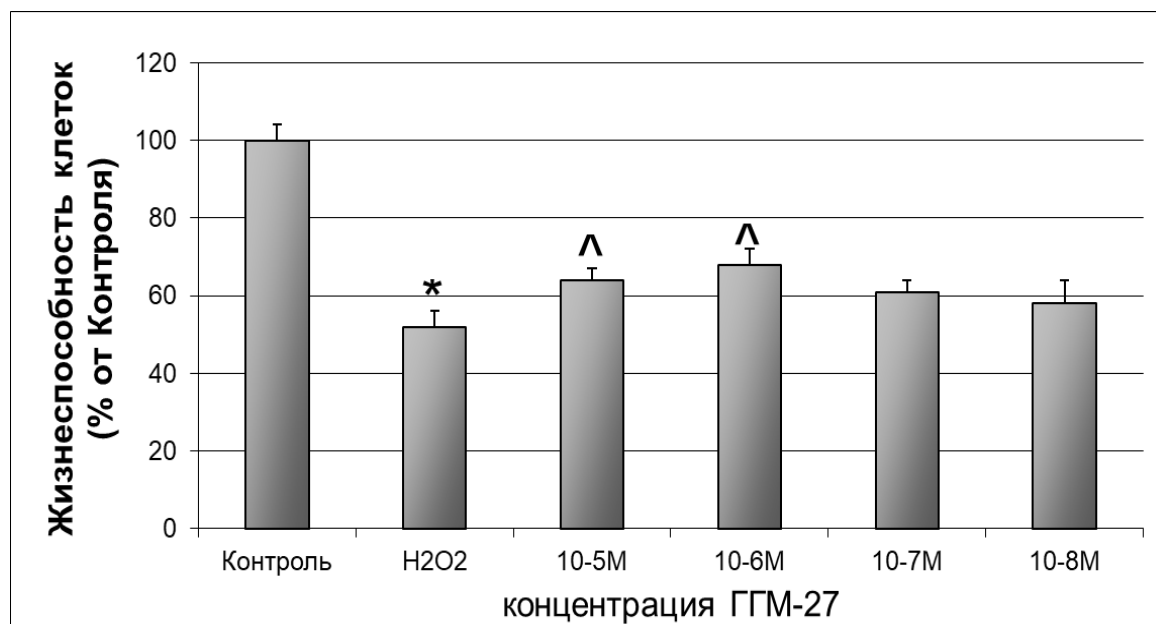
Рисунок 39 – Нейропротекторная активность АЛ-828

Таблица 8 – Влияние селективного ингибитора ММП-2, АЛ-828 на жизнеспособность нейронов НТ-22 в условиях окислительного стресса (данные МТТ-теста). Внесение за 24 час до и сразу после H_2O_2 .

Схема внесения	за 24 ч до H_2O_2	активность, %	после H_2O_2	активность, %
Экспериментальные группы	Результат МТТ-теста, % от контроля.			
Контроль	$0,148 \pm 0,009$	-	$0,133 \pm 0,006$	-
H_2O_2	$0,102 \pm 0,01^*$	-	$0,086 \pm 0,010^*$	-
АЛ-828 $10^{-5}M$	$0,116 \pm 0,008$	30	$0,111 \pm 0,008^{\wedge}$	53
АЛ-828 $10^{-6}M$	$0,117 \pm 0,008$	33	$0,099 \pm 0,007$	28
АЛ-828 $10^{-7}M$	$0,115 \pm 0,008$	28	$0,099 \pm 0,011$	28
АЛ-828 $10^{-8}M$	$0,120 \pm 0,004^{\wedge}$	39	$0,099 \pm 0,011$	28

Примечание: опыты выполнены на гиппокампальных нейронах мыши линии НТ-22. Вещества вносили за 24 ч до и сразу после повреждения. * $p < 0,05$ по критерию Краскела-Уоллеса относительно контроля без H_2O_2 . $\wedge p \leq 0,05$ по критерию Краскела-Уоллеса относительно H_2O_2 . Активность рассчитывали по формуле: $A(\%) = (D_{\text{эксп}} - D_{H_2O_2}) / (D_{\text{контр}} - D_{H_2O_2}) \times 100\%$, где $D_{\text{эксп}}$ – оптическое поглощение раствора в опыте, $D_{H_2O_2}$ – оптическое поглощение раствора контроля с H_2O_2 , $D_{\text{контр}}$ – оптическое поглощение раствора без H_2O_2 .

Для проведения эксперимента с соединением ГГМ-27 предварительно была получена его натриевая соль. Соединение ГГМ-27 достоверно увеличивало жизнеспособность нейронов в концентрациях 10^{-5} — $10^{-6}M$ (рисунок 40, таблица 9).



Примечание – * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, $\wedge p < 0,05$ относительно повреждения

Рисунок 40 – Нейропротекторная активность ГГМ-27

Таблица 9 – Нейропротекторная активность соединения ГГМ-27 на модели окислительного стресса на культуре иммортализованных клеток гиппокампа мыши линии НТ-22 (данные МТТ-теста). Внесение за 24 час до и сразу после H_2O_2 .

Схема внесения	за 24 ч до H_2O_2	активность, %	после H_2O_2	активность, %
Экспериментальные группы	Результат МТТ-теста, % от контроля.			
Контроль	0,185±0,008		0,204±0,008	
H_2O_2	0,097±0,008 *		0,146±0,007 *	
ГГМ-27 $10^{-5}M$	0,119±0,006 ^	25	0,152±0,014	11
ГГМ-27 $10^{-6}M$	0,127±0,007 ^	34	0,156±0,013	17
ГГМ-27 $10^{-7}M$	0,113±0,006	19	0,150±0,014	8
ГГМ-27 $10^{-8}M$	0,107±0,012	12	0,136±0,017	17

Примечание: опыты выполнены на гиппокампальных нейронах мыши линии НТ-22. Вещества вводили за 24 ч до и сразу после повреждения. * $p < 0.05$ по критерию Краскела-Уоллеса относительно контроля без H_2O_2 ; ^ $p \leq 0,05$ по критерию Краскела-Уоллеса относительно H_2O_2 . Активность рассчитывали по формуле: $A(\%) = (D_{\text{эксп}} - D_{H_2O_2}) / (D_{\text{контр}} - D_{H_2O_2}) \times 100\%$, где $D_{\text{эксп}}$ – оптическое поглощение раствора в опыте, $D_{H_2O_2}$ – оптическое поглощение раствора контроля (с H_2O_2), $D_{\text{контр}}$ – оптическое поглощение пассивного контроля (без H_2O_2).

Исходя из литературных данных [170], можно предположить, что в иммортализованных клетках гиппокампа мыши линии НТ-22 окислительный стресс мог привести к активации ММП-2 и ММП-9, а соединения АЛ-828 и ГГМ-27, за счет ингибирования активной ММП-2 и ММП-9, способствуют увеличению выживаемости нейронов.

Таким образом для ингибитора ММП-2, соединения АЛ-828, и ингибитора ММП-2 и ММП-9, соединения ГГМ-27, была выявлена нейропротекторная активность.

Полученные результаты опубликованы в патенте:

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 [43].

3.6. Определение полулетальной дозы¹

Для ингибиторов АЛ-828, МЛ-269 и ГГМ-27 была определена полулетальная доза (ЛД50) при в/б введении у мышей. Для соединения АЛ-828 ЛД50 была определена при интрагастральном (р.о.) введении и оказалась более 2000 мг/кг. Для доксициклина ЛД50 (мыши р.о.) = 1870 мг/кг (таблица 10) [105].

Таблица 10 – 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) 125 (самки)	-
ЛД50, мг/кг, р.о.	> 2000	-	-	870

Примечание: Расчет проводили по методу Литчфилда-Уилкоксона с доверительными 95% интервалами. ЛД50 – полулетальная доза – средняя доза вещества, вызывающая гибель половины членов испытываемой группы.

Как видно из таблицы 10 заявляемые соединения относятся к IV классу токсичности, т.е. к малотоксичным веществам.

Полученные результаты опубликованы в патенте:

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 [41].

Полученные результаты опубликованы в статье с соавторами:

Григоркевич, О.С. Дизайн, синтез и фармакологическая активность нового ингибитора матриксной металлопротеиназы-9 [Текст] / О.С. Григоркевич, Г.В. Мокров, А.С. Дябина, В.Н.

¹ Исследования проводили совместно с лабораторией фармакологии кровообращения (заведующий лабораторией д.м.н. Крыжановский 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.

Столярук, И.Б. Цорин, Е.О. Ионова, С.А. Крыжановский, Т.А. Гудашева, А.Д. Дурнев // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52, № 1. – С. 8-14 [17].

3.7. Выявление антиметастатической и противоопухолевой активностей АЛ-828 и ГГМ-27¹

ММП-2/-9 принимают участие в механизме опухолевой инвазии и ангиогенеза при опухолевом росте за счет способности разрушать базальную мембрану и компоненты ВКМ. Для ряда ингибиторов ММП проводились клинические исследования как препаратов для лечения различных типов онкологических заболеваний, включая злокачественные новообразования молочной железы и легких [189].

В связи с этим соединения АЛ-828 и ГГМ-27, обладающие ингибиторной активностью по отношению к ММП-2, были отобраны для изучения их противоопухолевых и антиметастатических свойств.

3.7.1. Антиметастатическая активность АЛ-828 на модели карциномы легкого Льюис

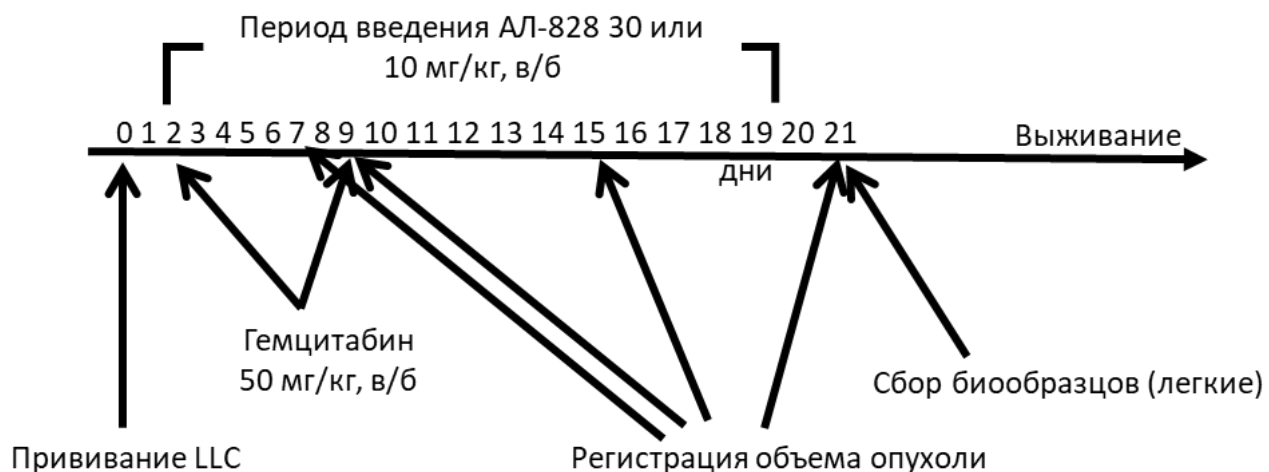
Изучение противоопухолевой активности АЛ-828 было проведено на экспериментальной модели эпидермоидной карциномы легкого Льюис (англ. Lewis Lung Carcinoma, LLC) [26], полученной из банка клеточных культур ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина".

По данным литературы, диапазон доз для изучения противоопухолевой и антиметастатической активностей ингибиторов ММП варьируется от 10 мг/кг до 120 мг/кг [102, 185, 237], поэтому для пилотных исследований АЛ-828 были отобраны дозы 10 мг/кг и 30 мг/кг для курсового введения.

День подкожной прививки клеток опухолевого штамма считается нулевым днем развития опухоли. В качестве положительного контроля был использован гемцитабин, препарат 1 линии

¹ 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.

противоопухолевой терапии, применяемый для лечения немелкоклеточного рака легкого [106]. Гемцитабин вводили в/б в дозе 50 мг/кг на 2-й и 9-й день развития опухоли в соответствии с литературными данными [247]. Соединение АЛ-828 вводили и в течение 14 дней в двух дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг, в/б. Средний объем опухоли измеряли согласно руководству [26] на 15-й (1-й день после окончания введения АЛ-828) и 21-й день (7-й день после окончания введения АЛ-828) после начала эксперимента, а также на 7-й и 9-й день (6-й и 8-й день после начала введения АЛ-828) для дополнительного контроля роста опухоли. Опыт проводили по следующей схеме:



У животных активного контроля средний объем опухоли на 7-е, 9-е, 15-е и 21-е сутки составил $288,6 \pm 43,3 \text{ мм}^3$, $565,6 \pm 37,8 \text{ мм}^3$, $2208,7 \pm 478,9 \text{ мм}^3$, $3649,5 \pm 588,4 \text{ мм}^3$ соответственно. У животных получавших гемцитабин в суммарной дозе 100 мг/кг определено достоверное уменьшение среднего объема опухоли ($p < 0,05$) по сравнению с контролем на 7-е, 9-е, 15-е и 21-е сутки $110,6 \pm 14,6 \text{ мм}^3$, $268,9 \pm 32,2 \text{ мм}^3$, $867,3 \pm 212,7 \text{ мм}^3$, $1457,6 \pm 240 \text{ мм}^3$ соответственно. У животных получавших соединение АЛ-828 в дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг не определено достоверного уменьшения среднего объема опухоли по сравнению с контролем. В эксперименте достоверное торможение роста опухоли (ТРО) определено только для гемцитабина на 21-е сутки развития опухоли, через 7 дней после окончания введения препарата. При введении препарата сравнения на 2-й и 9-й день развития LLC в суммарной дозе 100 мг/кг на 7 сутки развития опухоли ТРО составило 60,5%, на 9 сутки развития опухоли ТРО составило 52,2%, на 15 сутки – 60,8% и на 21 сутки (через 7 дней после окончания введения препарата) ТРО составило 60%. Курсовое введение соединения АЛ-828 не приводило к значимому ТРО ни на одном сроке наблюдения (таблица 11).

Таблица 11 – Влияние АЛ-828 и гемцитабина на рост LLC у мышей-опухоленосителей C57BL/6

Группы n=10	Изменение объема опухоли LLC							
	7 сутки развития		9 сутки развития		15 сутки развития		21 сутки развития	
	V _{LLC} мм ³	ТРО [^] %	V _{LLC} мм ³	ТРО [^] %	V _{LLC} мм ³	ТРО [^] %	V _{LLC} мм ³	ТРО [^] %
Контроль, LLC	288,6±43,3	-	565,6±37,8	-	2208,7±478,9	-	3649,5±588,4	-
Гемцитабин 50 мг/кг, в/б, двукратно	110,6±14,6*	61,7	268,9±32,2*	52,5	867,3±212,7*	60,7	1457,6±240*	60,0
АЛ-828, 10 мг/кг, в/б	279,6± 34,3	3,1	428,3±65,4	24,3	931,9 ±205,0	57,8	2535,3±433,1	30,5
АЛ-828, 30 мг/кг, в/б	239,7±45,2	16,9	352,8±58,3	37,6	1629,6±296,5	26,2	3423,1±547,5	6,2

Примечание: * - $p < 0,05$ по критерию Тьюки, n – количество животных в группе. ^ - ТРО - торможение роста опухоли. Расчет объема опухоли проводили после измерения 3-х ее размеров по формуле: $V = A \times B \times C$; ТРО вычисляли по формуле $ТРО\% = (V_{\text{контроля}} - V_{\text{опыта}}) / V_{\text{контроля}} \times 100\%$

У всех животных группы активного контроля и групп животных-опухоленосителей, которым вводили АЛ-828 в дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг, были выявлены метастазы. У одной мыши из 10-и, которым вводили гемцитабин, метастазов не выявили. У всех животных опытных групп определено значимое подавление метастазирования по сравнению с группой активного контроля.

При изучении антиметастатических свойств, согласно «Методическим указаниям по доклиническому изучению средств, обладающих способностью ингибировать процесс метастазирования и повышать эффективность цитостатической терапии злокачественных опухолей» [26] соединения, обладающие антиметастатической активностью, должны эффективно ингибировать процесс спонтанного метастазирования перевиваемых опухолей при подкожной или внутримышечной их перевивке в присутствии первичного опухолевого узла на 35-75%. Индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) при 14-и дневном введении соединения АЛ-828 в дозе 10 мг/кг составил 48,3%, при введении АЛ-828 в дозе 30 мг/кг ИИМ составил 39,2%, при двукратном введении гемцитабина в дозе 50 мг/кг определено выраженное подавление метастазирования, ИИМ составил 75,8% (таблица 12, 13). Степень поражения легких метастазами у животных опытных групп была значимо менее выраженной по сравнению с животными-опухоленосителями группы активного контроля.

Таблица 12 – Влияние АЛ-828 и гемцитабина на развитие процессов метастазирования у мышей C57BL/6 с LLC

Группы: n=10	Параметры метастазирования на 21 сутки развития LLC		
	Количество животных с метастазами, %	Количество метастазов на 1 мышь ($M \pm m$)	ИИМ [^] , % [^]
Контроль	100	32,5 \pm 2,9	-
Гемцитабин 50 мг/кг, в/б, двукратно	90	9,0 \pm 1,5*	75,8
АЛ-828, 10 мг/кг, в/б	100	16,8 \pm 1,3*	48,3
АЛ-828, 30 мг/кг, в/б	100	19,8 \pm 1,0*	39,2

Примечание: * - $p < 0,05$ по критерию Тьюки, n – количество животных в группе. [^] - ИИМ – индекс ингибирования метастазирования, рассчитывали по формуле: $\text{ИИМ} = (A_k \times B_k) - (A \times B) / (A_k \times B_k) \times 100\%$, 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.

Таким образом, соединение АЛ-828 в использованном диапазоне доз проявило статистически значимую антиметастатическую активность, уступающую, однако, по выраженности эффекта гемцитабину.

В таблице 13 представлены данные, характеризующие степень поражения лёгких в зависимости от количества и размера метастазов. В активном контроле животных с LLC наблюдали до 50 % животных с лёгкой и тяжёлой степенью метастазирования в лёгких. На фоне использования гемцитабина или соединения АЛ-828 в дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг не менее 90 % животных характеризовались лёгкой степенью поражения лёгких.

Таблица 13 – Влияние АЛ-828 и гемцитабина на тяжесть метастатического поражения мышей C57BL/6 с LLC

Группы	Степень поражения легких метастазами (%)					
	Нет метастазов	ЛСП [^]		ВПС ^{^^}		
		1	2	3	4	5
Контроль	-	-	50	40	10	-
Гемцитабин 50 мг/кг, в/б	10	40	50	-	-	-
	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$			
АЛ-828 10 мг/кг, в/б	-	20	70	10	-	-
	-	$p < 0,05$		$p < 0,05$		
АЛ-828 30 мг/кг, в/б	-	-	100	-	-	-
	-	$p < 0,05$		$p < 0,05$		

Примечание: n-количество животных в группе; $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой по тесту Манна-Уитни; [^] - ЛСП- легкая степень метастатического поражения: 1 - количество метастазов меньше 10 с диаметров не больше 1 мм; 2 - количество метастазов от 10 до 30 с диаметром 1 мм; ^{^^} - ВСП- высокая степень метастатического поражения: 3 - количество больше 30 метастазов различных размеров, однако отсутствуют сливные метастазы; 4 - тяжёлое поражение лёгочной ткани, менее 100 штук, однако отсутствуют сливные метастазы; 5 - массивное поражение лёгких, более 100 метастазов, наличие сплошных опухолевых узлов.

Согласно данным, представленным в таблице 14 в эксперименте не выявлено значимых изменений увеличения средней продолжительности жизни (УПЖ). УПЖ у животных, получавших гемцитабин в суммарной дозе 100 мг/кг составило 47 %. При курсовом введении соединения АЛ-828 в дозе 10 мг/кг УПЖ составило 0 %, при введении АЛ-828 в дозе 30 мг/кг – 28,2 %.

Таблица 14 – Оценка средней продолжительности жизни после курсового введения АЛ-828 и гемцитабина у мышей C57BL/6 с LLC

Группы n=10	СПЖ [^] , дни	УПЖ ^{^^} , %
Контроль LLC	11,7±3,7	-
LLC + гемцитабин 50 мг/кг, в/б, двукратно	17,2±9,2	47
LLC + АЛ-828 10 мг/кг, в/б	11,6±5,7	0
LLC + АЛ-828 30 мг/кг, в/б	15,0±3,4	28,2

Примечание: n – количество животных в группе. [^] - СПЖ - средняя продолжительность жизни. ^{^^} – УПЖ – увеличение средней продолжительности жизни, рассчитывали по формуле: $УПЖ = (СПЖ_{\text{опыта}} - СПЖ_{\text{контроля}}) / СПЖ_{\text{контроля}} \times 100\%$.

Медиана выживаемости по методу Каплан-Мейера (рисунок 41) у животных активного контроля составила 14,0 дней, при введении гемцитабина в суммарной дозе 100 мг/к – 14,0 дней. При введении АЛ-828 в дозе 10 мг/кг медиана выживаемости составила 14,0 дней, а при введении АЛ-828 в дозе 30 мг/кг – 9,0 дней.

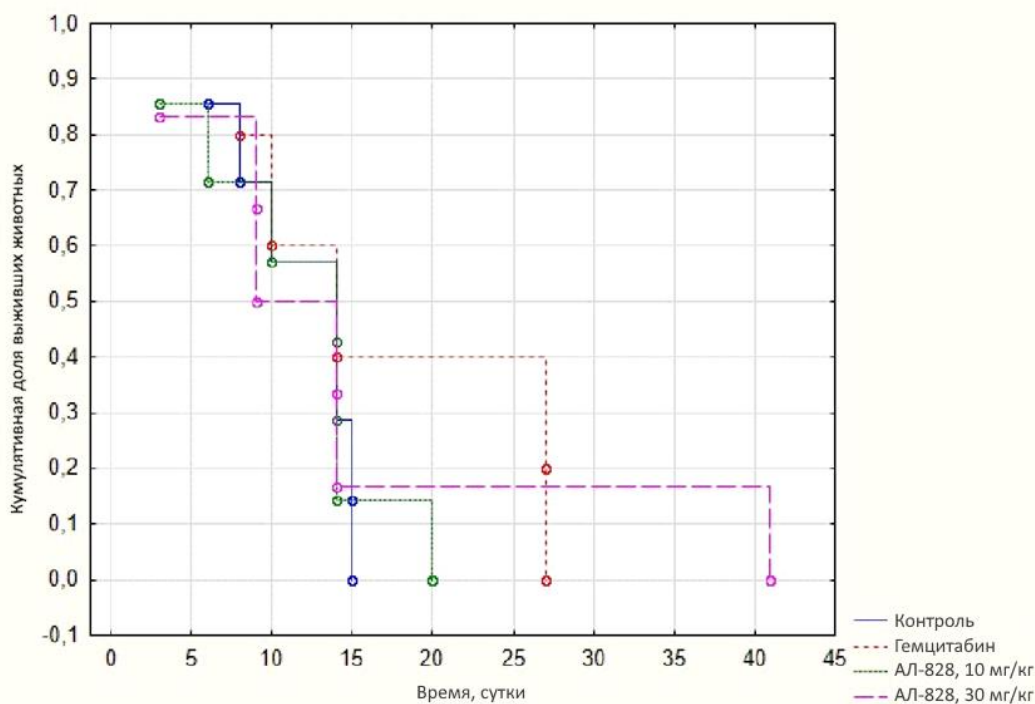


Рисунок 41 – Влияние АЛ-828 и гемцитабина на продолжительность жизни у мышей C57BL/6 с LLC

Курсовое введение АЛ 828 в дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг и гемцитабина в суммарной дозе 100 мг/кг не вызывает значимого увеличения средней продолжительности жизни и медианы выживаемости животных-опухоленосителей опытных групп по сравнению с активным контролем.

Таким образом в опытах *in vivo* впервые установлены антиметастатические свойства ингибитора ММП-2, соединения АЛ-828, что указывает на целесообразность дальнейшего изучения его фармакологической активности в более широком диапазоне доз с использованием других экспериментальных моделей.

Полученные результаты опубликованы в статье с соавторами:

Григоркевич, О.С. Антиметастатическая активность ингибитора матриксной 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 [14].

Полученные результаты опубликованы в тезисах с соавторами:

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. [15]

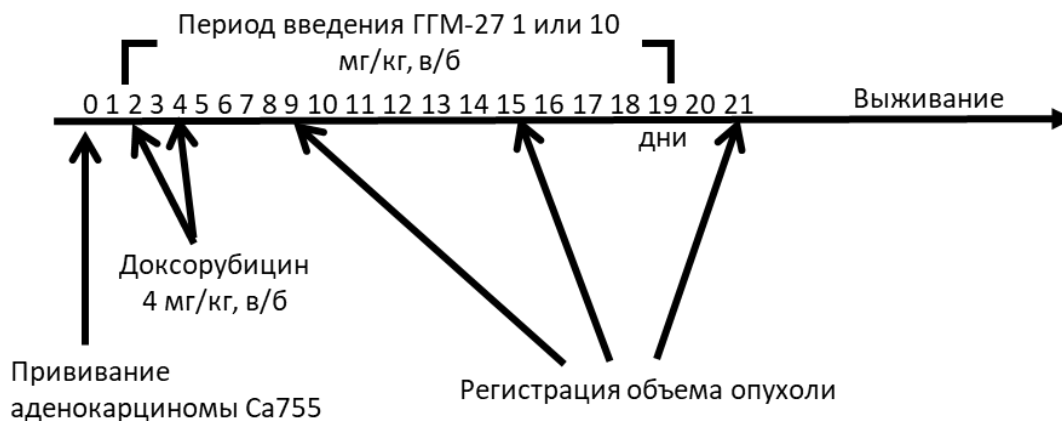
3.7.2. Противоопухолевая активность ГГМ-27 на модели аденокарциномы молочной железы Ca755

Изучение противоопухолевой активности ГГМ-27 было проведено на экспериментальной модели аденокарциномы молочной железы Ca755 [26], полученной из банка клеточных культур ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина".

При изучении АЛ-828 лучший ИИМ и ТРО на 7-е сутки после окончания введения соединения показала доза 10 мг/кг, поэтому для ГГМ-27 были отобраны дозы 1 мг/кг и 10 мг/кг для курсового введения.

День подкожной прививки клеток опухолевого штамма считается нулевым днем развития опухоли. Исследуемое соединение ГГМ-27 вводили животным в течение 14 дней в двух дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг, в/б. Для подтверждения валидности модели сравнения использовали

противоопухолевый препарат доксорубицин, применяемый в клинике для лечения рака молочной железы [64]. Доксорубицин вводили в дозе 4 мг/кг, в/б на 2-е и 4-е сутки развития аденокарциномы Ca755 в соответствии с данными литературы [64]. Опыт проводили по следующей схеме:



Средний объем опухоли измеряли согласно руководству [26] на 15-й (1-й день после окончания введения ГГМ-27) и 21-й день (7-й день после окончания введения ГГМ-27) после начала эксперимента, а также на 9-й день (8-й день после начала введения ГГМ-27) для дополнительного контроля роста опухоли.

У животных активного контроля средний объем опухоли на 9-е, 15-е и 21-е сутки составил $302,9 \pm 79,1 \text{ мм}^3$, $5353,8 \pm 930,9 \text{ мм}^3$, $10908,7 \pm 1307,8 \text{ мм}^3$ соответственно. У животных, получавших ГГМ-27 в дозе 1 мг/кг определено достоверное уменьшение среднего объема опухоли по сравнению с контролем ($p < 0,05$) на 9-е и 21-е сутки $90,8 \pm 50,4 \text{ мм}^3$ и $4036,9 \pm 710,2 \text{ мм}^3$ соответственно. В группе животных, получавших ГГМ-27 в дозе 10 мг/кг, также определено достоверное уменьшение среднего объема опухоли по сравнению с контролем ($p < 0,05$) на 9-е и 21-е сутки $84,5 \pm 56,34 \text{ мм}^3$ и $4074,1 \pm 672,5 \text{ мм}^3$ соответственно. У животных, получавших доксорубицин в дозе 4 мг/кг, определено достоверное уменьшение среднего объема опухоли ($p < 0,05$) по сравнению с контролем на 9-е, 15-е и 21-е сутки $7,5 \pm 6,2 \text{ мм}^3$, $462,4 \pm 122,9 \text{ мм}^3$ и $2951,1 \pm 608,4 \text{ мм}^3$ соответственно. В эксперименте определено достоверное торможение роста опухоли (ТРО) на следующие сутки после окончания введения препарата: при введении ГГМ-27 в дозе 1 мг/кг ТРО на 15-е сутки составило 76%, при введении в дозе 10 мг/кг – 71%. Доксорубицин при введении на 2-е и 4-е сутки на 15-е сутки развития опухоли вызывал выраженное ТРО, которое составило 91%. При введении ГГМ-27 в дозе 1 мг/кг ТРО на 21-й день опыта (через 7 дней после окончания введения ГГМ-27) составило 63%, при введении ГГМ-27 в дозе 10 мг/кг ТРО относительно дозы 1 мг/кг фактически не изменилось, и составило 62%. При введении доксорубицина ТРО на 21-е сутки развития опухоли составило 73% (таблица 15).

Таким образом, полученные данные указывают на выраженную противоопухолевую активность ГГМ-27 при его 14-ти дневном введении в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг.

Таблица 15 – Оценка 14-ти дневного введения ГГМ-27 и двукратного введения доксорубина на торможение роста опухоли самок мышей линии C57BL/6 с аденокарциномой Ca755

Группы n=10	Средний объем опухоли, мм			ТРО^ на 15-е сутки, %	ТРО^ на 21-е 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: $V = A \times B \times C$; ТРО высчитали по формуле $ТРО\% = (V_{\text{контроля}} - V_{\text{опыта}}) / V_{\text{контроля}} \times 100\%$.

Согласно полученным данным, увеличение средней продолжительности жизни (УПЖ) при введении ГГМ-27 в дозе 1 мг/кг составило 45%, при введении в дозе 10 мг/кг УПЖ составило 47%. При введении препарата сравнения доксирубина УПЖ составило 58% по сравнению с активным контролем (таблица 16).

Таблица 16 – Оценка 14-ти дневного введения ГГМ-27 и двукратного введения доксорубина на выживаемость самок мышей линии C57BL/6 с аденокарциномой Ca755

Группы, n=10	Средняя продолжительность жизни, сутки	УПЖ^, %
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, рассчитывали по формуле: $УПЖ = (СПЖ_{\text{опыта}} - СПЖ_{\text{контроля}}) / СПЖ_{\text{контроля}} \times 100\%$

Медиана выживаемости по методу Каплан-Мейера (рисунок 42) у животных активного контроля составила 18,0 дней, при введении доксорубина – 31,0 день. 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.

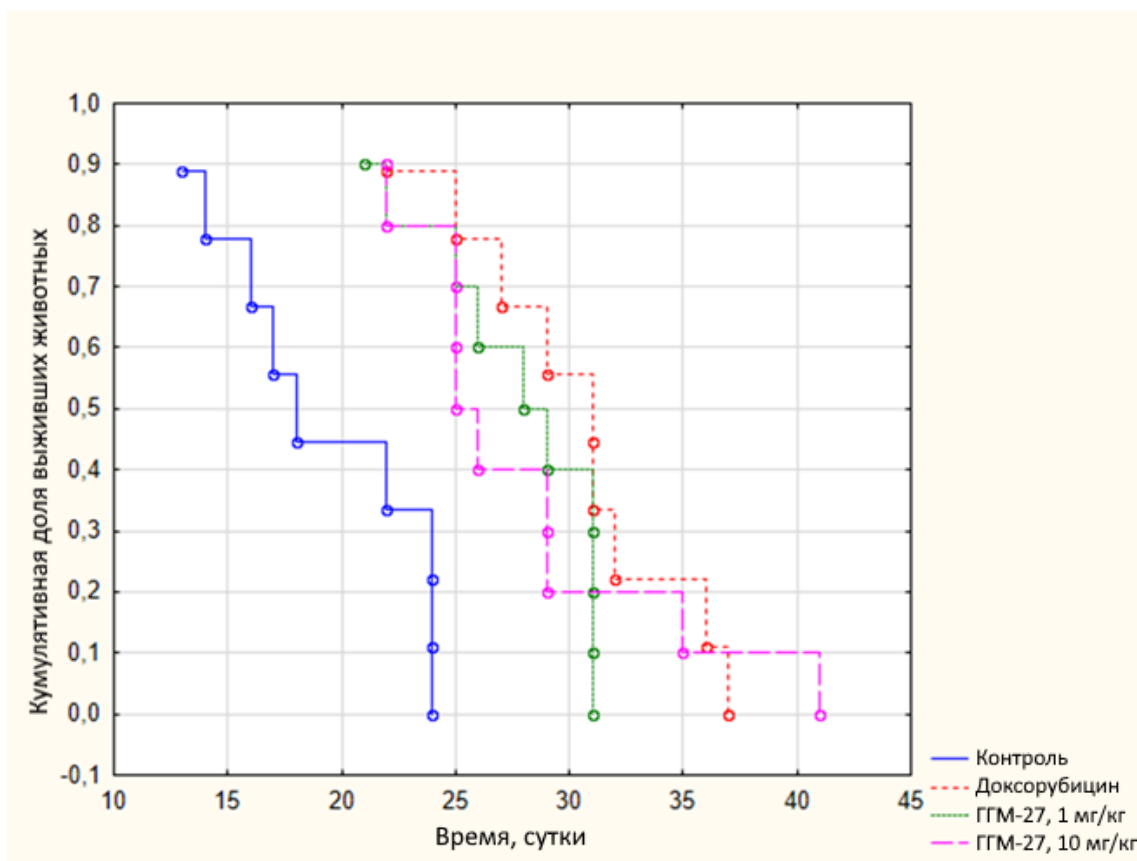


Рисунок 42 – Влияние ГГМ-27 и доксорубина на продолжительность жизни у мышей C57BL/6 с аденокарциномой Ca755.

Курсовое введение ГГМ-27 в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг и доксорубин в суммарной дозе 8 мг/кг значительно увеличивает среднюю продолжительности жизни и медиану выживаемости животных-опухоленосителей опытных групп по сравнению с активным контролем.

Таким образом в опытах *in vivo* впервые установлены противоопухолевые свойства ингибитора ММП-2 и ММП-9, соединения ГГМ-27, что указывает на целесообразность дальнейшего изучения его фармакологической активности в более широком диапазоне доз с использованием других экспериментальных моделей.

Полученные результаты опубликованы в патенте:

Патент 2826902 С1 Российская Федерация, СПК С07D 207/48; А61К 31/401; А61Р 35/00; А61Р 25/00. Ингибитор матричных 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 исследований и перспективных технологий». – № 2023118642, заявл. 14.07.2023; опубликов. 18.09.2024. Бюл. № 26 [43].

Полученные результаты опубликованы в статье с соавторами:

Григоркевич, О.С. *Получение нового ингибитора матричных металлопротеиназ 2-го и 9-го типов 1-({4-[(2,4-дихлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-(2S,4R)-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 [20].*

Полученные результаты опубликованы в тезисах с соавторами:

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 [121].*

3.8. Выявление антигипоксической активности соединения АЛ-828

Известно, что гиперэкспрессия ММП-2 и ММП-9 с последующей активацией влияет на ремоделирование легочных артерий при патологии легочной артериальной гипертензии (ЛАГ) [157]. В основе патогенеза ЛАГ лежит патологическое увеличение давления в легочной артерии, приводящие к формированию правожелудочковой сердечной недостаточности [190]. Известно, что гипоксия играет достаточно важную роль в патогенезе развития ЛАГ [157]. 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 [157]. Авторы этого исследования показали, что селективный ингибитор ММП-2 /-9 ММИ-166 ослабляет повышение системного давления в правом желудочке сердца и препятствует утолщению стенки легочной артерии, что характерно для ЛАГ [157]. Поэтому в пилотных исследованиях была изучена антигипоксическая активность ингибитора ММП-2, соединения АЛ-828 на модели гипоксической гипоксии с гиперкапнией у мышей (таблица 17).

Диапазон исследуемых доз препарата осуществляли исходя из ранее полученных данных по нейропротекторной активности, где эффективная концентрация АЛ-828 равняется 10^{-8} М, что в пересчете активной дозы соединения для проведения экспериментов *in vivo* составляет 0,001 мг/кг, и 1/10 от значения ЛД₅₀, то есть 30 мг/кг.

В качестве препарата сравнения было выбрано ноотропное лекарственное средство – пирацетам в дозе 1000 мг/кг в/б [30].

Таблица 17 – Антигипоксическая активность АЛ-828 и пирацетама при однократном внутривенном введении на модели гипоксической гипоксии с гиперкапнией в опытах на мышах.

Группы n=10	Доза, мг/кг	Время жизни, мин		Активность в % от контроля
		контроль	вещество	
Пирацетам	1000	22,67±0,37	27,09±0,93 **	119
АЛ-828	0,001	22,67±0,37	23,30±0,79	103
	0,01	21,60±0,50	24,70±0,63 *	114
	0,1	21,60±0,50	22,90±0,79	106
	1	21,60±0,50	22,90±0,88	106
	5	26,45±1,66	27,50±1,22	104
	10	26,45±1,66	25,70±1,38	97
	30	26,45±1,66	27,60±1,11	104

Примечание: Различия достоверны по критерию Краскера-Уоллеса: * - с контролем при $p < 0,05$, ** - с контролем при $p < 0,01$. n – количество животных.

В результате эксперимента было показано, что соединение АЛ-828 в дозе 0,01 мг/кг, в/б ($p < 0,05$) в опытах на беспородных белых мышах обладает антигипоксическим действием, что выражается в способности вещества увеличивать продолжительность жизни животных в условиях нормобарической гипоксии с гиперкапнией.

Эффект соединения АЛ-828 по выраженности сравним с таковым пирацетама, но в дозе на пять порядков меньше.

Полученные результаты опубликованы в статье с соавторами:

Григоркевич, О.С. Антигипоксическая активность ингибитора матриксной 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. 27-2 [13].

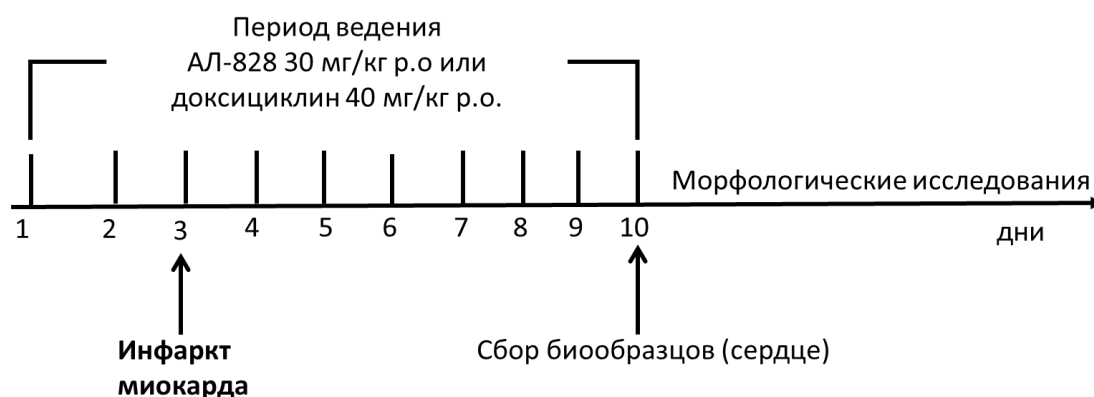
3.9. Кардиопротективный эффект АЛ-828 на модели экспериментального инфаркта миокарда¹

Активность ММП-2 и ММП-9 играет важную роль в нежелательных изменениях тканей сердечно-сосудистой системы, и от уровня их активности в ишемизированном миокарде во многом зависит прогноз раннего постинфарктного ремоделирования сердца [202]. Поэтому селективный ингибитор ММП-2, соединение АЛ-828 было отобрано для исследования кардиопротективной активности.

В качестве препарата сравнения – был выбран антибиотик тетрациклинового ряда доксициклин, который, помимо бактериостатического действия, ингибирует ММП-2 и ММП-9 и широко применяется в экспериментальных исследованиях в качестве их ингибитора [128].

Для доксициклина доза составила 40 мг/кг/сут. [33], при ЛД₅₀ 1,87 г/кг, *p.o.* [105]. Исходя из схожей по силе ингибирующей активности по отношению к ММП-2, $\sim 10^{-5}$ М для АЛ-828 и доксициклина, и схожих значениях ЛД₅₀ при *p.o.* введение, 1,87 г/кг для доксициклина и 2 г/кг для АЛ-828, доза для соединения-лидера составила 30 мг/кг/сут, *p.o.*

Изучение кардиопротективной активности соединения АЛ-828 проводили в эксперименте, воспроизводящем влияние курсовой терапии на размер экспериментального инфаркта миокарда. 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 в дозе 40 мг/кг/сут, *p.o.* Эксперимент проводили по схеме:



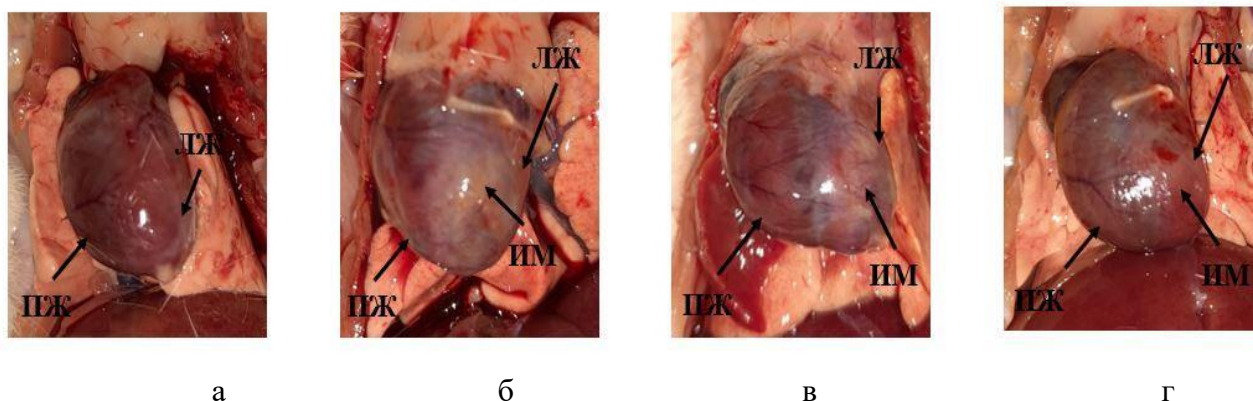
¹ Исследования по изучению кардиопротективного эффекта проводили совместно с лабораторией фармакологии кровообращения (заведующий лабораторией д.м.н. Крыжановским С.А.) ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» с в.н.с., д.б.н. Цориным И.Б., н.с., к.м.н. Барчуковым 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.

Патологоанатомическое вскрытие

В результате патологоанатомического вскрытия видно, что морфологическая картина сердец ложнооперированных животных (ЛО) соответствовала анатомической норме. Сердца были конусообразной формы, тёмно-красного цвета (рисунок 43а). Эпикард имел обычный вид. Полости сердца были не расширенными, запустевшими, предсердно-желудочковые отверстия проходимыми. Не было выявлено изменений консистенции сердечной мышцы. На разрезе визуальна толщина стенок левого желудочка (ЛЖ) и правого желудочка (ПЖ) была в пределах нормы. Как эндокард, так и миокард не имели особенностей. Венечные сосуды были умеренно кровенаполнены.

У крыс контрольной группы (крысы с острым инфарктом миокарда) форма сердца была близка к шаровидной и имела тёмно-красный цвет (рисунок 43б). Полости сердца были кровенаполнены и дилатированы, предсердно-желудочковые отверстия проходимы. На передней стенке ЛЖ, ниже места перевязки левой коронарной артерии визуализировалась зона некроза, имеющая неправильную форму и сероватый оттенок. Передняя стенка ЛЖ визуальна была истонченной, консистенция сердечной мышцы дрябловатой. В эндокарде ЛЖ выявлялись точечные кровоизлияния. Венечные сосуды были кровенаполнены.

У животных, получавших соединение АЛ-828 в дозе 30 мг/кг/сут, *p.o.* или эталонный препарат доксициклин в дозе 40 мг/кг/сут, *p.o.* с 1-го по 7-й день после воспроизведения инфаркта, форма сердец была ближе к конусообразной и имели тёмно-красного цвета (рисунок 43в-г). Полости сердца были кровенаполненными, незначительно дилатированными, предсердно-желудочковые отверстия проходимыми. Ниже места перевязки левой коронарной артерии на передней стенке ЛЖ визуализировалась зона некроза, имеющая неправильную форму и сероватый оттенок. Однако ее размеры были визуальна меньше, чем у контрольных животных (рисунок 43б). Истончение передней стенки ЛЖ было менее выражено, чем в контрольной группе. Сердечная мышца имела слегка дрябловатую консистенцию. В эндокарде ЛЖ выявлялись единичные точечные кровоизлияния. Венечные сосуды были умеренно кровенаполнены.



Примечание – а – сердце ложнооперированного животного; б – сердце контрольного животного с ИМ; в – сердце животного, получавшего соединение АЛ-828 (30 мг/кг/сут, *p.o.* с 1-го по 7-й день после воспроизведения ИМ; г – сердце животного, получавшего доксициклин (40 мг/кг/сут, *p.o.*) с 1-го по 7-й день после воспроизведения ИМ.

Рисунок 43 – Макропрепараты сердец крыс

Таким образом, согласно результатам патологоанатомического вскрытия, у животных контрольной группы диагностировался передний или переднебоковой трансмуральный ИМ, сопровождающийся истончением стенки ЛЖ сердца. У животных, получавших соединение АЛ-828 или эталонный препарат доксициклин, визуальное уменьшение площади ИМ, передняя стенка ЛЖ была сердца менее истонченной, миокард менее дряблым.

Морфометрическое измерение

Согласно результатам морфометрического исследования, размеры сердца ЛО крыс соответствуют физиологическим нормам. Площадь условно-интактного миокарда составляет $36,25 \pm 1,06 \text{ мм}^2$.

У животных контрольной группы на 7-е сутки после воспроизведения ИМ отмечается увеличение размеров ЛЖ сердца, что свидетельствует о том, что у них начинается постинфарктное ремоделирование сердца. Площадь условно-интактного миокарда составляет $21,01 \pm 1,31 \text{ мм}^2$. Площадь участка некроза контрольных животных в среднем составляет $8,16 \pm 0,55 \text{ мм}^2$.

Морфометрические измерения размеров сердца животных, которые в течение 7-и дней получали соединение АЛ-828, свидетельствуют о том, что препарат проявляет кардиопротекторную активность. У контрольных животных площадь участка некроза составляет $8,16 \pm 0,55 \text{ мм}^2$, тогда как у леченных животных этот показатель статистически значимо меньше – $3,84 \pm 0,44 \text{ мм}^2$ ($p < 0,0001$). Площадь условно-интактного миокарда ЛЖ сердца у крыс, получавших соединение АЛ-828, статистически значимо больше, чем в контрольной группе, соответственно $27,40 \pm 1,38 \text{ мм}^2$ ($p = 0,0041$) и $21,01 \pm 1,31 \text{ мм}^2$ (таблица 18).

Кардиопротекторная активность доксициклина была показана у крыс через 7 дней после воспроизведения ИМ. Размер некроза статистически значимо меньше, чем у контрольной группы

4,30±0,36 мм² (p<0,0001) и 8,16±0,55 мм² соответственно. Площадь условно-интактного миокарда ЛЖ сердца у крыс, получавших доксициклин, больше, чем в контрольной группе, 26,83±1,76 мм² (p=0,0062) и 21,01±1,31 мм² соответственно.

Таблица 18 – Влияние соединения АЛ-828 (30 мг/кг/сут, *p.o.* в течение 7 суток) и доксициклина (40 мг/кг/сут, *p.o.* в течение 7 суток) на размер некроза и площадь условно-интактного миокарда левого желудочка в условиях экспериментального инфаркта миокарда

Группа	Количество животных, n	Размер некроза, мм ²	Площадь условно-интактного миокарда, мм ²
Контроль (ложнооперированные крысы)	8	-	36,25±1,06
Активный контроль (инфаркт миокарда)	7	8,16±0,55	21,01±1,31
Доксициклин 40 мг/кг, <i>p.o.</i>	6	4,30±0,36 ****	26,83±1,76 **
АЛ-828 30 мг/кг, <i>p.o.</i>	6	3,84±0,44 ****	27,40±1,38 **

Примечание – ** - p < 0,01; **** - p < 0,0001. Однофакторный дисперсионный анализ с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Даннелу; Представлены средние арифметические и их стандартные ошибки; p указано по отношению к активному контролю с инфарктом миокарда.

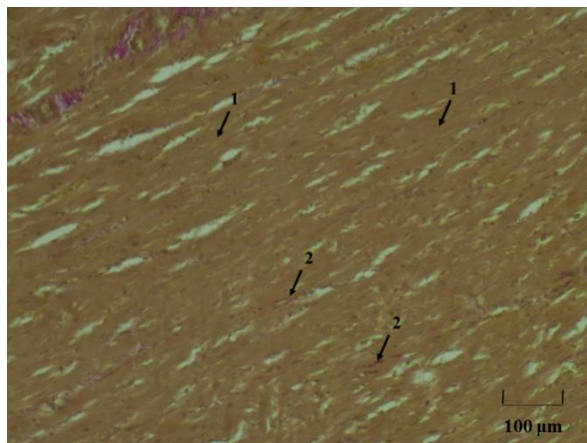
Таким образом, результаты морфометрических измерений свидетельствуют о том, что систематическая терапия соединением АЛ-828, в течении 3-х дней, предшествующих ИМ, и в течение 7 суток после воспроизведения ИМ, способствует не только статистически значимому уменьшению размера некроза и увеличению площади условно-интактного миокарда, но и в определенной мере препятствует развитию раннего постинфарктного ремоделирования ЛЖ сердца. Данные, полученные в настоящей серии экспериментов, позволяют говорить о том, что соединению АЛ-828 присуще кардиопротективное действие.

Микроскопическое исследование

Показано, что гистоархитектоника сердец крыс ЛО группы соответствует норме. Миокард представлен поперечнополосатыми клетками сердечной мышцы (кардиомиоцитами), расположенными послойно. Между отдельными группами кардиомиоцитов (КМ) обнаруживаются небольшие кровоизлияния. В КМ выявляется отчетливо выраженная поперечная исчерченность. КМ имеют характерную форму и величину. Ядра КМ хорошо различимы, имеют характерную величину. Местами обнаруживаются гипертрофированные ядра КМ с распыленным хроматином. Рыхлая соединительная ткань и кровеносные сосуды встречаются между мышечными элементами миокарда. Сосуды миокарда полнокровны (рисунок 44).

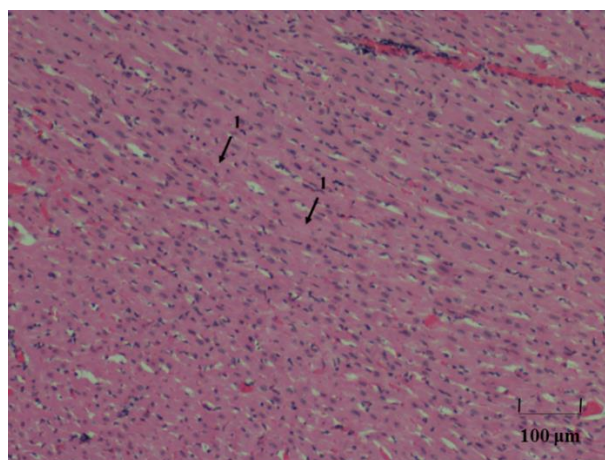
На препаратах, окрашенных пикрофуксином по Ван-Гизону (рисунок 44), визуализируется миокард желтого цвета. Между мышечными волокнами встречаются прослойки соединительной ткани малинового цвета. На препаратах также видна соединительная ткань стенок артерий и артериол.

Таким образом, микроскопическая картина миокарда ЛО животных соответствует норме.



Примечание – 1- кардиомиоциты; 2 – прослойка соединительной ткани

Рисунок 44 – Микрофотография миокарда левого желудочка (ЛЖ) ложнооперированной (ЛО) крысы №5. Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону. Увеличение x 100

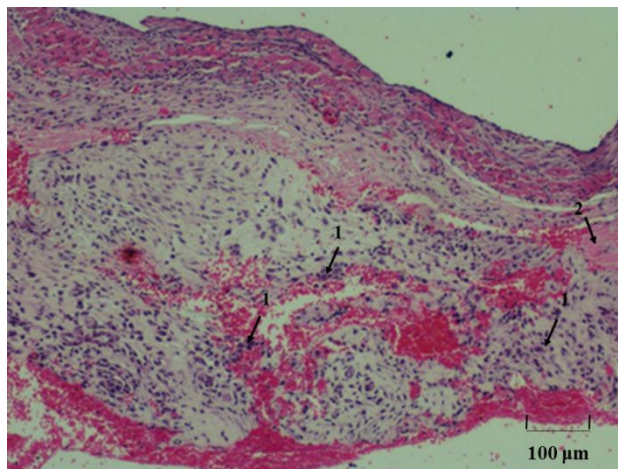


Примечание – 1 – неизмененные кардиомиоциты

Рисунок 45– Микрофотография миокарда левого желудочка (ЛЖ) ложнооперированной (ЛО) крысы №5. Окраска галлоцианин-эозином. Увеличение x 100

При исследовании микропрепаратов сердец крыс контрольной группы с ИМ в очаге некроза встречается реактивное воспаление с инфильтрацией полиморфноядерными лейкоцитами. Между КМ обнаруживаются кровоизлияния. Сосуды расширены, полнокровны, стенки сосудов истончены. Некротизированные КМ набухшие, бесструктурные, поперечная исчерченность отсутствует, есть наличие плазмокоагуляции (рисунок 46, 48). Ядра КМ подвержены кариолизису. При окраске по Ван-Гизону визуализируется большое количество волокон соединительной ткани, окрашенных в малиновый цвет (рисунок 47, 49).

В периинфарктной зоне миокарда (рисунок 50, 51) обнаруживаются кровоизлияния между отдельными группами КМ. Ядра КМ хорошо различимы. Выражена волнообразная деформация клеток сердечной мышцы.



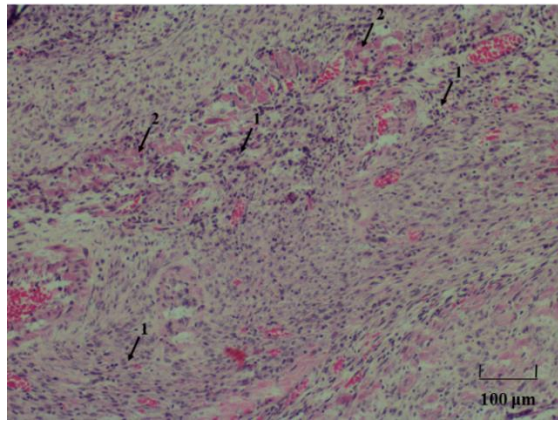
Примечание – 1 – воспалительная инфильтрация полиморфноядерными лейкоцитами; 2 – участки с исчезновением поперечной исчерченности кардиомиоцитов

Рисунок 46 – Микрофотография зоны некроза сердечной мышцы крысы №3 контрольной группы с инфарктом миокарда (ИМ). Окраска галлоцианин-эозином. Увеличение x 100.



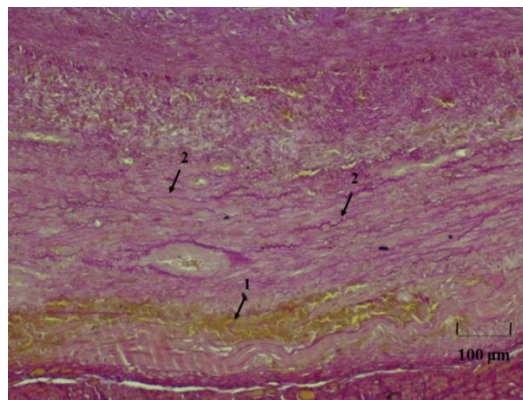
Примечание – 1- мышечная ткань; 2 – соединительная ткань

Рисунок 47 – Микрофотография зоны некроза сердечной мышцы крысы №2 контрольной группы с инфарктом миокарда (ИМ). Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону. Увеличение x 40



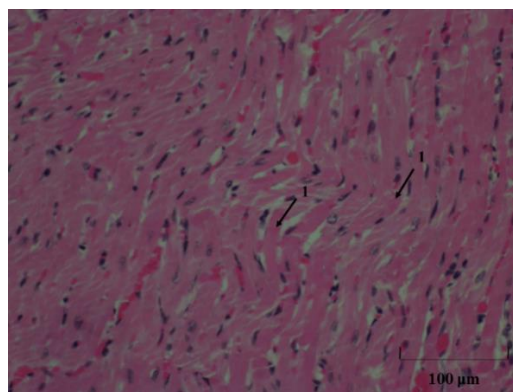
Примечание – 1 – воспалительная инфильтрация полиморфноядерными лейкоцитами; 2 – участки с исчезновением поперечной исчерченности кардиомиоцитов

Рисунок 48 – Микрофотография зоны некроза сердечной мышцы крысы №8 контрольной группы с инфарктом миокарда (ИМ). Окраска галлоцианин-эозином. Увеличение x 100



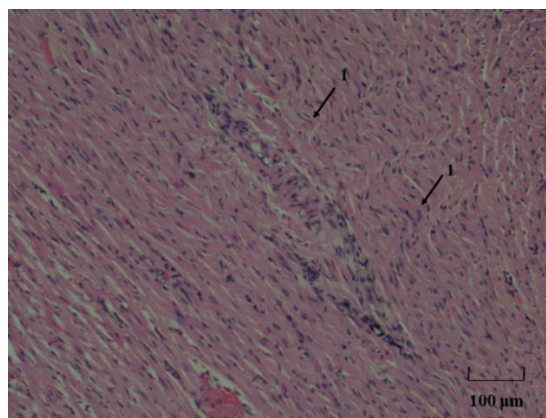
Примечание – 1- скопление эритроцитов; 2 – соединительная ткань

Рисунок 49 – Микрофотография зоны некроза сердечной мышцы крысы №2 контрольной группы с инфарктом миокарда (ИМ). Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону. Увеличение x 100



Примечание – 1 – участки с волнообразной деформацией клеток сердечной мышцы

Рисунок 50 – Микрофотография периинфарктной зоны сердечной мышцы крысы №8 контрольной группы с инфарктом миокарда (ИМ). Окраска галлоцианин-эозином. Увеличение x 200

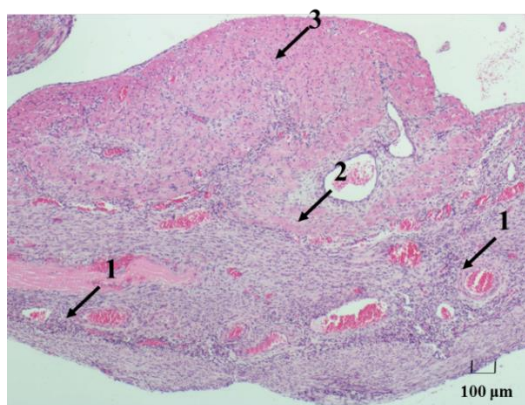


Примечание – 1 – участки с волнообразной деформацией клеток сердечной мышцы

Рисунок 51 – Микрофотография периинфарктной зоны сердечной мышцы крысы №9 контрольной группы с инфарктом миокарда (ИМ). Окраска галлоцианин-эозином. Увеличение $\times 100$

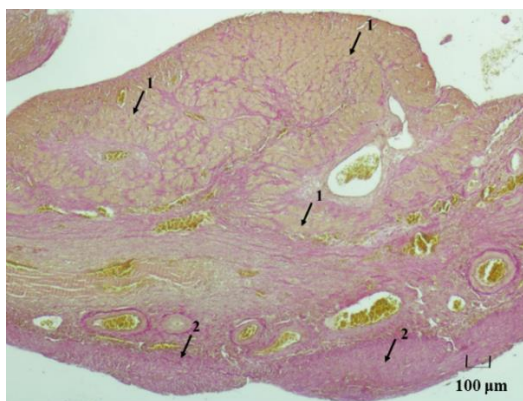
У животных, получавших соединение АЛ-828 в дозе 30 мг/кг/сут, интрагастрально (*per os*, *p.o.*) в течение 3-х дней, предшествующих ИМ, и в течение 7 суток после воспроизведения ИМ, в очаге некроза менее выражена воспалительная инфильтрация, чем у крыс контрольной группы. При окраске по Ван-Гизону встречается большее количество клеток сердечной мышцы, окрашенных в желтый цвет, а также меньшее количество волокон соединительной ткани, окрашенных в малиновый цвет, по сравнению с контролем (рисунок 52-54).

В периинфарктной зоне миокарда у крыс, получавших соединение АЛ-828 в дозе 30 мг/кг/сут *p.o.*, между отдельными группами КМ обнаруживаются кровоизлияния (рисунок 55). Выражена волнообразная деформация клеток сердечной мышцы. Ядра КМ хорошо различимы.



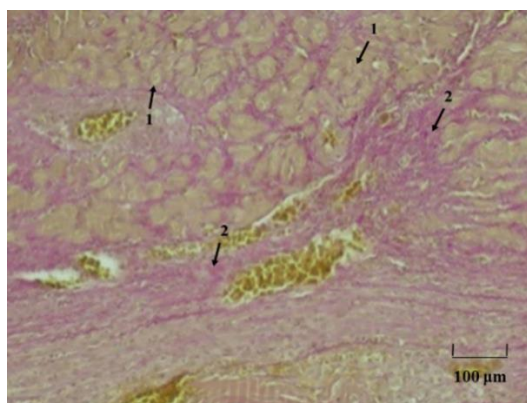
Примечание – 1 – инфильтрация полиморфноядерными лейкоцитами; 2 – участки с исчезновением поперечной исчерченности кардиомиоцитов; 3 – сохраненные кардиомиоциты

Рисунок 52 – Микрофотография зоны некроза сердечной мышцы крысы №1 с инфарктом миокарда (ИМ), получавшей соединение АЛ-828 (30 мг/кг/сут. *p.o.* в течение 7 суток). Окраска галлоцианин-эозином. Увеличение $\times 40$.



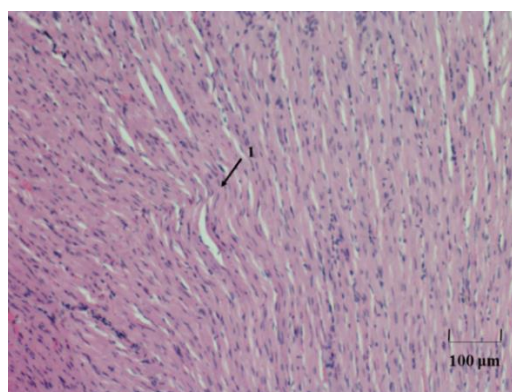
Примечание – 1- мышечная ткань; 2 – соединительная ткань

Рисунок 53 – Микрофотография зоны некроза сердечной мышцы крысы №1 с инфарктом миокарда (ИМ), получавшей соединение АЛ-828 (30 мг/кг/сут. *p.o.* в течение 7 суток). Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону. Увеличение $\times 40$.



Примечание – 1- мышечная ткань; 2 – соединительная ткань

Рисунок 54 – Микрофотография зоны некроза сердечной мышцы крысы №1 с инфарктом миокарда (ИМ), получавшей соединение АЛ-828 (30 мг/кг/сут. *p.o.* в течение 7 суток). Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону. Увеличение $\times 100$.

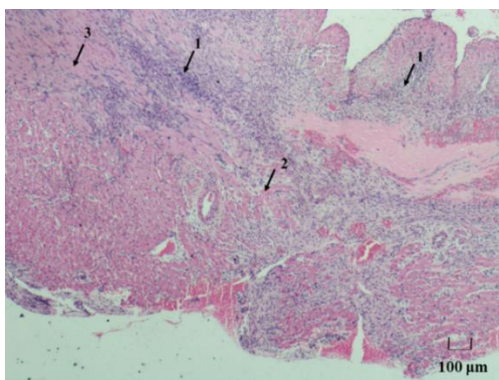


Примечание – 1 – участки с волнообразной деформацией клеток сердечной мышцы

Рисунок 55 – Микрофотография периинфарктной зоны сердечной мышцы крысы №5 с инфарктом миокарда (ИМ), получавшей соединение АЛ-828 (30 мг/кг/сут. *p.o.* в течение 7 суток). Окраска галлоцианин-эозином. Увеличение $\times 100$.

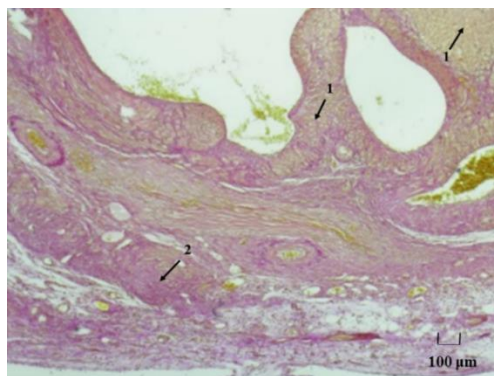
У животных, получавших доксициклин в дозе 40 мг/кг/сут *p.o.*, в течении 3-х дней, предшествующих ИМ, и в течение 7 суток после воспроизведения ИМ на поперечном срединном срезе миокарда ЛЖ сердца определяются очаг некроза, а также перинфарктная зона и зона условно интактного миокарда, как и в контрольной группе. Истончение передней стенки ЛЖ и дилатация его полости визуальны менее выражены, чем у крыс контрольной группы. Дилатация полости ЛЖ и истончение его передней стенки были менее выражены, чем в контроле, что подтверждается проведенными выше морфометрическими измерениями (рисунок 56-57).

В перинфарктной зоне миокарда изредка обнаруживаются кровоизлияния между отдельными группами КМ. Выражены фрагментация клеток и волнообразная деформация сердечной мышцы. Большинство миофибрилл в перинфарктной зоне имеют выраженную поперечную исчерченность, в отличие от контрольной группы. Хорошо различимы неизмененные ядра КМ, имеющие характерную величину (рисунок 58-59).



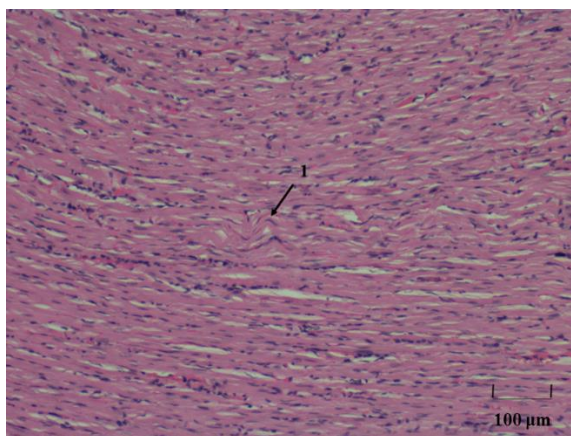
Примечание – 1 – воспалительная инфильтрация полиморфноядерными лейкоцитами; 2 – участки с исчезновением поперечной исчерченности кардиомиоцитов; 3 – сохраненные кардиомиоциты

Рисунок 56 – Микрофотография зоны некроза сердечной мышцы крысы №4 с инфарктом миокарда (ИМ), получавшей доксициклин (40 мг/кг/сут. *p.o.* в течение 7 суток). Окраска галлоцианин-эозином. Увеличение x 40



Примечание – 1- мышечная ткань; 2 – соединительная ткань

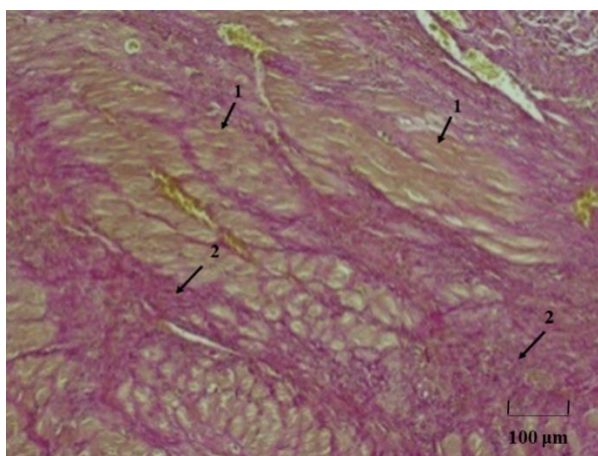
Рисунок 57 – Микрофотография зоны некроза сердечной мышцы крысы №3 с инфарктом миокарда (ИМ), получавшей доксициклин (40 мг/кг/сут. *p.o.* в течение 7 суток). Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону. Увеличение x 40



Примечание – 1 – участки с волнообразной деформацией клеток сердечной мышцы

Рисунок 58 – Микрофотография периинфарктной зоны сердечной мышцы крысы №5 с инфарктом миокарда (ИМ), получавшей доксициклин (40 мг/кг/сут. *p.o.* в течение 7 суток).

Окраска галлоцианин-эозином. Увеличение x 100



Примечание – 1- мышечная ткань; 2 – соединительная ткань

Рисунок 59 – Микрофотография зоны некроза сердечной мышцы крысы №1 с инфарктом миокарда (ИМ), получавшей доксициклин (40 мг/кг/сут. *p.o.* в течение 7 суток). Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону. Увеличение x 100

Таким образом, согласно результатам гистологических исследований соединение АЛ-828 в дозе 30 мг/кг/сут, интрагастрально в течение 7 суток после ИМ, проявляет кардиопротективную активность:

- Дилатация полости ЛЖ и истончение его передней стенки у крыс, получавших соединение АЛ-828, визуально были менее выражены, чем в контроле;
- Менее выражена воспалительная инфильтрация, чем у крыс контрольной группы.

Полученные результаты опубликованы в тезисах с соавторами:

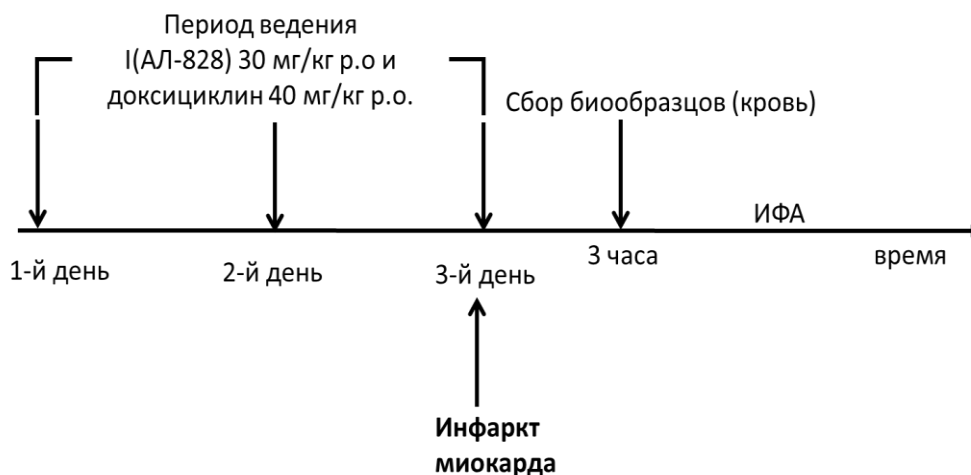
1. Мирошкина, И.А. К механизму действия селективного ингибитора матриксной металлопротеиназы 2 типа 1-({4-[4-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил- L-пролина [Текст] / И.А. Мирошкина, О.С. Григоркевич, И.Б. Цорин, А.В. Сорокина, Г.В. Мокров, С.А. Крыжановский

// 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 [37]

2. Григоркевич, О.С. Дизайн, синтез и изучение кардиопротективной активности оригинального ингибитора матричной 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 [16].

3.10. Выявление влияния соединения АЛ-828 на содержание ММП-2 и ММП-9 в плазме крови крыс с острым инфарктом миокарда¹

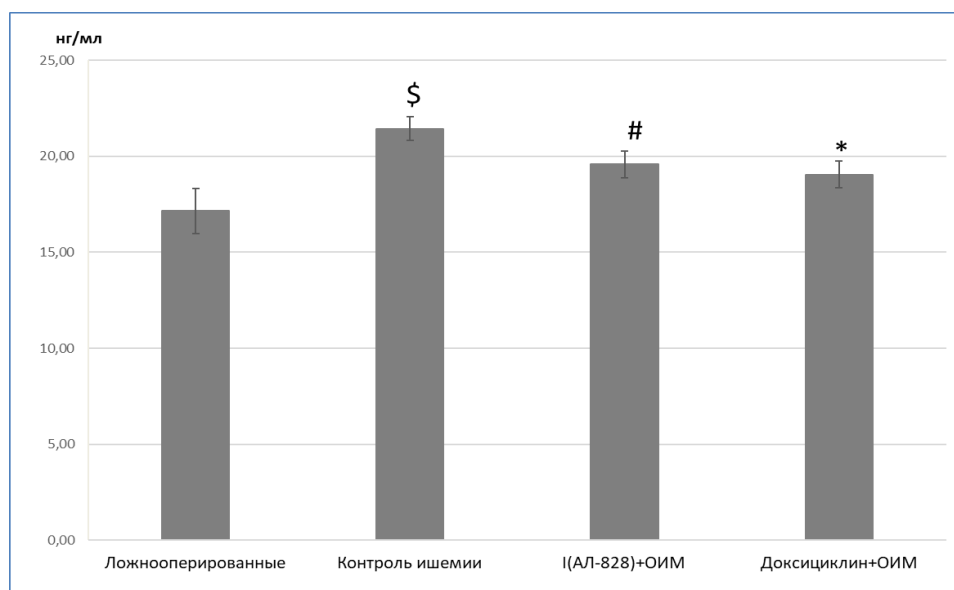
Поскольку увеличение активности ММП-2/-9 в миокарде при остром инфаркте миокарда (ОИМ) приводит к разрушению матрикса и выбросу ММП-2/-9 в кровь, для определения фармакологической активности синтезированных соединений определялось изменение содержания ММП-2 и ММП-9 в плазме крови крыс с ОИМ, вызванным перевязкой левой коронарной артерии. Соединения вводились 3 дня до ОИМ в дозе 30 мг/кг/сут, *р.о.* Доксидиклин вводили в дозе 40 мг/кг/сут, *р.о.* Опыт проводили по следующей схеме:



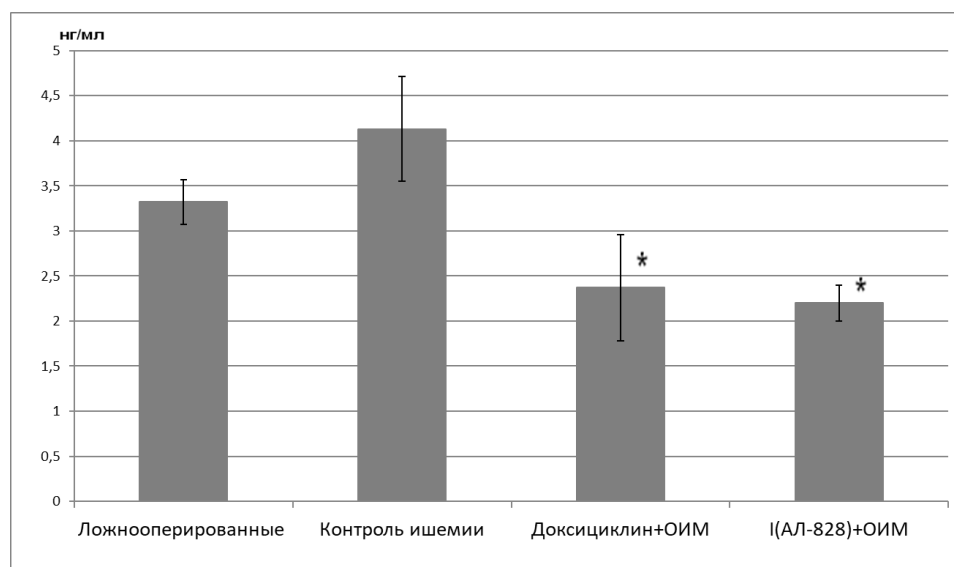
Показано, что у животных, получавших соединение АЛ-828 в дозе 30 мг/кг/сут, уровень ММП-2 в плазме крови по сравнению с контролем ниже на 9% – соответственно $19,58 \pm 0,69$ нг/мл

¹ 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., с.н.с., к.м.н. Столяруком В.Н., н.с., к.м.н. Барчуковым В.В.

и $21,44 \pm 0,61$ нг/мл (рисунок 60а). Хотя эти различия статистически не значимы ($p = 0,08$), нельзя исключить, что при повышении дозы этого соединения эффект будет достоверным. Соединение АЛ-828 в той же дозе достоверно уменьшал содержание ММП-9 на 47% по сравнению с контролем $2,2 \pm 0,34$ нг/мл и $4,13 \pm 0,59$ нг/мл (рисунок 60б). Таким образом было показано, что соединение АЛ-828 обладает способностью уменьшать содержание как ММП-2, так и ММП-9 в плазме крови крыс с ОИМ и по своей активности не уступает препарату сравнения – доксициклину.



а



б

Примечание – # $p=0,08$; * $p<0,05$; по отношению к ишемизированному контролю (критерий Ньюмена-Кейлса); \$ $p<0,001$ по отношению к ложнооперированному контролю (критерий Ньюмена-Кейлса). ОИМ – острый инфаркт миокарда; АЛ-828 (30 мг/кг/сут)+ОИМ – АЛ-828 (30 мг/кг/сут)+острый инфаркт миокарда; доксициклин (40 мг/кг/сут)+ОИМ – доксициклин (40 мг/кг/сут)+острый инфаркт миокарда. По оси ординат – содержание ММП-2 или ММП-9.

Рисунок 60 – Влияние соединения АЛ-828 на содержание ММП-2 (а) и ММП-9 (б) в плазме крови крыс с острым инфарктом миокарда.

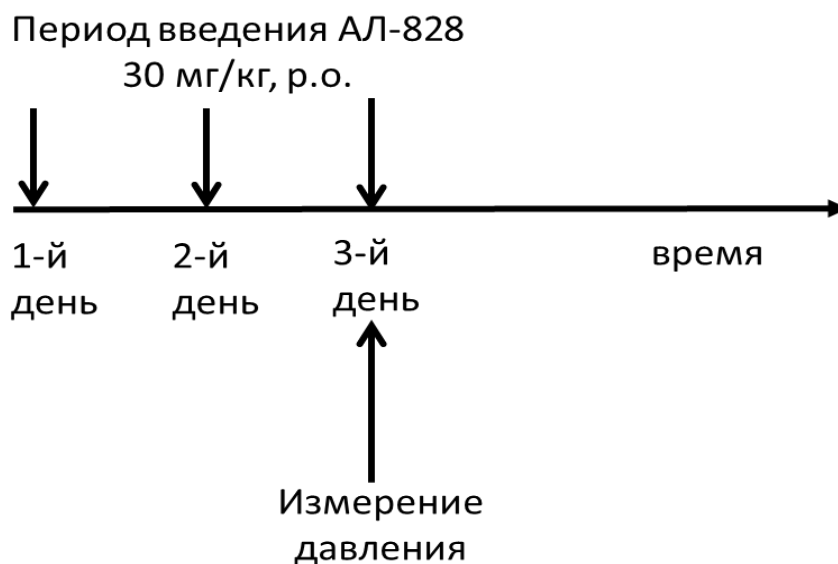
Полученные результаты опубликованы в статьях с соавторами:

1. Григоркевич, О.С. Дизайн, синтез и фармакологическая активность нового ингибитора матриксной металлопротеиназы-9 [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, А.Д. Дурнев // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2018. – Т. 52, № 1. – С. 8-14 [17].

2. Григоркевич, О.С. Поиск селективных ингибиторов матриксной металлопротеиназы 2-го типа в ряду производных бензоиламино(фенилсульфонил)-замещенных 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 [19].

3.11. Влияние соединения АЛ-828 на артериальное и венозное давление¹

Для соединения АЛ-828 был проведен эксперимент по изучению его влияния на артериальное и венозное давление (таблица 19). Соединения вводились 3 дня до проведения эксперимента. Опыт проводили по следующей схеме:



¹ 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.

Таблица 19 – Влияние соединения АЛ-828 (30 мг/кг/сут, 3 дня, *р.о.*) и доксициклина (40 мг/кг/сут, 3 дня, *р.о.*) на периферическую гемодинамику

Соединение	АДс, мм.рт. ст	АДд, мм.рт. ст	АДср, мм.рт. ст	АДну л, мм.рт. ст	Длитель ность цикла, сек	ЧСС, уд/ми н	Время дости жения макси мума (пик), сек	ЦВД, мм.рт. ст.
Контроль	116,8± 8,7	66,1± 5,6	83,1± 5,6	50,8± 4,7	0,153± 0,008	398± 21	0,021± 0,002	1,9± 0,2
АЛ-828	108,5± 6,4	64,6± 4,6	80,1± 4,7	43,9± 2,7	0,151± 0,009	410± 23	0,022± 0,003	1,8± 0,1
Доксициклин	108,5± 5,0	62,6± 3,4	78,9± 3,9	45,9± 2,6	0,157± 0,008	389± 20	0,021± 0,002	2,4± 0,2

Примечание: 1. Однофакторный дисперсионный анализ с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Даннету

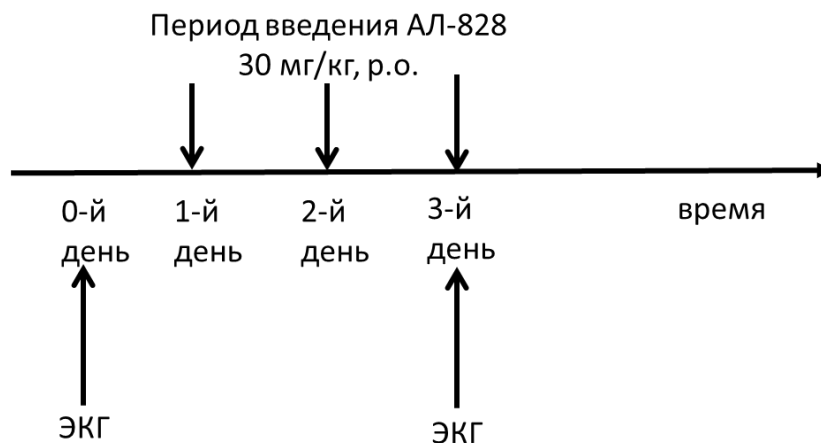
2. Представлены средние арифметические и стандартные ошибки среднего

Как следует из полученных данных, соединение АЛ-828 у интактных животных не оказывает существенного влияния на величину артериального и венозного давления.

3.12. Влияние соединения АЛ-828 на структуру электрокардиографии¹

Изучено влияние соединения АЛ-828 и доксициклина на структуру электрокардиографии (ЭКГ) (таблица 20). Опыт проводили по следующей схеме:

¹ 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.



Соединение АЛ-828 спустя 3 дня ведения *p.o.* способствовало уменьшению RR (частота сердечных сокращений, ЧСС), по отношению к контролю на 3 день. Доксциклин достоверно не изменяет ЧСС относительно контроля. Остальные значения не отличаются относительно контроля как для АЛ-828, так и для доксицилина.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что соединение АЛ-828 у интактных животных не оказывает существенного влияния на структуру ЭКГ.

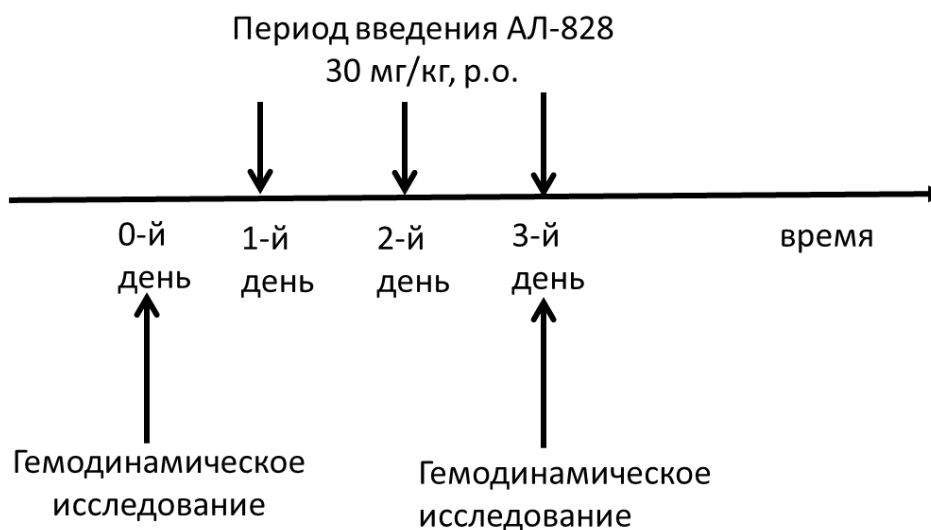
Таблица 20 – Влияние соединения АЛ-828 (30 мг/кг/сут, 3 дня, *p.o.*) и доксициклина (40 мг/кг/сут, 3 дня, *p.o.*) на структуру ЭКГ

Соединение	RR исх, с	RR 3 дня, с	PQ исх, с	PQ 3 дня, с	QRS исх, с	QRS 3 дня, с	QT исх, с	QT 3 дня, с	QTc исх, с	QTc 3 дня, с
Контроль	0,133 0,129÷ 0,144	0,159* 0,156÷ 0,205	0,052 0,051÷ 0,054	0,057 0,055÷ 0,062	0,022 0,022÷ 0,024	0,025 0,019÷ 0,036	0,077 0,068÷ 0,081	0,079 0,074÷ 0,104	0,208 0,190÷ 0,213	0,201 0,163÷ 0,262
АЛ-828	0,141 0,134÷ 0,160	0,137# 0,135÷ 0,143	0,058 0,054÷ 0,063	0,054 0,051÷ 0,055	0,023 0,023÷ 0,024	0,023 0,022÷ 0,024	0,072 0,071÷ 0,075	0,080 0,078÷ 0,082	0,194 0,187÷ 0,202	0,210 0,210÷ 0,218
Доксициклин	0,158 0,154÷ 0,166	0,149 0,147÷ 0,154	0,054 0,053÷ 0,055	0,053 0,052÷ 0,054	0,022 0,022÷ 0,027	0,023 0,022÷ 0,024	0,080 0,071÷ 0,085	0,075 0,073÷ 0,077	0,200 0,187÷ 0,210	0,192 0,185÷ 0,209

Примечание: 1. Представлены медианы и нижние и верхние квартили\$ 2. # $p \leq 0,05$ по отношению к контролю; * $p \leq 0,01$ по отношению к исходному контролю

3.13. Влияние соединения АЛ-828 на вариабельность ритма сердца¹

Изучение влияния на вариабельность ритма сердца изучали до введения исследуемых соединений и через 3 дня после (таблица 21). Опыт проводили по следующей схеме:



Исследование показало, что доксициклин и АЛ-828 не влияют на вариабельность ритма сердца.

Таким образом для ингибитора ММП-2, соединения АЛ-828, на модели острого инфаркта миокарда было выявлено и изучено кардиопротективное действие.

¹ 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.

Таблица 21 – Влияние соединения АЛ-828 (30 мг/кг/сут, 3 дня, *p.o.*) и доксициклина (40 мг/кг/сут, 3 дня, *p.o.*) на вариабельность сердечного ритма

Соединение	VLF исх, мс ²	VLF 3 дня, мс ²	LF исх, мс ²	LF 3 дня, мс ²	HF исх, мс ²	HF 3 дня, мс ²	LF/HF исх	LF/HF 3 дня	RRNN исх, мс	RRNN 3 дня, мс	SDNN исх, мс	SDNN 3 дня, мс	RMSSD исх, мс	RMSS D 3 дня, мс	CV %, исх	CV %, 3 дня
Контроль	54,7 21,9 ÷ 126	83,8 1,65 ÷ 164	7,6 4,5÷ 11,3	6,3 1,9÷ 13,9	5,8 1,9÷ 13,8	5,9 1,5÷ 42,2	2,1 0,2÷ 4,8	0,4 0,3÷1,3	129,5 125÷ 134	158 157÷ 209	2,5 2÷ 6	4,5 1÷ 6	1,5 1÷ 2	1 1÷ 5	2,2 1,5÷ 4,1	2,5 0,6÷ 3,6
АЛ-828	23,6 10,3 ÷ 48,4	18,4 12,6 ÷24, 8	2,2 1,4÷ 5,3	2,6 1,0÷ 3,8	6,9 4,6÷ 36,6	10,3 0,7÷ 59,1	0,4 0,1÷ 0,7	0,6 0,1÷ 1,9	138 131÷ 157	137,5 131÷ 144	2,5 2÷ 4	2,5 2÷ 5	1 1÷ 2	1,5 1÷ 7	2,0 1,2÷ 2,8	1,6 1,2÷ 3,3
Доксициклин	313, 5 118 ÷ 511	87,4 14,6 ÷ 123	28,4 5 18,5 ÷ 41,5	6,9 3÷ 21,7	12,2 4,3÷ 29,5	6,9 2,5÷ 9,5	2,7 0,6÷ 4,9	1,1 0,6÷ 4,1	163 143÷17 1	150 139÷ 159	7,5 5÷ 12	3,5 2÷ 6	1,5 1÷ 3	1 1÷ 2	4,9 2,9÷ 6,3	2,7 1,2÷ 3,7

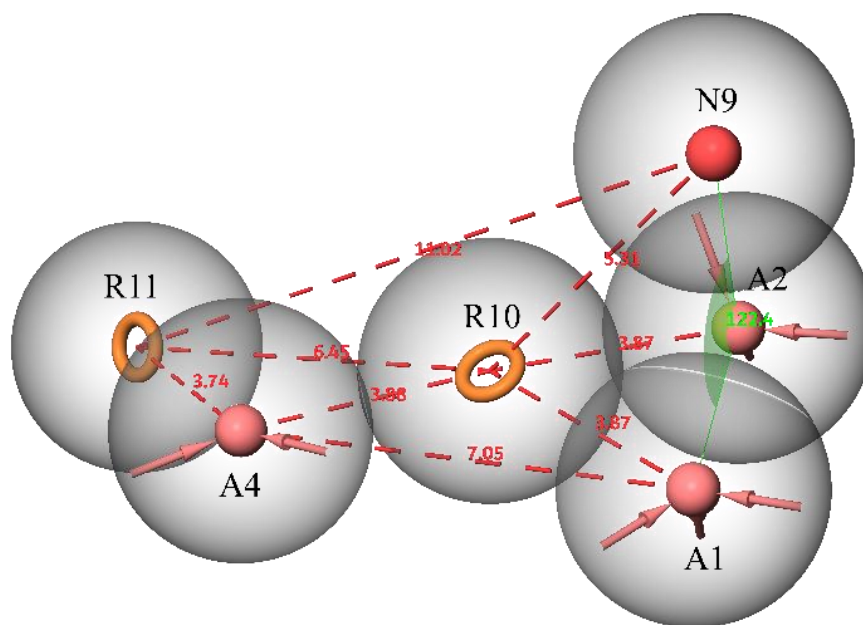
Примечание: Представлены медианы и нижние и верхние квартили.

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 61).



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 61 – 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 острой фазе 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 рекомбинантных ММП-2 и ММП-9 человека и флуорогенного субстрата Mca-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂ для соединений АЛ-828 ($K_{i\text{ММП-2}} 4,5 \times 10^{-5} \text{M}$) и МЛ-269 ($K_{i\text{ММП-2}} 8,25 \times 10^{-5} \text{M}$) определены константы ингибирования по отношению к ММП-2. Для соединения ГГМ-27 была выявлена ингибирующая активность как по отношению к ММП-2 ($K_{i\text{ММП-2}} 9,4 \times 10^{-5} \text{M}$), так и к ММП-9 ($K_{i\text{ММП-9}} 9 \times 10^{-4} \text{M}$).
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 Са755 у самок мышей линии С57BL/6. Оба соединения являются малотоксичными: $\text{ЛД}_{50}(\text{АЛ-828}) = 399 \text{ мг/кг в/б}$, $\text{ЛД}_{50}(\text{АЛ-828}) > 2000 \text{ мг/кг р.о.}$; $\text{ЛД}_{50}(\text{ГГМ-27}) = 1173 \text{ мг/кг в/б (самцы)}$ и $1125 \text{ мг/кг в/б (самки)}$.
6. Для соединения АЛ-828 при субхроническом введении в дозе 30 мг/кг/сут, *р.о.* 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.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Выражаю благодарность и признательность моему научному руководителю д.б.н., профессору, члену-корреспонденту РАН Гудашевой Т.А. за чуткое руководство работой и активную помощь на всех этапах исследований, анализа результатов, и написания диссертации.

Благодарю и.о. генерального директора нашего Центра, профессора, д.фарм.н. Дорофеева В.Л. за предоставленную возможность работать по такой перспективной и интересной теме.

За совместное исследование противоопухолевой активности рук. отдела, академику РАН Дурневу А.Д., в.н.с., д.б.н. Коваленко Л.П., Журикову Р.В.

За совместные исследования кардиопротективной активности зав. лабораторией, д.м.н. Крыжановскому С.А., в.н.с., д.б.н. Цорину И.Б., с.н.с., к.м.н. Столяруку В.Н., н.с., к.м.н. Барчукову В.В., а также сотрудникам отдела лекарственной токсикологии в.н.с., к.б.н. Сорокиной А.В. и с.н.с., к.б.н. Мирошкиной И.А.

За совместные исследование нейропротекторной активности в.н.с., к.б.н. Антиповой Т.А., н.с. Николаеву С.В.

За совместные исследования ингибиторной активности в.н.с., к.б.н. Зайнуллиной Л.Ф.

За моральную поддержку сотрудникам отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. База знаний по биологии человека: сайт. – URL: <https://humbio.ru/humbio/02022001/mmp/00003e19.htm> (дата обращения: 17.07.2025).
2. Беккер, Г. Органикум: Практикум по органической химии [Текст] / Г. Беккер, В. Бергер, Г. Домшке. // - М.: МИР. –1979. – С. 176.
3. Воронина, Т.А. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с ноотропным типом действия [Текст] / Т.А. Воронина, Р.У. Островская, Т.Л. Гарибова // В кн. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под общ. ред. А.Н. Миронова. Часть 1, М.: Гриф и К. – 2012. – С. 276-296.
4. Всемирная организация здравоохранения: сайт. – URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (дата обращения: 25.03.2025).
5. Всемирная организация здравоохранения: сайт. – URL: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1 (дата обращения: 28.03.2025).
6. Всемирная организация здравоохранения: сайт. – URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (дата обращения: 27.03.2025).
7. Ганусевич, И.И. Роль матриксных металлопротеиназ (ММП) при злокачественных новообразованиях. I. Характеристика ММП, регуляция их активности, прогностическое значение [Текст] / И.И. Ганусевич // Онкология. – 2010. – Т 12. – № 1. – С. 10-16.
8. Гасанов, А.Г. Роль изменений внеклеточного матрикса при возникновении сердечно-сосудистых заболеваний [Текст] / А.Г. Гасанов, Т.В. Бершова // Биомедицинская химия. – 2009. – Т. 55. – № 2. – С 155-168.
9. Герштейн, Е.С. Матриксные металлопротеиназы и их тканевые ингибиторы в клиническом течении и прогнозе рака яичников [Текст] / Е.С. Герштейн, Д.Н. Кушлинский, Л.В. Адамян, И.В. Терешкина, К.П. Лактионов // Молекулярная медицина. – 2013. – №6. – С. 11-20.
10. Герштейн, Е.С. Матриксные металлопротеиназы-2, 7, 8, 9 и их тканевой ингибитор 1-го типа в сыворотке крови больных раком почки: клинико-морфологические корреляции [Текст] / Е.С. Герштейн, В.В. Муштенко, Е.А. Короткова, С.Д. Бежанова, А.А. Морозов, А.А. Алферов, И.А. Казанцева, Н.Е. Кушлинский // Альманах клинической медицины. – 2017. – Т. 45. – № 2. – С. 94–101.
11. Гордон, А. Спутник химика. Физико-химические свойства, методики, библиография [Текст] / А. Гордон, Р. Форд // - М.: Мир. – 1976. – С. 542.

12. ГОСТ 32644-2014. Межгосударственный стандарт. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Острая пероральная токсичность - метод определения класса острой токсичности (Переиздание) [Электронный ресурс]. – Электронный текст документа подготовлен АО "Кодекс" и сверен по: официальное издание – М.: Стандартинформ, 2019. – 17 с.

13. Григоркевич, О.С. Антигипоксическая активность ингибитора матриксной 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.

14. Григоркевич, О.С. Антиметастатическая активность ингибитора матриксной 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.

15. 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.

16. 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.

17. Григоркевич, О.С. Дизайн, синтез и фармакологическая активность нового ингибитора матриксной металлопротеиназы-9 [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, А.Д. Дурнев // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52. – № 1. – С. 8-14.

18. Григоркевич, О.С. Матриксные металлопротеиназы и их ингибиторы [Текст] / О.С. Григоркевич, Г.В. Мокров, Л.Ю. Косова // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2019. – №2. – С. 3-16

19. Григоркевич, О.С. Поиск селективных ингибиторов матриксной металлопротеиназы 2-го типа в ряду производных бензоиламино(фенилсульфонил)-замещенных 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.

20. Григоркевич, О.С. Получение нового ингибитора матриксных металлопротеиназ 2-го и 9-го типов 1-({4-[(2,4-дихлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-(2S,4R)-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

21. Гуторов, С.Л. Роль гемцитабина (гемзара) в терапии неоперабельного немелкоклеточного рака легкого [Текст] / С.Л. Гуторов, Н.Н. Семенов, М.Р. Личиницер // Вестник РОНЦ им Н.Н. Блохина РАМН. – 1999. – Т. 10. – № 2. – С. 37-41.

22. Давыдов, Б.Н. Анализ профиля системы матриксных металлопротеиназ и их эндогенных ингибиторов у детей с заболеваниями пародонта и различными диспластическими фенотипами [Текст] / Б.Н. Давыдов, Д.А. Доменюк, Т.С. Кочконян // Пародонтология. – 2023. – Т. 28. – № 4. – С. 323-335.

23. Егорова, Е.Н. Маркеры системного воспаления и компоненты системы матриксных металлопротеиназ – тканевых ингибиторов металлопротеиназ при различных стадиях хронической сердечной недостаточности [Текст] / Е.Н. Егорова, М.А. Кузьмина, В.В. Мазур, М.Н. Калинин, Е.С. Мазур // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14. – № 1-2. – С. 139-142.

24. Жигулина, В.В. Матриксные металлопротеиназы при пародонтите [Текст] / В.В. Жигулина, В.А. Румянцев // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Химия. – 2016. – № 3. – С. 134–144.

25. Зубова, А.В. Активность матриксных металлопротеиназ и концентрация их тканевых ингибиторов в сыворотке крови больных сахарным диабетом 2 типа в зависимости от стадии компенсации заболевания [Текст] / А.В. Зубова, А.Р. Колпаков, Г.С. Русских, О.Н. Потеряева // Сибирский научный медицинский журнал. – 2021. – Т. 41. – № 6. – С. 61-67.

26. Зуева, Е.П. Методические указания по доклиническому изучению средств, обладающих способностью ингибировать процесс метастазирования и повышать эффективность цитостатической терапии злокачественных опухолей [Текст] / Е.П. Зуева, А.М. Козлов, Г.К. Герасимова, Е.Н. Амосова, Т.Г. Разина, В.Е. Гольдберг // Руководство по экспериментальному доклиническому изучению новых фармакологических веществ. - 2-е изд. перераб. и доп. Под ред. Р.У. Хабриева. - М.: ОАО "Издательство "Медицина", 2005. – С.642-682.

27. Иванов, В.Н. Ингибиторы матриксных металлопротеиназ на основе производных 5-арилизатинов: синтез и изучение взаимосвязи структура-активность: дис. канд. хим. наук: 1.4.16 / Иванов Владимир Николаевич. – М., 2024. – 214 с.
28. Казеко, Л.А. Матриксные металлопротеиназы как потенциальный диагностический маркер воспалительных и неопластических процессов в полости рта [Текст] / Л.А. Казеко, Ю.Д. Бенеш // Современная стоматология. – 2019. – № 2. – С. 17-20.
29. Клишо, Е.В. Матриксные металлопротеиназы в онкогенезе [Текст] / Е.В. Клишо // Сибирский онкологический журнал. – 2003. – №2 – С. 62-70.
30. Колясникова, К.Н. Сходство цикло-пролилглицина с пирацетамом по антигипоксическому и нейропротекторному эффектам [Текст] / К.Н. Колясникова, Т.А. Гудашева, Г.А. Назарова, П.И. Антипов, С.В. Николаев, Т.А. Антипова, Т.А. Воронина, С.Б. Середенин. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2012. – Т. 75. – №9. – С. 3-6.
31. Крашаков, С.А. Лазерное излучение комплексов с водородной связью 7-диэтиламино-4-метилкумарина [Текст] / С.А. Крашаков, А.И. Акимов, Н.В. Королькова, Л.К. Денисов, Б.М. Ужинов // Журнал прикладной спектроскопии. – 1984. – Т. 40. – № 1. – С. 52-58.
32. Крыжановский, С.А. Изучение кардиопротективных эффектов ингибитора металлопротеиназ 1-({4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-L-пролина на модели острого инфаркта миокарда [Текст] / С.А. Крыжановский, Е.О. Ионова, В.Н. Столярчук, И.Б. Цорин, М.Б. Вититнова, О.С. Григоркевич, Г.В. Мокров, Т.А. Гудашева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 168. – № 11. – С. 582-587.
33. Крыжановский, С.А. Влияние ингибитора металлопротеиназ на раннее постинфарктное ремоделирование в острейшую фазу инфаркта миокарда [Текст] / С.А. Крыжановский, Е.О. Ионова, В.Н. Столярчук, И.Б. Цорин, М.Б. Вититнова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 156. – № 7. – С. 26-32.
34. Лебеденко, А.А. Роль матриксной металлопротеиназы-9 в генезе хронического воспаления бронхов у детей с бронхиальной астмой [Текст] / А.А. Лебеденко, О.Е. Семерник, М.В. Дударева, Е.Б. Тюрина // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2020. – Т. 65. – № 2. – С. 49-54.
35. Македонова, Ю.А. Морфологические особенности и роль дентин-матриксной металлопротеиназы в деградации дентинного матрикса (обзорная статья) [Текст] / Ю.А. Македонова, А.В. Поройская, Т.К. Чурсина, И.В. Венскель // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2019. – Т. 4. – С. 25-28.
36. Маркелова, Е.В. Матриксные металлопротеиназы: их взаимосвязь с системой цитокинов, диагностический и прогностический потенциал [Текст] / Е.В. Маркелова, В.В. Здор,

А.Л. Романчук, О.Н. Бирко // Иммунология, аллергология, инфектология. – 2016. – №2 – С. 11-22.

37. Мирошкина, И.А. К механизму действия селективного ингибитора матричной 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.

38. Михин, В.П. Содержание матричных металлопротеиназ в крови больных артериальной гипертензией с высоким сердечно-сосудистым риском на фоне терапии статинами [Текст] / В.П. Михин, О.А. Осипова, В.В. Воротынцева, Д.Н. Перуцкий, Н.И. Головина // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2022. – Т. 21. – № 10. – С. 3422.

39. Москаленко, М.И. Вовлеченность генов матричных металлопротеиназ в формирование артериальной гипертензии и ее осложнений (обзор) [Текст] / М.И. Москаленко // Научный результат. Медицина и фармация. – 2018. – Т.4. – №1. – С. 53-69.

40. Невзорова, В.А. Роль матричных металлопротеиназ в формировании морфофункционального дисбаланса воздухоносных путей при хронической обструктивной болезни легких [Текст] / В.А. Невзорова, Т.В. Тилик, Е.А. Гилицанов, Е.А. Панченко, С.Е. Вахрушева, В.В. Тилик // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2011. – № 2. – С. 9-13.

41. 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.

42. 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.

43. Патент 2826902 С1 Российская Федерация, СПК С07D 207/48; А61К 31/401; А61Р 35/00; А61Р 25/00. Ингибитор матричных 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.

44. Печерина, Т.Б. Матричные металлопротеиназы. Клиническая и прогностическая значимость у больных инфарктом миокарда [Текст] / Т.Б. Печерина, О.Л. Барбараш // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2019. – Т 4. – № 2. – С. 84-94.

45. Регистрация лекарственных средств России®: РЛС®: сайт. – URL: <https://www.rlsnet.ru/drugs/doksorubicin-1268#:~:text=В%20качестве%20монотерапии%20рекомендуемая%20стандартная,первый%20и%20восьмой%20дни%20цикла> (дата обращения: 05.03.2024).

46. Резник, Е.В. Матричные металлопротеиназы, их ингибиторы и маркеры воспаления у пациентов с хронической сердечной недостаточностью [Текст] / Е.В. Резник, Е.С. Крупнова, М.А. Билинская, А.А. Ясновская, И.Г. Никитин, С.Н. Переходов // Русский Медицинский Журнал. – 2023. – Т. 9. – С. 12-17.

47. Ришко, О.А. Тетрациклины: вчера, сегодня, завтра [Текст] / О.А. Ришко // Журнал "Свиноводство" – 2019. – № 1. – С. 50–51.

48. Рогова, Л.Н. Матричные металлопротеиназы, их роль в физиологических и патологических процессах (Обзор) [Текст] / Л.Н. Рогова, Н.В. Шестернина, Т.В. Замечник, И.А. Фастова // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – Т. 18. – № 2. – С. 86-89.

49. Соловьева, Н.И. Матричные металлопротеиназы и их эндогенные регуляторы при плоскоклеточной карциноме шейки матки: (обзор собственных данных) [Текст] / Н.И. Соловьева, О.С. Тимошенко, Т.А. Гуреева, Е.В. Кугаевская // Биомедицинская химия. – 2015. –Т. 61. – № 6. – С. 694-704.

50. Соловьёва, Н.И. Основные металлопротеиназы соединительно-тканного матрикса [Текст] / Н.И. Соловьёва // Биоорганическая химия. - 1994. – Т.20. – №2. – С. 143-152.

51. Терентьев, А.А. Производные N-гидроксипутанамида: ингибирование матричных металлопротеиназ и противоопухолевый потенциал [Текст] / А.А. Терентьев, С.Я. Гадомский, А.А. Балакина, Д.В. Мищенко, Т.Е. Сашенкова, Е.Н. Климанова, Т.С. Коковина //Материалы 6-ой Российской конференции по медицинской химии, приуроченной к празднованию 300-летия Российской академии Наук. – 2024. – С. 44.

52. Тихаева, К.Ю. Роль металлопротеиназ в обмене белков внеклеточного матрикса эндометрия в норме и при патологии [Текст] / К.Ю. Тихаева, Л.Н. Рогова, Л.В. Ткаченко // Проблемы репродукции. – 2020. – Т. 26. – № 4. – С. 22–29.
53. Трещалина, Е.М. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств [Текст] / Е.М. Трещалина, О.С. Жукова, Г.К. Герасимова, Н.В. Андропова, А.М. Гарин / В кн. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под общ. ред. А.Н. Миронова. Часть 1, М.: Гриф и К. – 2012. – С. 640–654.
54. Фабрикантов, О.Л. Матриксные металлопротеиназы в прогнозировании непролиферативной диабетической ретинопатии в пожилом возрасте [Текст] / О.Л. Фабрикантов, И.В. Лев, Н.М. Агарков, Р.Э. Османов // Офтальмология. – 2022. – Т. 19. – № 4. – С. 803-807.
55. Факторы роста.: Журнал БиоХимМак. 39:392-400: сайт. – URL: <https://www.biochemmack.ru/upload/uf/d34/d34c859be8554012638d04aad2b67344.pdf> (дата обращения: 02.08.2023).
56. Шадрина, А.С. Матриксные металлопротеиназы: структура, функции и генетический полиморфизм [Текст] / А.С. Шадрина // Патогенез. – 2017. – Т. 15. – № 2 - С. 14 – 23.
57. Юнусова, Н.В. Матриксные металлопротеиназы и белки теплового шока на внеклеточных везикулах у больных колоректальным раком: связь с метаболическим статусом [Текст] / Н.В. Юнусова, Д.А. Сваровский, Е.Э. Дандарова, Д.Н. Костромицкий, А.А. Димча, О.В. Черемисина, С.Г. Афанасьев, А.И. Коновалов, Ж.А. Старцева, И.В. Кондакова, М.Р. Патышева, А.Е. Григорьева, Л.В. Спирина // Успехи молекулярной онкологии. – 2022. – Т. 9. – № 3. – С. 38-48.
58. Яблучанский, Н.И. Вариабельность сердечного ритма в помощь практическому врачу [Текст] / Яблучанский Н.И., Мартыненко А.В. // – Харьков: Для настоящих врачей, 2010. – 131 С.
59. Ярмолинская, М.И. Матриксные металлопротеиназы и ингибиторы: классификация, механизм действия [Текст] / М.И. Ярмолинская, А.С. Молотков, В.М. Денисова // Журнал акушерства и женских болезней. – 2012. – Т.61. – №1 – С. 113-125.
60. adisinsight.springer.com: CGS 27023A: сайт. – URL: <https://adisinsight.springer.com/drugs/800005811> (дата обращения 16.02.2024).
61. Amalinei, C. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions [Текст] / C. Amalinei, I.D. Caruntu, S.E. Giusca, R.A. Balan // Romanian Journal of Morphology and Embryology. – 2010. – V. 51. – № 2. – P. 215–228.

62. Aranapakam, V. Synthesis and structure-activity relationship of alpha-sulfonylhydroxamic acids as novel, orally active matrix metalloproteinase inhibitors for the treatment of osteoarthritis [Текст] / V. Aranapakam, G.T. Grosu, J.M. Davis, B. Hu, J. Ellingboe, J.L. Baker, J.S. Skotnicki, A. Zask, J.F. DiJoseph, A. Sung, M.A. Sharr, L.M. Killar, T. Walter, G. Jin, R. Cowling // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2003. – V. 46. – № 12. – P. 2361-2375.
63. Arreguin-Cano, J.A. MMP-2 salivary activity in type 2 diabetes mellitus patients [Текст] / J.A. Arreguin-Cano, B. Ayerdi-Nájera, A. Tacuba-Saavedra, N. Navarro-Tito, A. Dávalos-Martínez, A. Emigdio-Vargas, E. Barrera-Rodríguez, N. Blanco-García, G. Gutiérrez-Venegas, E. Ventura-Molina, G. León-Dorantes // *Diabetology & Metabolic Syndrome*. – 2019. – V. 11. – P. 113-120.
64. Aston, W.J. A systematic investigation of the maximum tolerated dose of cytotoxic chemotherapy with and without supportive care in mice [Текст] / W.J. Aston, D.E. Hope, A.K. Nowak, B.W. Robinson, R.A. Lake, W.J. Lesterhuis // *BMC Cancer*. – 2017. – V. 17. – P. 684-693.
65. Balakina, A. New Derivatives of N-Hydroxybutanamide: Preparation, MMP Inhibition, Cytotoxicity, and Antitumor Activity [Текст] / A. Balakina, S. Gadomsky, T. Kokovina, T. Sashenkova, D. Mishchenko, A. Terentiev // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – V. 24. – P. 16360.
66. Banerjee, S. An updated patent review of matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors (2021-present) [Текст] / S. Banerjee, S.K. Baidya, N. Adhikari, T. Jha // *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. – 2023. V. 33. – № 10. – P. 631-649.
67. Becker, D.P. Orally Active MMP-1 Sparing α -Tetrahydropyranyl and α -Piperidinyl Sulfone Matrix Metalloproteinase (MMP) Inhibitors with Efficacy in Cancer, Arthritis, and Cardiovascular Disease [Текст] / D.P. Becker, T.E. Barta, L.J. Bedell, T.L. Boehm, B.R. Bond, J. Carroll, C.P. Carron, G.A. DeCrescenzo, A.M. Easton, J.N. Freskos, C.L. Funckes-Shippy, M. Heron, S.L. Hockerman, C.P. Howard, J.R. Kiefer, M.H.M.K.J. Li, J.J. McDonald, P.P. Mehta, G.H. Munie, Y. Sunyer, C. Swearingen, C.I. Villamil, D. Welsch, J.M. Williams, Y. Yu, J. Yao // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2010. – V. 53. – № 18. – P. 6653–6680.
68. Bender S.L. US Patent Appl. US 5985900A Metalloproteinase inhibitors, pharmaceutical compositions containing them and their pharmaceutical uses / S.L. Bender, M.A. Abreo // Заявл. 30.03.98; Опубли. 16.11.99. – 31 с.
69. Berton, A. Involvement of Fibronectin Type II Repeats in the Efficient Inhibition of Gelatinases A and B by Long-chain Unsaturated Fatty Acids [Текст] / A. Berton, V. Rigot, E. Huet, M. Decarme, Y. Eeckhout, L. Patthy, G. Godeau, W. Hornebeck, G. Bellon, H. Emonard // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – V. 276. – № 23. – P. 20458–20465.

70. Bhachoo, J. Investigating Protein–Peptide Interactions Using the Schrödinger Computational Suite [Текст] / J. Bhachoo, T. Beuming // In Modeling Peptide-Protein Interactions. Eds. O. Schueler-Furman, N. London. NY, USA: Humana Press. – 2017. – P. 235–254
71. Blasi, F. Proteases and cancer invasion: from belief to certainty [Текст] / F. Blasi, M.P. Stoppelli // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1998. – V. 1423. – P. R35–R44.
72. Brkic, M. Friends or foes: Matrix metalloproteinases and their multifaceted roles in neurodegenerative diseases [Текст] / M. Brkic, S. Balusu, C. Libert, R.E. Vandenbroucke // *Mediators of Inflammation*. – 2015. – V. 2015. – P. 620581-620607.
73. Brown, S. Potent and Selective Mechanism-Based Inhibition of Gelatinases [Текст] / S. Brown, M.M. Bernardo, Z.-H. Li, L.P. Kotra, Y. Tanaka, R. Fridman, S. Mobashery // *Journal of the American Chemical Society*. – 2000. – V. 122. – P. 6799-6800.
74. Burrage, P.S. Matrix metalloproteinases: Role in arthritis [Текст] / P.S. Burrage, K.S. Mix, C.E. Brinckerhoff // *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. – 2006. – V. 11. – P. 529–543.
75. Butler, G.S. The canonical methionine 392 of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) is not required for catalytic efficiency or structural integrity: probing the role of the methionine-turn in the metzincin metalloprotease superfamily [Текст] / G.S. Butler // *Journal of Biological Chemistry* – 2004. – V. 279. – № 15. – P. 15615 – 15620.
76. Byju, R. Comprehensive bioinformatic profiling of matrix metalloproteinases and their inhibitors: Expression and interaction patterns in head and neck cancer toward predictive biomarkers and personalized therapies [Текст] / R. Byju, S. Sunil, S. Sadhasivan, R. Parsanathan // *Oral Oncology Reports*. – 2024. – V. 11. – P. 100583.
77. Cabral-Pacheco, G.A. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases [Текст] / G.A. Cabral-Pacheco, I. Garza-Veloz, C. Castruita-De la Rosa, J.M. Ramirez-Acuña, B.A. Perez-Romero, J.F. Guerrero-Rodriguez, N. Martinez-Avila, M.L. Martinez-Fierro // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – V. 21. – P. 9739-9793.
78. Camodeca, C. Discovery of a new selective inhibitor of A Disintegrin And Metalloprotease 10 (ADAM-10) able to reduce the shedding of NKG2D ligands in Hodgkin's lymphoma cell models [Текст] / C. Camodeca, E. Nuti, L. Tepshi, S. Boero, T. Tuccinardi, E.A. Stura, A. Poggi, M.R. Zocchi, A. Rossello // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2016. – V. 111. – P. 193-201.
79. Catania, J.M. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiology [Текст] / J.M. Catania, G. Chen, A.R. Parrish // *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. – 2007. – V. 292. – P. F905–F911.
80. Cathcart, J.M. MMP Inhibitors: Past, present and future [Текст] / J.M. Cathcart, J. Cao // *Frontiers in Bioscience*. – 2015. – V. 20. – № 7. – P. 1164-1178.

81. Cerisano, G. Effects of a timely therapy with doxycycline on the left ventricular remodeling according to the pre-procedural TIMI flow grade in patients with ST-elevation acute myocardial infarction [Текст] / G. Cerisano, P. Buonamici, R. Valenti, G. Moschi, E. Taddeucci, L. Giurlani, A. Migliorini, R. Vergara, G. Parodi, R. Sciagra`, R. Romito, P. Colonna, D. Antoniucci // Basic Research in Cardiology. – 2014. – V. 109. – № 4. – P. 412-420.
82. Cerisano, G. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor after reperfused ST-elevation myocardial infarction treated with doxycycline. Insights from the TIPTOP trial [Текст] / G. Cerisano, P. Buonamici, A.M. Gori, R. Valenti, R. Sciagrà, B. Giusti, A. Sereni, S. Raspanti, P. Colonna, G.F. Gensini, R. Abbate, R. Schulz, D. Antoniucci // International Journal of Cardiology. – 2015. – V. 197. – P. 147–153.
83. Cheng, S. Matrix metalloproteinase 2 and basement membrane integrity: A unifying mechanism for progressive renal injury [Текст] / S. Cheng, A.S. Pollock, R. Mahimkar, J.L. Olson, D.H. Lovett // FASEB Journal. – 2006. – V. 20. – P. 1898–1900.
84. clinicaltrials.gov: A Phase I Study of Oral COL-3 (NSC-683551), a Matrix Metalloproteinase Inhibitor, in Patients With Refractory Metastatic: сайт. – URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00001683?cond=matrix+metalloproteinase&draw=4&rank=20> (дата обращения: 17.08.2023).
85. clinicaltrials.gov: A Phase 1 Study of S-3304 in Patients With Solid Tumors: сайт. – URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00033215?cond=matrix+metalloproteinase&draw=10&rank=55> (дата обращения: 17.08.2023).
86. clinicaltrials.gov: A Study of Doxycycline and Tauroursodeoxycholic Acid (Doxy/TUDCA) Plus Standard Supportive Therapy Versus Standard Supportive Therapy Alone in Cardiac Amyloidosis Caused by Transthyretin: сайт. – URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03481972?term=Doxycycline&rank=1> (дата обращения: 17.08.2023).
87. clinicaltrials.gov: Doxycycline to Protect Heart Muscle After Heart Attacks: сайт. – URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03508232> (дата обращения: 28.03.2025).
88. clinicaltrials.gov: Marimastat in Treating Patients With Stage III Non-small Cell Lung Cancer: сайт. – URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00002911?intr=BB-2516&rank=3> (дата обращения: 17.08.2023).
89. clinicaltrials.gov: Marimastat or No Further Therapy in Treating Women With Metastatic Breast Cancer That Is Responding or Stable Following Chemotherapy: сайт. – URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00003010?intr=BB-2516&rank=2> (дата обращения: 17.08.2023).

90. clinicaltrials.gov: Study of S-3304 in Patients With Locally Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: сайт. – URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00078390> (дата обращения: 17.08.2023).
91. clinicaltrials.gov: Tetracycline (Doxycycline) and Post Myocardial Infarction Remodeling (TIPTOP): сайт. – URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00469261?cond=matrix+metalloproteinase&draw=10&rank=54> (дата обращения: 17.08.2023).
92. Cojocaru, I.M. Changes in plasma matrix metalloproteinase-9 levels in patients with acute ischemic stroke [Текст] / I.M. Cojocaru, M. Cojocaru, V. Sapira, G. Socoliuc, C. Herteau, S. Paveliu // Romanian Journal of Internal Medicine. – 2012. – V. 50. – P. 155-158.
93. Copin, J.C. Matrix metalloproteinase-9 deficiency has no effect on glial scar formation after transient focal cerebral ischemia in mouse [Текст] / J.C. Copin, Y. Gasche // Brain Research. – 2007. – V. 1150. – P. 167-173.
94. Costa, D. Metalloproteinases as Biomarkers and Sociomarkers in Human Health and Disease [Текст] / D. Costa, E. Scalise, N. Ielapi, U.M. Bracale, M. Andreucci, R. Serra // Biomolecules. – 2024. – V. 14. – P. 96.
95. Coussens, L.M. Matrix metalloproteinases and the development of cancer [Текст] / L.M. Coussens, Z. Werb // Chemistry & Biology. – 1996. – V. 3. – № 11. – P. 895-904.
96. Cremlyn, R.J. Derivatives of cinnamide-4-sulfonyl chloride & p-(PHTHalimido) benzene- sulfonyl chloride [Текст] / R.J. Cremlyn, F.S. Swinbourne, A. Batchelor, R. Honeyman, D. Nash // Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry. – 1983. – V. 2. – № 10. – P. 1029 – 1043.
97. Cui, J. Inhibition of MMP-9 by a selective gelatinase inhibitor protects neurovasculature from embolic focal cerebral ischemia [Текст] / J. Cui, S. Chen, C. Zhang, F. Meng, W. Wu, R. Hu, O. Hadass, T. Lehmidi, G.J. Blair, M. Lee, M. Chang, S. Mobashery, G.Y. Sun, Z. Gu // Molecular Neurodegeneration. – 2012. – V. 7. – P. 21-35.
98. Curci, J.A. Preoperative treatment with doxycycline reduces aortic wall expression and activation of matrix metalloproteinases in patients with abdominal aortic aneurysms [Текст] / J.A. Curci, D. Mao, D.G. Bohner, B.T. Allen, B.G. Rubin, J.M. Reilly, G.A. Sicard, R.W. Thompson // Journal of Vascular Surgery. – 2000. – V.31. – №2. – P.325–342.
99. DeLeon-Pennell, K.Y. Matrix Metalloproteinases in Myocardial Infarction and Heart Failure [Текст] / K.Y. DeLeon-Pennell, C.A. Meschiari, M. Jung, M.L. Lindsey // Progress in Molecular Biology and Translational Science. – 2017. – V. 147. – P. 75-100.
100. Derosa, G. Matrix metalloproteinase 2 may be a marker of microangiopathy in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus [Текст] / G. Derosa, M.A. Avanzini, D. Geroldi, R. Fogari,

R. Lorini, A. De Silvestri, C. Tinelli, G. Rondini, G. d'Annunzio // *Diabetes Research and Clinical Practice*. – 2005. – V. 70. – P. 119–125.

101. DeRuiter, J. Synthesis and *in vitro* aldose reductase inhibitory activity of compounds containing an N-acylglycine moiety [Текст] / J. DeRuiter, R.F. Borne, C.A. Mayfield // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1989. – V. 32. - № 1. – P. 145 – 151.

102. Devy, L. Selective Inhibition of Matrix Metalloproteinase-14 Blocks Tumor Growth, Invasion, and Angiogenesis [Текст] / L. Devy, L. Huang, L. Naa, N. Yanamandra, H. Pieters, N. Frans, E. Chang, Q. Tao, M. Vanhove, A. Lejeune, R. van Gool, D.J. Sexton, G. Kuang, D. Rank, S. Hogan, C. Pazmany, Y.L. Ma, S. Schoonbroodt, A.E. Nixon, R.C. Ladner, R. Hoet, P. Henderikx, C. TenHoor, S.A. Rabbani, M.L. Valentino, C.R. Wood, D.T. Dransfield // *Cancer Research*. – 2009. – V. 69. – № 4. – P. 1517-1527.

103. Dezube, B.J. Emerging targets and novel strategies in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma: bidirectional translational science [Текст] / B.J. Dezube, R. Sullivan, H.B. Koon // *Journal of Cellular Physiology*. – 2006. – V. 209. – № 3. – P. 659-662.

104. Dezube, B.J. Randomized Phase II Trial of Matrix Metalloproteinase Inhibitor COL-3 in AIDS-Related Kaposi's Sarcoma: An AIDS Malignancy Consortium Study [Текст] / B.J. Dezube, S.E. Krown, J.Y. Lee, K.S. Bauer, D.M. Aboulafia // *Journal of clinical oncology*. – 2006. – V. 24. – № 9. – P. 1389-1394.

105. DrugBankOnline: сайт. – URL: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00254> (дата обращения: 31.03.2025).

106. drugs.com: Gemcitabine (Monograph): сайт. – URL: <https://www.drugs.com/monograph/gemcitabine.html> (дата обращения: 02.02.2024).

107. Ducharme, A. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction [Текст] / A. Ducharme, S. Frantz, M. Aikawa, E. Rabkin, M. Lindsey, L.E. Rohde, F.J. Schoen, R.A. Kelly, Z. Werb, P. Libby, R.T. Lee // *Journal of Clinical Investigation*. – 2000. – V. 106. – P. 55–62.

108. Dufour, A. Missing the target: Matrix metalloproteinase antitargets in inflammation and cancer [Текст] / A. Dufour, C.M. Overall // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2013. – V. 34. – № 4. – P. 233–242.

109. Elgezawi, M. Matrix Metalloproteinases in Dental and Periodontal Tissues and Their Current Inhibitors: Developmental, Degradational and Pathological Aspects [Текст] / M. Elgezawi, R. Haridy, K. Almas, M.A. Abdalla, O. Omar, H. Abuhashish, A. Elembaby, U.C. Wölfe, Y. Siddiqui, D. Kaisarly // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – V. 23. – P. 8929-8945.

110. Fan, X. Matrix metalloproteinase-2 in oncostatin M-induced sarcomere degeneration in cardiomyocytes [Текст] / X. Fan, B.G. Hughes, M.A. Ali, B.Y. Chan, K. Launier, R. Schulz // American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. – 2016. – V.311. – № 1. – P. H183-189.
111. Faust, A. Synthesis and Evaluation of a Novel Fluorescent Photoprobe for Imaging Matrix Metalloproteinases [Текст] / A. Faust, B. Waschkau, J. Waldeck, C. Höltke, H.-J. Breyholz, S. Wagner, K. Kopka, W. Heindel, M. Schäfers, C. Bremer // Bioconjugate Chemistry. – 2008. – V. 19. – P. 1001-1008.
112. Fingleton, B. Matrix Metalloproteinases as Valid Clinical Targets Current Pharmaceutical Design [Текст] / B. Fingleton // Current Pharmaceutical Design. – 2007. – V. 13. – № 3. – P. 333 – 346.
113. Fornieles, G. Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors as Potential Prognostic Biomarkers in Head and Neck Cancer after Radiotherapy [Текст] / G. Fornieles, M.I. Núñez, J. Expósito // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – V. 25. – P. 527.
114. Fujimoto, M. Tissue inhibitor of metalloproteinases protect blood-brain barrier disruption in focal cerebral ischemia [Текст] / M. Fujimoto, Y. Takagi, T. Aoki, M. Hayase, T. Marumo, M. Gomi, M. Nishimura, H. Kataoka, N. Hashimoto, K. Nozaki // Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 2008. – V. 28. – P. 1674–1685.
115. Galardy, R.E. Low Molecular Weight Inhibitors in Corneal Ulceration [Текст] / R.E. Galardy, M.E. Cassabonne, C. Giese, J.H. Gilbert, F. Lapierre, H. Lopez, M.E. Schaefer, R. Stack, M. Sullivan, B. Summers, R. Tressler, D. Tyrrell, J. Wee, S.D. Allen, J.J. Castellot, J.P. Barletta, G.S. Schultz, L.A. Fernandez, S. Fisher, T.Y. Cui, H.G. Foellmer, D. Grobelny, W.M. Holleran // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1994. – V. 732. – № 1. – P. 315-323.
116. Gao, L. Degradation of cardiac myosin light chain kinase by matrix metalloproteinase-2 contributes to myocardial contractile dysfunction during ischemia reperfusion [Текст] / L. Gao, Y.J. Zheng, S.S. Gu, J.L. Tan, C. Paul, Y.G. Wang, H.T. Yang // Journal of Molecular and Cellular Cardiology. – 2014. – V. 77. – P.102-112.
117. Gao, X.-Q. Kaempferol inhibited invasion and metastasis of gastric cancer cells by targeting AKT/GSK3 β pathway based on network pharmacology and molecular docking [Текст] / X.-Q. Gao, H.-L. Li, M. Wang, C.-T. Yang, R. Su, L.-H. Shao // Journal of Asian Natural Products Research. – 2025. – V. 27. – № 3. – P. 421-441.
118. Gasche, Y. Matrix Metalloproteinase Inhibition Prevents Oxidative Stress-Associated Blood–Brain Barrier Disruption After Transient Focal Cerebral Ischemia [Текст] / Y. Gasche, J.C. Copin, T. Sugawara, M. Fujimura, P.H. Chan // Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 2001. – V. 21. – P. 1393–1400.

119. Goodarzi, K. Structurally decoupled hyaluronic acid hydrogels for studying matrix metalloproteinase-mediated invasion of metastatic breast cancer cells [Текст] / K. Goodarzi, S.S. Rao // International Journal of Biological Macromolecules. – 2024. – V. 277. – P. 134493.
120. Graf von Roedern, E. Design and Synthesis of Malonic Acid-Based Inhibitors of Human Neutrophil Collagenase (MMP8) [Текст] / E. Graf von Roedern, F. Grams, H. Brandstetter, L. Moroder // Journal of Medicinal Chemistry. – 1998. – V. 41. – № 3. – P. 339-345.
121. 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.
122. Gu, Z. A Highly Specific Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-9 Rescues Laminin from Proteolysis and Neurons from Apoptosis in Transient Focal Cerebral Ischemia [Текст] / Z. Gu, J. Cui, S. Brown, R. Fridman, S. Mobashery, A.Y. Strongin, S.A. Lipton // The Journal of Neuroscience. – 2005. – V. 25. – № 27. – P. 6401-6408.
123. Gupta, S.P. Quantitative Structure–Activity Relationship Studies on Zinc-Containing Metalloproteinase Inhibitors [Текст] / S.P. Gupta // Chemical Reviews. – 2007. – V. 107. – № 7. – P. 3042-3087.
124. Hanssona, J. Relations of serum MMP-9 and TIMP-1 levels to left ventricular measures –and cardiovascular risk factors: a population-based study [Текст] / J. Hanssona, L. Linda, J. Hultheb // European Journal of Preventive Cardiology – 2008 – V. 16. – № 3. – P. 297 – 303.
125. Haorah, J. Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction [Текст] / J. Haorah, S.H. Ramirez, K. Schall, D. Smith, R. Pandya, Y. Persidsky // Journal of Neurochemistry. – 2007. – V. 101. – P. 566–57.
126. Hattori, N. MMP-13 plays a role in keratinocyte migration, angiogenesis, and contraction in mouse skin wound healing [Текст] / N. Hattori, S. Mochizuki, K. Kishi, T. Nakajima, H. Takaishi, J. D’Armiento, Y. Okada // The American Journal of Pathology. – 2009. – V. 175. – P. 533–546.
127. Hidalgo, M. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy [Текст] / M. Hidalgo, S.G. Eckhardt // Journal of the National Cancer Institute. – 2001. – V. 93. – № 3. – P. 178-193.
128. Hori, Y. Doxycycline attenuates isoproterenol-induced myocardial fibrosis and matrix activity in rats [Текст] / Y. Hori, S. Kunihiro, S. Sato, K. Yoshioka, Y. Hara, K. Kanai, F. Hoshi, N. Itoh, S. Higuchi // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2009. – V.32. – №10. – P.1678-1682.
129. Hsieh, C.-C., SERPING1 Reduces Cell Migration via ERK-MMP2-MMP-9 Cascade in Sorafenib- Resistant Hepatocellular Carcinoma [Текст] / C.-C. Hsieh, Y.-H. Wu, Yi.-L. Chen, C.-I

Wang, C.-J. Li, I.-H. Liu, C.-W. Chou, Y.-H. Lin, P.-S. Huang, T.-C. Huang, C.-Y. Chen // *Environmental Toxicology*. – 2025. – V. 40. – P. 318–327.

130. Hudson, M.P. Effects of selective matrix metalloproteinase inhibitor (PG-116800) to prevent ventricular remodeling after myocardial infarction: results of the PREMIER (Prevention of Myocardial Infarction Early Remodeling) trial [Текст] / M.P. Hudson, P.W. Armstrong, W. Ruzyllo, J. Brum, L. Cusmano, P. Krzeski, R. Lyon, M. Quinones, P. Theroux, D. Sydlowski, H.E. Kim, M.J. Garcia, W.A. Jaber, W.D. Weaver // *Journal of the American College of Cardiology*/ – 2006. – V. 48. – № 1. – P. 15-20.

131. Hughes, B.G. Targeting MMP-2 to treat ischemic heart injury [Текст] / B.G. Hughes, R. Schulz // *Basic Research in Cardiology*. – 2014. – V.109. – №4. – P.424.

132. Hundsley, M.M. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis [Текст] / M.M. Hundsley, D.R. Edwards // *International Journal of Cancer*. – 2005. – V. 11. – № 6. – P. 849-860.

133. Huxley-Jones, J. The evolution of the vertebrate metzincins; Insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio* [Текст] / J. Huxley-Jones, T.K. Clarke, C. Beck // *BMC Evolutionary Biology*. – 2007. – V. 7. – № 1. – P. 63-84.

134. Invasive Blood Pressure: fundamentals and best practices for preclinical research [Электронный ресурс]: вебинар / T.L. Smith – Электрон. дан. – образовательный онлайн-портал для исследователей биологических наук InsideScientific 30.11.2017. – Режим доступа: <https://insidescientific.com/webinar/fundamentals-invasive-blood-pressure-adinstruments/>, свободный. – Загл. с экрана.

135. Ivanov, V. Het(aryl)isatin to het(aryl)aminoindoline scaffold hopping: A route to selective inhibitors of matrix metalloproteinases [Текст] / V. Ivanov, M. Agamennone, I. Iusupov, A. Laghezza, A. Novoselov, E. Manasova, A. Altieri, P. Tortorella, A. Shtil, A. Kurkin // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2022. – V. 15. – P. 103492.

136. Iyer, R.P. The History of Matrix Metalloproteinases (MMPs): Milestones, Myths, and (Mis)Perceptions [Текст] / R.P. Iyer, N.L. Patterson, G.B. Fields, M.L. Lindsey // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. – 2012. – V. 303. – № 8. – P. H919-H930.

137. Jackson, G.R. Nerve growth factor affects on pyridine nucleotides after oxidant injury of pheochromocytoma cells [Текст] / G.R. Jackson, K. Werrbach-Perez, E.L. Ezell, J.F. Post, J.R. Perez-Polo // *Brain Research*. – 1992. – V. 592. – №1. – P. 239-248.

138. Jain, P. Sulphonamides: Deserving class as MMP inhibitors? [Текст] / P. Jain, C. Saravanan, S.K. Singh // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2013. – V. 60. – P. 89–100.

139. Jong, G.P. Serum MMP-9 activity as a diagnosing marker for the developing heart failure of post MI patients [Текст] / G.P. Jong, T. Ma, P. Chou, M.H. Chang, C.H. Wu, P.C. Lis, S.D. Lee, J.Y. Liu, W.W. Kuo, C.Y. Huang // *Chinese Journal of Physiology*. – 2006. – V. 49. – P. 104–109.

140. Kandasamy, A.D. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: Beyond the matrix [Текст] / A.D. Kandasamy, A.K. Chow, M.A. Ali, R. Schulz // Cardiovascular Research. – 2010. – V. 85. – P. 413–423.
141. Kessenbrock, K. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment [Текст] / K. Kessenbrock, V. Plaks, Z. Werb // Cell. – 2010. – V. 141. – № 1. – P. 52-67.
142. Kim, S.H. Structure-based design of potent and selective inhibitors of collagenase-3 (MMP-13) [Текст] / S.-H. Kim, A.T. Pudzianowski, K.J. Leavitt, J. Barbosa, P.A. McDonnell, W.J. Metzler, B.M. Rankin, R. Liu, W. Vaccaro, W. Pitts // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2005. – V. 15. – № 4. – P. 1101-1106.
143. Kim, T.H. Expression and Activation of Pro-MMP-2 and Pro-MMP-9 During Rat Liver Regeneration [Текст] / T.H. Kim, W.M. Mars // Hepatology. – 2003. – V. 31. – № 1. – P. 75 – 82.
144. Kim, W.U. Elevated matrix metalloproteinase-9 in patients with systemic Sclerosis [Текст] / W.U. Kim, S.Y. Min, M.L. Cho, K.H. Hong, Y.J. Shin, S.H. Park, C.S. Cho // Arthritis Research & Therapy. – 2005. – V. 7. – № 1. – P. 71-79.
145. Kontogiorgis, C.A. Matrix Metalloproteinase Inhibitors: A Review on Pharmacophore Mapping and (Q)Sars Results [Текст] / C.A. Kontogiorgis, P. Papaioannou, D.J. Hadjipavlou-Litina // Current Medicinal Chemistry. – 2005. – V. 12. – № 3. – P. 339-355.
146. Kurzepa, J. Matrix metalloproteinase-9 contributes to the increase of tau protein in serum during acute ischemic stroke [Текст] / J. Kurzepa, J. Bielewicz, A. Grabarska, Z. Stelmasiak, M. Stryjecka-Zimmer, H. Bartosik-Psujek // Journal of Clinical Neuroscience. – 2010. – V. 17. – № 8. – P. 997-999.
147. Lang, R.M. Chamber Quantification Writing Group; American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee. European Association of Echocardiography. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology [Текст] / R.M. Lang, M. Bierig, R.B. Devereux, F.A. Flachskampf, E. Foster, P.A. Pellikka, M.H. Picard, M.J. Roman, J. Seward, J.S. Shanewise, S.D. Solomon, K.T. Spencer, M.S. Sutton, W.J. Stewart // Journal of the American Society of Echocardiography. – 2005. – V. 18. – № 12. – P. 1440-1463.
148. Laronha, H. Challenges in Matrix Metalloproteinases Inhibition [Текст] / H. Laronha, I. Carpinteiro, J. Portugal, A. Azul, M. Polido, K.T. Petrova, M. Salema-Oom, J. Caldeira // Biomolecules. – 2020. – V. 10. – P. 717-777.
149. Lauer-Fields, J.I. Matrix metalloproteinases and collagen catabolism [Текст] / J.I. Lauer-Fields, D. Juska, G.B. Fields // Biopolimers. – 2002. – V. 66. – № 1. – P. 19-32.

150. Lee, H. Doxycycline inhibits matrix metalloproteinase-9 and laminin degradation after transient global cerebral ischemia [Текст] / H. Lee, J.-W. Park, S.-P. Kim, E. H. Lo, S.-R. Lee // *Neurobiology of Disease*. – 2009. – V. 34. – P. 189-198.
151. Lee, H.W. Enhanced cardiac expression of two isoforms of matrix metalloproteinase-2 in experimental diabetes mellitus [Текст] / H.W. Lee, S.J. Lee, M.Y. Lee, M.W. Park, S.S. Kim, N. Shin, D.H. Lovett, S.S. Bae, J. Ahn, J.S. Park, J.H. Oh, J.H. Choi, H.C. Lee, K.S. Cha, T.J. Hong, S.H. Song // *PLoS ONE*. – 2019. – V. 14. – P. e0221798-e0221815.
152. Lee, M.A. Serum gelatinase B, TIMP-1 and TIMP-2 levels in multiple sclerosis. A longitudinal clinical and MRI study [Текст] / M.A. Lee, J. Palace, G. Stabler, J. Ford, A. Gearing, K. Miller // *Brain*. – 1999. – V. 122. – P. 191–197.
153. Levin, J.I. The design and synthesis of aryl hydroxamic acid inhibitors of MMPs and TACE [Текст] / J.I. Levin // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. – 2004. – V. 4. – № 12. – P. 1289-1310.
154. Levitt, N.C. Phase I and pharmacological study of the oral matrix metalloproteinase inhibitor, MMI270 (CGS27023A), in patients with advanced solid cancer [Текст] / N.C. Levitt, F.A. Eskens, K.J. O'Byrne, D.J. Propper, L.J. Denis, S.J. Owen, L. Choi, J.A. Foekens, S. Wilner, J.M. Wood, M. Nakajima, D.C. Talbot, W.P. Steward, A.L. Harris, J. Verweij // *Clinical Cancer Research*. – 2001. – V. 7. – № 7. – P. 1912-1922.
155. Li, F. Discovery of matrix metalloproteinase inhibitors as anti-skin photoaging agents [Текст] / F. Li, J. Zhi, R. Zhao, Y. Sun, H. Wen, H. Cai, W. Chen, X. Jiang, R. Bai // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2024. – V. 267. – P. 116152.
156. Lindsey, M.L. Matrix Metalloproteinase-9 Post Myocardial Infarction: Breakdowns and Breakthroughs [Текст] / M.L. Lindsey, Y. Ma, A. Yabluchanskiy // *Global Journal of Human Anatomy & Physiology Research*. – 2014. – V. 1. – № 1. – P. 6-9.
157. Liua, Y. MMP-2 and MMP-9 contribute to the angiogenic effect produced by hypoxia/15-HETE in pulmonary endothelial cells [Текст] / Y. Liu, H. Zhang, L. Yan, W. Du, M. Zhang, H. Chen, L. Zhang, G. Li, J. Li, Y. Dong, D. Zhu // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2018. – V. 121. – P. 36–50.
158. Lorenzl, S. Expression of MMP-2, MMP-9, and MMP-1 and their endogenous counterregulators TIMP-1 and TIMP-2 in postmortem brain tissue of Parkinson's disease [Текст] / S. Lorenzl, D.S. Albers, S. Narr, J. Chirichigno, M.F. Beal // *Experimental Neurology*. – 2002. – V. 178. – P. 13–20.
159. Lorenzl, S. Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases are elevated in cerebrospinal fluid of neurodegenerative diseases [Текст] / S. Lorenzl, D.S. Albers, P.A. LeWitt, J.W. Chirichigno,

S.L. Hilgenberg, M.E. Cudkowicz, M.F. Beal // *Journal of the Neurological Sciences*. – 2003. – V. 207. – P. 71–76.

160. Lorenzl, Y.C. MMP-3 contributes to nigrostriatal dopaminergic neuronal loss, BBB damage, and neuroinflammation in an MPTP mouse model of Parkinson's disease [Текст] / Y.C. Chung, Y.S. Kim, E. Bok, T.Y. Yune, S. Maeng, B.K. Jin // *Mediators of Inflammation*. – 2013. – V. 2013. – P. 370526-370537.

161. MacPherson, L.J. Discovery of CGS 27023A, a Non-Peptidic, Potent, and Orally Active Stromelysin Inhibitor That Blocks Cartilage Degradation in Rabbits [Текст] / L.J. MacPherson, E.K. Bayburt, M.P. Capparelli, B.J. Carrol, R. Goldstein, M.R. Justice, L. Zhu, S. Hu, R.A. Melton, L. Fryer, R.L. Goldberg, J.R. Doughty, S. Spirito, V. Blancuzzi, D. Wilson, E.M. O'Byrne, V. Ganu, D.T. Parker // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1997. – V. 40. – № 16. – P. 2525-2532.

162. Maskos, K. Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors [Текст] / K. Maskos // *Biochimie*. – 2005. – V. 87. – P. 249 – 263.

163. Maurya, S. Matrix Metalloproteinases in Oral Cancer Pathogenesis and their Use in Therapy [Текст] / S. Maurya, D. Prasad, S. Mukherjee // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. – 2024. – V. 24. – № 1. – P. 3-17.

164. McClure, K.F. Alkylation of succinates: synthesis of RO 32-3555 [Текст] / K.F. McClure, M.Z. Axt // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 1998. – V. 8. – P. 143-146.

165. Medscape.com: сайт. – URL: <https://emedicine.medscape.com/article/1108072-overview> (дата обращения: 02.02.2024).

166. Mitchell, P.G. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage [Текст] / P.G. Mitchell, H.A. Magna, L.M. Reeves, L.L. Lopresti-Morrow, S.A. Yocum, P.J. Rosner, K.F. Geoghegan, J.E. Hambor // *Journal of Clinical Investigation*. – 1996. – V. 97. – P. 761–768.

167. Moshal, K.S. Mitochondrial matrix metalloproteinase activation decreases myocyte contractility in hyperhomocysteinemia [Текст] / K.S. Moshal, S.M. Tipparaju, T.P. Vacek, M. Kumar, M. Singh, I.E. Frank, P.K. Patibandla, N. Tyagi, J. Rai, N. Metreveli, W.E. Rodriguez, M.T. Tseng, S.C. Tyagi // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. – 2008. – V.295. – №2. – P. H890-H897.

168. Nagase, H. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs [Текст] / H. Nagase, R. Visse, G. Murphy // *Cardiovascular Research*. – 2006. – V. 69. – № 3. – P. 562–573.

169. Nees, T.A. Inflammation and osteoarthritis-related pain [Текст] / T.A. Nees, N. Rosshirt, T. Reiner, M. Schiltenswolf, B. Moradi // *Schmerz*. – 2019. – V. 33. – № 1. – P. 4–12.

170. Nelson, K.K. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases [Текст] / K.K. Nelson, J.A. Melendez // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2004. – V 37. – № 6. – P. 768–784.

171. Nepomnyashchikh, L.M. Immunohistochemical Analysis of MMP-2 expression in the myocardium during the postinfarction period [Текст] / L.M. Nepomnyashchikh, E.L. Lushnikova, M.A. Bakarev, D.B. Nikityuk, E.I. Yuzhik, M.M. Mzhelskaya, R.D. Nepomnyashchikh, M.G. Klinnikova, A.A. Karpova // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2015. – V.159. – №4. – P.505–510.
172. Nguyen, D.T. The pathophysiologic basis for wound healing and cutaneous regeneration [Текст] / D.T. Nguyen, D.P. Orgill, G.F. Murphy // In *Woodhead Publishing Series in Biomaterials, Biomaterials for Treating Skin Loss*. Eds. D.Orgill, C.Blanco. USA: Woodhead Publishing. - 2009. - P. 25-57.
173. Nguyen, T.T. Roles of Matrix Metalloproteinases in Cutaneous Wound Healing [Текст] / T.T. Nguyen, S. Mobashery, M. Chang // *Roles of Matrix Metalloproteinases in Cutaneous Wound Healing*. – 2016. – P. 37-71
174. Nissinen, L. Matrix metalloproteinases in inflammation [Текст] / L. Nissinen, V.-M. Kähäri // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2014. – V. 1840. – № 8. – P. 2571-2580.
175. O'Brien, P.M. Structure-activity relationships and pharmacokinetic analysis for a series of potent, systemically available biphenylsulfonamide matrix metalloproteinase inhibitors [Текст] / P.M. O'Brien, D.F. Ortwine, A.G. Pavlovsky, J.A. Picard, D.R. Sliskovic, B.D. Roth, R.D. Dyer, L.L. Johnson, C.F. Man, H. Hallak // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2000. – V. 43. – № 2. – P. 156-166.
176. Oltenfreiter, R. New radioiodinated carboxylic and hydroxamic matrix metalloproteinase inhibitor tracers as potential tumor imaging agents [Текст] / R. Oltenfreiter, L. Staelens, A. Lejeune, F. Dumont, F. Frankenhe, J.M. Foidart, G. Slegers // *Nuclear Medicine and Biology*. – 2004. – V. 31. – № 4. – P. 459–468.
177. Oselusi, S.O., Potential matrix metalloproteinase 2 and 9 inhibitors identified from *Ehretia* species for the treatment of chronic wounds - Computational drug discovery approaches [Текст] / S.O. Oselusi, N.R. Sibuyi, D.R. Martin, M. Meyer, A.M. Madiehe // *Computers in Biology and Medicine*. – 2025. – V. 185. – P.109487.
178. Peiskerová, M. Fibroblast Growth Factor 23 and Matrix-Metalloproteinases in Patients with Chronic Kidney Disease: Are They Associated with Cardiovascular Disease? [Текст] / M. Peiskerová, M. Kalousová, M. Kratochvílová, S. Dusilová-Sulková, J. Uhrová, S. Bandúr, I.M. Malbohan, T. Zima, V. Tesar // *Kidney and Blood Pressure Research*. – 2009. – V. 32. – P. 276–283.
179. Peterson, J.T. Matrix metalloproteinase inhibitor development and the remodeling of drug discovery [Текст] / J.T. Peterson // *Heart Failure Reviews*. – 2004. – V. 9. – № 1. – P. 63-79.
180. Peterson, J.T. The importance of estimating the therapeutic index in the development of matrix metalloproteinase inhibitors [Текст] / J.T. Peterson // *Cardiovascular Research*. – 2006. – V. 69. – P. 677 – 687.

181. Peterson, T.J. Matrix Metalloproteinase Inhibition Attenuates Left Ventricular Remodeling and Dysfunction in a Rat Model of Progressive Heart Failure [Текст] / J.T. Peterson, H. Hallak, L. Johnson, H. Li, P.M. O'Brien, D.R. Sliskovic, T.M.A. Bocan, M.L. Coker, T. Etoh, F.G. Spinale // *Circulation*. – 2001. – V. 103. – № 18. – P. 2303—2309.
182. PharmaXChange.info: Matrix Metalloproteinases: Its Implications in Cardiovascular Disorders: сайт. – URL: <http://pharmaxchange.info/press/2011/11/matrix-metalloproteinases-its-implications-in-cardiovascular-disorders/> (дата обращения: 05.02.2024).
183. Pirad, B. Matrix Metalloproteinase Target Family Landscape: A Chemometrical Approach to Ligand Selectivity Based on Protein Binding Site Analysis [Текст] / B. Pirad, H. Matter // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2006. – V. 49. – № 1. – P. 51 – 69.
184. Preece, G. Metalloproteinase-mediated Regulation of L-selectin Levels on Leucocytes [Текст] / G. Preece, G. Murphy, A. Ager // *Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – V. 771. – № 20. – P. 11634-11640.
185. Prontera, C. Inhibition of gelatinase A (MMP-2) by batimastat and captopril reduces tumor growth and lung metastases in mice bearing Lewis lung carcinoma [Текст] / C. Prontera, B. Mariani, C. Rossi, A. PoggI, D. Rotilio // *International Journal of Cancer*. – 1999. – V. 81. – № 5. – P. 761-766.
186. Radzki, D. Matrix Metalloproteinases in the Periodontium—Vital in Tissue Turnover and Unfortunate in Periodontitis [Текст] / D. Radzki, A. Negri, A. Kusiak, M. Obuchowski // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – V. 25. – P. 2763.
187. Raffetto, J.D. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease [Текст] / J.D. Raffetto, R.A. Khalil // *Biochemical pharmacology*. – 2008. – V. 75. – P. 346-359.
188. Randall, C. Anticonvulsant activity of some 4-Methoxy- and 4-Chlorobenzanilides [Текст] / C. Randall, C.L. McMillan // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. - 1990. – V. 79. - № 3. - P.220-222
189. Rashid, Z.A. Novel Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Inhibitors in Cancer Treatment [Текст] / Z.A. Rashid, S.K. Bardaweel // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – V. 24. – P. 12133-12156.
190. Riches, K. Chronic hypoxia inhibits MMP-2 activation and cellular invasion in human cardiac myofibroblasts [Текст] / K. Riches, M.E. Morley, N.A. Turner, D.J. O'Regan, S.G. Ball, C. Peers, K.E. Porter // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* – 2009. – V. 47. – P. 391-399.
191. Rivera, S. Metzincin Proteases and Their Inhibitors: Foes or Friends in Nervous System Physiology? [Текст] / S. Rivera, M. Khrestchatisky, L. Kaczmarek, G.A. Rosenberg, D.M. Jaworski // *Journal of Neuroscience*. – 2010. – V. 30. – № 46. – P. 15337-15357.

192. Rohde, L.E. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice [Текст] / L.E. Rohde, A. Ducharme, L.H. Arroyo, M. Aikawa, G.H. Sukhova, A. Lopez-Anaya, K.F. McClure, P.G. Mitchell, P. Libby, R.T. Lee // *Journal of the American Heart Association*. – 1999. – V. 99. – № 33. – P. 3063 – 3070.
193. Romanic, A.M. Matrix metalloproteinase expression in cardiac myocytes following myocardial infarction in the rabbit [Текст] / A.M. Romanic, C.L. Burns-Kurtis, B. Gout, I. Berrebi-Bertrand, E.H. Ohlstein // *Life Sciences*. – 2001. – V. 68. – P. 799–814.
194. Sabino, F. Matrix metalloproteinases in impaired wound healing [Текст] / F. Sabino, U. auf dem Keller // *Metalloproteinases In Medicine* – 2015. – V. 2. – P. 1–8.
195. Sampieri, C.L. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Chronic Kidney Disease and Acute Kidney Injury: A Systematic Review of the Literature [Текст] / C.L. Sampieri, R.A. Orozco-Ortega // *Hippokratia*. – 2018. – V. 22. – P. 99–104.
196. Sandoval, N.G. Matrix Metalloproteinase 2: A Possible Role in Tooth Development and Eruption [Текст] / N.G. Sandoval, N.S.C. Lima, W.G. Bautz, L.N. Gama-de-Souza, K.L.A. Coburn // *Odovtos - International Journal of Dental Sciences*. – 2019. – V. 21. – № 1. – P. 41–51.
197. Sastry, G.M. Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments [Текст] / G.M. Sastry, M. Adzhigirey, T. Day, R. Annabhimoju, W. Sherman // *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. – 2013. – V. 27. – P. 221–234
198. Schechter, I. Reprint of “On the size of the active site in proteases. I.. Papain” [Текст] / I. Schechter, A. Berger // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2012. – V. 425. – № 3. – P. 497-502.
199. Selye, A. I. Simple technic for surgical occlusion of coronary vessels in the rat [Текст] / A. I. Selye, E. Bajusz, S. Crasso, P. Nendell // *Angiology*. – 1960. – № 11. – P. 398–407.
200. Shiryaev, S.A. Matrix metalloproteinase proteolysis of the myelin basic protein isoforms is a source of immunogenic peptides in autoimmune multiple sclerosis [Текст] / S.A. Shiryaev, A.Y. Savinov, P. Cieplak, B.I. Ratnikov, K. Motamedchaboki, J.W. Smith, A.Y. Strongin // *PLoS ONE*. – 2009. – V. 4. – P. e4952.
201. Simian, M. The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells [Текст] / M. Simian, Y. Hirai, M. Navre, Z. Werb, A. Lochter, M.J. Bissell // *Development*. – 2001. – V. 128. – № 16. – P. 3117–3131.
202. Simova, J. Serum Levels of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in Patients with Acute Myocardial Infarction [Текст] / J. Šimová, J. Škvor, D. Slovák, I. Mazura, J. Zvárová // *Folia Biologica (Praha)*. – 2013. – V. 59. – № 5. – P. 181-187.

203. Skiles, J.W. Matrix metalloproteinase inhibitors for treatment of cancer [Текст] / J.W. Skiles, L.G. Monovich, A.Y. Jeng // *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. – 2000. – V. 35. – P. 167-176.
204. Song, J. Selective non-zinc binding MMP-2 inhibitors: novel benzamide Ilomastat analogs with anti-tumor metastasis [Текст] / J. Song, P. Peng, J. Chang, M.-M. Liu, J.-M. Yu, L. Zhou, X. Sun // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2016. – V. 26. – № 9. – P. 2174–2178.
205. Sosna, B. Selected Cytokines and Metalloproteinases in Inflammatory Bowel Disease [Текст] / B. Sosna, D. Aebisher, A. My'sliwiec, K. Dynarowicz, D. Bartusik-Aebisher, P. Ole's, G. Cie'slar, A. Kawczyk-Krupka // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – V. 25. – P. 202.
206. Stack, M.S. Fluorescence quenching studies of matrix metalloproteinases (MMPs): evidence for structural rearrangement of the proMMP-2/TIMP-2 complex upon mercurial activation [Текст] / M.S. Stack, Y. Itoh, T.N. Young, H. Nagase // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1996. – V. 333. – № 1. – P. 163 – 169.
207. Stechmiller, J. Understanding the Role of Nutrition and Wound Healing [Текст] / J. Stechmiller // *Nutrition in Clinical Practice*. – 2010. – V. 25. – № 1. – P. 61-68.
208. Sunny, A. Matrix Metalloproteinase-9 inhibitors as therapeutic drugs for traumatic brain injury [Текст] / A. Sunny, R.R. James, S.R. Menon, S. Rayaroth, A. Daniel, N.A. Thompson, B. Tharakan // *Neurochemistry International*. – 2024. – V. 172. – P. 105642.
209. Supuran, C.T. Drug designn of zinc-enzyme inhibitors / C.T. Supuran, J. Winum, editors. - 1st ed., - Hoboken: Wiley, 2009.
210. Supuran, C.T. Proteinase and Peptidase Inhibition. Recent Potential Targets for Drug Development / C. T. Supuran, A. Scozzafaca; H.J. Smith, C. Simons, Eds. - London and New York: Taylor and Francis, 2002. – 35-61 p.
211. Surówka, A. The Effects of Chronic Immunosuppressive Treatment on Morphological Changes in Cardiac Tissue and the Balance between Matrix Metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and Their Inhibitors in the Rat Heart [Текст] / A. Surówka, M. Zołnierczuk, P. Prowans, M. Grabowska, P. Kupnicka, M. Markowska, J. Olejnik-Wojciechowska, Z. Szlosser, A. Wilk, K. Szumilas, K. Kedzierska-Kapuza // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – V. 25. – P. 4468.
212. Tamura, M. Direct Amide Synthesis from Equimolar Amounts of Carboxylic Acid and Amine Catalyzed by Mesoporous Silica SBA-15 [Текст] / M. Tamura, D. Murase, K. Komura // *Synthesis*. – 2015. – V. 47. – № 6. – P. 769 – 776.
213. Tamura, Y. Highly Selective and Orally Active Inhibitors of Type IV Collagenase (MMP-9 and MMP-2): N-Sulfonylamino Acid Derivatives [Текст] / Y. Tamura, F. Watanabe, T. Nakatani, K. Yasui, M. Fuji, T. Komurasaki, H. Tsuzuki, R. Maekawa, T. Yoshioka, K. Kawada, K. Sugita, M. Ohtani // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1998. – V. 41. – P. 640-649.

214. Tao, Z.Y. Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice [Текст] / Z.Y. Tao, M.A. Cavasin, F. Yang, Y.H. Liu, X.P. Yang // *Life Sciences*. – 2004. – V. 74. – P. 1561–1572.
215. Teichholz, L.E. Problems in echocardiographic volume determinations: echocardiographic-angiographic correlations in the presence or absence of asynergy [Текст] / L.E. Teichholz, T. Kreulen, M.V. Herman, R. Gorlin // *The American Journal of Cardiology*. – 1976. – V. 37. – № 1. – P. 7-11.
216. Thomas, N.V. Metalloproteinase Inhibitors: Status and Scope from Marine Organisms [Текст] / N.V. Thomas, S.-K. Kim // *Biochemistry Research International*. – 2010. – V. 2010. – P. 1-10.
217. Thraillkill, K.M. Matrix Metalloproteinases: Their Potential Role in the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy [Текст] / K.M. Thraillkill, R. Clay Bunn, J.L. Fowlkes // *Endocrine*. – 2009. – V. 35. – P. 1–10.
218. Tochowicz, A. Crystal structures of MMP-9 complexes with five inhibitors: contribution of the flexible Arg424 side-chain to selectivity [Текст] / A. Tochowicz, K. Maskos, R. Huber, R. Oltenfreiter, V. Dive, A. Yiotakis, M. Zanda, T. Pourmotabbed, W. Bode, P. Goettig // *Journal of Molecular Biology*. – 2007. – V. 371. – P. 989 – 1006.
219. Ueda, Y. A colorimetric assay method for the evaluation of neurotrophic activity in vitro [Текст] / Y. Ueda, E. Walsh, H. Nakanishi, K. Yoshida // *Neuroscience Letters*. – 1994. – V. 165. – P. 203-207.
220. Uemura, S. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: Role of oxidative stress [Текст] / S. Uemura, H. Matsushita, W. Li, A.J. Glassford, T. Asagami, K.H. Lee, D.G. Harrison, P.S. Tsao // *Circulation Research*. – 2001. – V. 88. – P. 1291–1298.
221. Van den Nieuwendijk, A. Synthesis and Biological Evaluation of 2,3,5-Substituted [1,2,4]Thiadiazoles as Allosteric Modulators of Adenosine Receptors [Текст] / A. Van den Nieuwendijk, D. Pietra, L. Heitman, A. Goblyos, A.P. Ijzerman // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2004. – V. 47. – P. 663 – 672.
222. Vanhoutte, D. TIMPs and cardiac remodeling: Embracing the MMP-independent-side of the family [Текст] / D. Vanhoutte, S. Heymans // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2009. – V. 48. – № 3. – P. 445 – 453.
223. Veerendhar, A. Phosphorus based inhibitors of matrix metalloproteinases [Текст] / A. Veerendhar, R. Reich, E. Breuer // *Comptes Rendus Chimie*. – 2010. – V. 13. – № 8–9. – P. 1191–1202.
224. Verma, R.P. Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical–biological functions and (Q)SARs [Текст] / R.P. Verma, C. Hansch // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2007. – № 5. – P. 2223-2268.

225. Vilmi-Kerala, T. Subclinical inflammation associated with prolonged TIMP-1 upregulation and arterial stiffness after gestational diabetes mellitus: A hospital-based cohort study [Текст] / T. Vilmi-Kerala, A. Lauhio, T. Tervahartiala, O. Palomaki, J. Uotila, T. Sorsa, A. Palomaki // Cardiovascular Diabetology. – 2017. – V.16. – P. 49-58.
226. Wang, J. Design of barbiturate-nitrate hybrids that inhibit MMP-9 activity and secretion [Текст] / J. Wang, S. O'Sullivan, S. Harmon, R. Keaveny, M.W. Radomski, C. Medina, J.F. Gilmer // Journal of Medicinal Chemistry. – 2012. – V. 55. – № 5. – P. 2154–2162.
227. Wang, J. MMP inhibition by barbiturate homodimers [Текст] / J. Wang, M.W. Radomski, C. Medina, J.F. Gilmer // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2013. – V. 23. – № 2. – P. 444–447.
228. Wang, J. N-substituted homopiperazine barbiturates as gelatinase inhibitors [Текст] / J. Wang, C. Medina, M.W. Radomski, J.F. Gilmer // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2011. – V. 19. – № 16. – P. 4985 – 4999.
229. Wang, X.X. Matrix Metalloproteinases and Their Multiple Roles in Alzheimer's Disease [Текст] / X.X. Wang, M.S. Tan, J.T. Yu, L. Tan // BioMed Research International. – 2014. – V. 2014. – P. 908636-908644
230. Wang, Y. Highly efficient amide synthesis from alcohols and amines by virtue of a water-soluble gold/DNA catalyst [Текст] / Y. Wang, D. Zhu, L. Tang, S. Wang and Z. Wang // Angewandte Chemie International Edition. – 2011. – V. 50. – P. 8917.
231. Wang, Y. Prognostic value of matrix metalloproteinase-2 protein and matrix metalloproteinase-9 protein in colorectal cancer: a meta-analysis [Текст] / Y. Wang, Y. Wei, J. Huang, X. Li, D. You, L. Wang, X. Ma // BMC Cancer. – 2024. – V. 24. – P. 1065.
232. Wang, Y. The role of matrix metalloproteinase 9 in fibrosis diseases and its molecular mechanisms [Текст] / Y. Wang, L. Jiao, C. Qiang, C. Chen, Z. Shen, F. Ding, L. Lv, T. Zhu, Y. Lu, X. Cui // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2024. – V. 171. – P. 116116
233. Wang, Z. Saturated fatty acids activate microglia via Toll-like receptor 4/NF- κ B signalling [Текст] / Z. Wang, D. Liu, F. Wang, S. Liu, S. Zhao, E.-A. Ling, A. Hao // British Journal of Nutrition. – 2012. – V. 107. – № 2. – P. 229-241.
234. Warshawsky, A.M. PCT Patent Appl. WO9812211 3-mercaptoacetylamino-1,5-substituted-2-oxo-azepan derivatives useful as inhibitors of matrix metalloproteinase / A.M. Warshawsky, G.A. Flynn, M.V. Patel, D.W. Beight, J.P. Burkhart, J.-T. Tsay, M.J. Janusz, J. Shen, R.M. Dharanipragada // Заявл. 04.08.97; Опубл. 26.03.98. – 153 с.
235. Whittaker, M. Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors [Текст] / M. Whittaker, C.D. Floyd, P. Brown, A.J. Gearing // Chemical Reviews. – 1999. – V. 99. – № 9. – P. 2735-2776.

236. Whittaker, M. Matrix metalloproteinases and their inhibitors – current status and future challenges [Текст] / M. Whittaker, A. Ayscough // Celltransmissions. – 2001. – V. 17. – № 1. – P. 3–14.
237. Winer, A. Inhibition of breast cancer metastasis by presurgical treatment with an oral matrix metalloproteinase inhibitor: a preclinical proof-of-principle study [Текст] / A. Winer, M. Janosky, B. Harrison, J. Zhong, D. Moussai, P. Siyah, N. Schatz-Siemers, J. Zeng, S. Adams, P. Mignatti // Molecular Cancer Therapeutics. – 2016. – V. 15. – № 10. – P. 2370-2377.
238. Woessner, J.F. The family of matrix metalloproteinases [Текст] / J.F. Woessner // Annals New York academy of sciences. – 1994. – V. 732. – P. 11-21.
239. Wojtowicz-Praga, S.M. Matrix metalloproteinase inhibitors [Текст] / S.M. Wojtowicz-Praga, R.B. Dickson, M.J. Hawkins // Investigational New Drugs. – 1997. – V. 15. – P. 61-75.
240. Wound Healing eBook: сайт. – URL: <https://drmjmurdoch.co.za/wp-content/uploads/2016/01/Wound-Healing-eBook.pdf> (дата обращения 10.07.2025).
241. Xu, J. The Effect of Chemically Modified Tetracycline-3 on the Progression of Dental Caries in Rats [Текст] / J. Xu, C. Miao, Z. Tian, J. Li, C. Zhang, D. Yang // Caries Research. – 2018. – V. 52. – № 4. – P. 297–302.
242. Yabluchanskiy, A. Matrix Metalloproteinase-9: Many Shades of Function in Cardiovascular Disease [Текст] / A. Yabluchanskiy, Y. Ma, R.P. Iyer, M.E. Hall, M.L. Lindsey // Physiology. – 2013. – V. 28. – P. 391-403.
243. Yamamoto, D. Pharmacological implications of MMP-9 inhibition by ACE inhibitors [Текст] / D. Yamamoto, S. Takai // Current Medicinal Chemistry. – 2009. – V. 16. – P. 1349 – 1354.
244. Yang, Y. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for stroke [Текст] / Y. Yang, G.A. Rosenberg // Brain research. – 2015. – V. 1623. – P. 30-38.
245. Yarbrough, W.M. Selective Targeting and Timing of Matrix Metalloproteinase Inhibition in Post–Myocardial Infarction Remodeling [Текст] / W.M. Yarbrough, R. Mukherjee, G.P. Escobar, J.T. Mingoia, J.A. Sample, J.W. Hendrick, K.B. Dowdy, J.E. McLean, A.S. Lowry, T.P. O'Neill, F.G. Spinale // Circulation. – 2003. – V. 108. – P. 1753-1759.
246. Yu, W.H. TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix [Текст] / W.H. Yu, S.C. Yu, Q. Meng, K. Brew, J.F. Woessner // The journal of biological chemistry. – 2000. – V. 275. – № 40. – P. 31226–31232.
247. Yua, H. The effects of novel chitosan-targeted gemcitabine nanomedicine mediating cisplatin on epithelial mesenchymal transition, invasion and metastasis of pancreatic cancer cells [Текст] / H. Yua, H. Songa, J. Xiaoa, H. Chena, X. Jina, X. Linc, B. Pana, W. Ji // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2017. – V. 96 – P. 650–656.

248. Zheng, C.M. Matrix metalloproteinase-7 promotes chronic kidney disease progression via the induction of inflammasomes and the suppression of autophagy [Текст] / C.M. Zheng, K.C. Lu, Y.J. Chen, C.Y. Li, Y.H. Lee, H.W. Chiu // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2022. – V. 154. – P. 113565.
249. Zheng, Y. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications [Текст] / Y. Zheng, S.H. Ley, F.B. Hu // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2018. – V. 14. – № 2. – P. 88–98.
250. Zhong, Y. Recent opportunities in matrix metalloproteinase inhibitor drug design for cancer [Текст] / Y. Zhong, Y.-T. Lu, Y. Sun, Z.-H. Shi, N.-G. Li, Y.-P. Tang, J.-A. Duan // *Expert Opinion on Drug Discovery*. – 2017. – V. 13. – № 1. – P. 75-87.
251. Zhu, J.-X., Uncovering the mechanisms of diosmin in treating obesity-related kidney injury based on network pharmacology, molecular docking, and in vitro validation [Текст] / J.-X. Zhu, F. Chu, W.-M. Zhao, R. Shi, Z.-J. Wang, X.-L. Li, Y.-Y. Zhu, D.-G. Wang // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. – 2025. – V. 398. – № 2. – P. 1973-1989.
252. Zitka, O. Matrix Metalloproteinases [Текст] / O. Zitka, J. Kukacka, S. Krizkova, D. Huska, V. Adam, M. Masarik, R. Prusa, R. Kizek // *Current Medicinal Chemistry*. – 2010. – V. 17. – № 31. – P. 3751-3768.