

## Занятие 1.

### *1.1. Этапы создания и лабораторный синтез потенциальных лекарственных препаратов.*

Создание любого нового лекарственного препарата в 20-ом веке (начиная с появления фармацевтической промышленности и вплоть до ее конца) основывалось, главным образом на умозрительной или эмпирической проработке пути его конструирования. Этот путь создания потенциально полезного лекарственного вещества, от замысла до аптеки и пациента весьма сложен, а главное трудоемок.

*На первой стадии* проводится выбор базовой потенциально активной структуры, т.е. создается замысел всего проекта (*блок 1*, Рисунок 1). Здесь химик решает, что синтезировать, зачем и как синтезировать ПЛВ. Поскольку уровень общей стоимости работ зависит от многих факторов, но прежде всего определяется правильностью выбора первоначальной идеи – замысла, то остановимся на этой стадии более детально.

В данном контексте химику-синтетику, работающему в рамках стратегии «биоактивность - структура», важно знать прежде всего для лечения какого наиболее опасного на данный момент заболевания врачами ищут лекарство (это формирует так называемый «внешний заказ»). Химик должен быть в курсе того, чем обосновывает эпидемиолог актуальность создания нового лекарства. Например, в случае появления некой заразной болезни, эпидемиолог выявляет возбудителя этого заболевания – патогенную бактерию, гриб или вирус (напомним, что в организме даже здорового человека обитают около 10 тысяч различных видов микроорганизмов, составляющих его микробиом). Химик должен узнать у биохимика, какие белки-ферменты или белки-рецепторы найденного патогена следует дезактивировать, чтобы остановить размножение болезнетворных микроорганизмов или даже их полностью ликвидировать. Наконец, химик должен получить информацию от энзимолога, которая свидетельствует о наличии активного центра фермента (АЦФ) или рецептора (АЦР), уточняет природу и строение молекулярных субстратов-лигандов для данных ферментов и рецепторов и указывает на требования к структуре потенциальных природных и синтетических ингибиторов-лигандов этих ферментов и рецепторов (целевых белковых формирований).



**Рисунок 1. Обобщенная схема создания нового лекарственного вещества.**

Естественно, что для надёжного получения указанных в начале данных необходимо проведение рентгеноструктурного анализа ферментов (включая рецепторы), субстратов-лигандов и механизмов действия. Это стало доступно исключительно лишь с конца 20 века – причём как массово доступная информация».

Соответственно, до этого времени массива накопленных данных было недостаточно для проведения эффективного молекулярного компьютерного дизайна потенциального ЛВ, поэтому существовал в основном умозрительный и эмпирический дизайн по методу «проб и ошибок». Такой более или менее случайный подход в открытии новых ЛВ (особенно в 1950-1960-х годах) затем стал постепенно сменяться более целевым (фокусированным) подходом. Он уже имел элементы рационального молекулярного дизайна, оставаясь широко применяемым до конца 20-го века. Напомним, что по современным представлениям **молекулярным дизайном** называют (с подачи Ж.-М. Лена) молекулярное конструирование синтетических потенциально биологически активных веществ и активных центров рецепторной биомолекулы путём правильного, рационального (на основе главным образом данных РСА) компьютерного манипулирования их геометрическими и энергетическими параметрами. Это осуществляется с целью добиться высокой степени

комплементарности между рецептором и ПЛВ и обеспечить высокую биоактивность последнего.

Обладая указанными выше знаниями и знаниями научной литературы по органической и фармацевтической химии, химик-синтетик выбирает соответствующую лекарственно-подобную структуру потенциального препарата и производит анализ информации о наличии химических элементов, групп атомов, функциональных группировок, о типах связей между ними, электронном строении, пространственном расположении групп атомов. Уместно отметить, что статистический анализ имеющегося арсенала ЛВ, а также научных и патентных данных по биологической активности лекарственно-подобных и так называемых привилегированных структур, свидетельствует о том, что строение подобных веществ обычно включает около 30 базовых циклов (скаффолдов), каждый из которых имеет в среднем от 3 до 5 заместителей 20 типов. Учёт совокупности этих данных при экспериментальном дизайне ПЛВ может более надёжно сообщить конструируемому целевому веществу потенциал ожидаемого вида и уровня биологической активности. Таким образом, следует иметь в виду, что в возникновении идеи-замысла и умозрительной разработке подобных целевых структур так или иначе участвуют также специалисты по медицине, биологии и биохимии. Затем к формированию замысла приступают специалисты органической, фармацевтической, медицинской и биоорганической химии, а также химии природных и биологически активных соединений.

Осуществлением второй стадии (*блок 2* Рисунок 1) занимаются химики-синтетики и специалисты по фармацевтической и медицинской химии. Эта стадия заключается в лабораторной разработке путей и методов синтеза целевого вещества и его близких структурных аналогов, их отборе по 1) устойчивости, 2) простоте получения, 3) выходу и селективности их получения, 4) токсичности, 5) растворимости и 6) технико-экономическим показателям. При этом синтезируют большой набор веществ (например, потенциальных ингибиторов ферментов патогенных бактерий), делая уже на данном этапе предварительную оценку доступности, стоимости и токсичности исходных и промежуточных реагентов. Синтезированные соединения затем передаются биологам на биоскрининг в эксперименте.

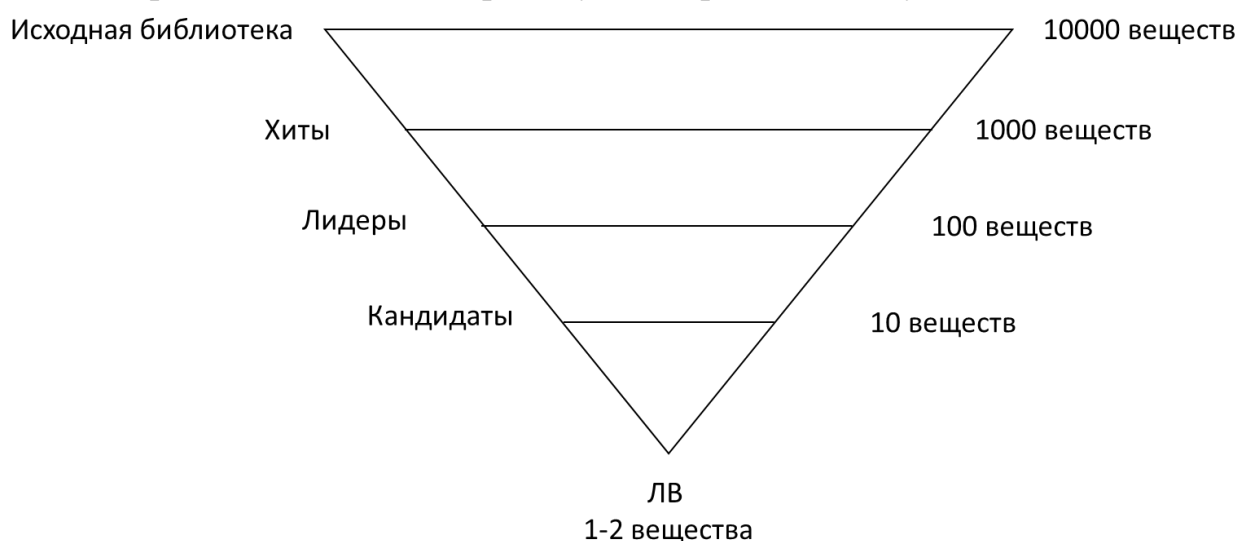
### ***1.2. Первичные этапы биотестирования. Требования к молекулам-лидерам.***

Биотестирование – главное сито, на котором в эксперименте отбраковывается основная масса неактивных и малоактивных синтезированных соединений, и остаются для продолжения углубленных испытаний наиболее перспективные вещества, обладающие высокой биологической активностью (*третья и четвёртая ступени; блоки 3 и 4* Рисунок 1).

Самый начальный этап поиска нового ЛВ называют первичным биологическим скринингом (просеиванием). Его проводят в биологических лабораториях в стандартных условиях на отдельных белках-ферментах или живых клетках, микроорганизмах, на кусочках живых тканей (*in vitro*).

*Биохимические тесты на ферментах* проводят в пробирках, в луночных планшетах и чашках Петри, которые содержат тестируемый фермент, к которому добавляют синтезированное вещество. Чаще всего это тест на ингибирование активности эндогенной белковой молекулы. Выбирают активные вещества по принципу «работает/не работает» и создают набор («библиотеку») соединений, выделившихся своей активностью («работает»), у которых константа ингибирования биомишени достаточно высока (или концентрация, при которой активность биомишени снижается на 50%, достаточно низка). Выделившихся своей высокой активностью вещества называют «хитами».

*Клеточные тесты* осуществляют на культурах живых клеток. Это тестирование более сложное, т.к. ПЛВ должно взаимодействовать с рецептором на поверхности клеточной липофильной мембраны, проникнуть через неё внутрь клетки и взаимодействовать там как с внутриклеточной мишенью (ферментами или рецепторами клеточного ядра); при этом взаимодействие также может иметь место и с нецелевыми молекулами. Активность ЛВ в данном случае может означать, что оно может оказывать лечебное действие при переносе через кровь, но остаётся вопрос о его биодоступности при оральном приёме или о скорости его прохождении через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). После первичных скринингов исходной библиотеки веществ (скажем, 10000 веществ) выбирают проявившие желаемый вид биоактивности вещества, называемые «хитами». Их может остаться всего одна тысяча можно условно представить в виде опрокинутой пирамиды (Рисунок 2).



**Рисунок 2. Напряжённость отбора веществ**

Из них затем формируют группу «лидеров» (hit to lead optimization). Этим термином обозначают вещества, имеющие высокую биологическую активность в желаемой области и приемлемые фармакологические

свойства. Процедура выбора лидерных структур из «хитов» включает их повторное биотестирование с целью избежания ошибки.

Требования к лидерным структурам. Для причисления вещества к лидерным оно должно отвечать ряду критериев. Лидеры как потенциальные ЛВ должны:

1) проявлять желаемую и возможно высокую биоактивность (основной критерий отбора);

2) обладать биоактивностью в микро- и особенно в наномолярных концентрациях;

3) иметь хорошие фармакокинетические характеристики по показателям АРМЭТ. Прежде всего лидерная молекула должна быть орально доступна (чаще всего для приёма в виде таблеток). Для чего она не должна быть слишком полярна, так как это мешает её хорошей адсорбции в ЖКТ. Кроме того, она не должна быть слишком липофильна, так как при высокой её липофильности происходит слишком быстрый транспорт лекарства в печень. В целом лидерная структура должна быть сбалансирована по липофильности/гидрофильности и должна быстро преодолевать защитный барьер из ферментов-цитохромов (СYP – Р450), т. к. эта система защищает организм от большинства ксенобиотиков, быстро метаболизируя их окислением до производных, которые более водорастворимы и легче выводятся из организма.

4) ПЛВ должны иметь низкую острую токсичность (её выражают в виде ЛД<sub>50</sub>, что означает летальную (смертельную) дозу для 50% опытных животных, рассчитываемую в миллиграммах лекарственного вещества на кг живого веса). ПЛВ должны иметь низкую субхроническую токсичность в условиях длительного (несколько месяцев) введения лекарственного вещества в терапевтических дозах. Эти дозы обычно в 20 и более раз должны быть ниже значений LD<sub>50</sub>. При испытаниях на субхроническую токсичность наблюдают побочные эффекты и патологические изменения всех систем организма. Изучается прежде всего возможность тератогенности ПЛВ, его влияние на репродуктивную способность воспроизводить потомство, возможность подавления иммунной системы, эмбриотоксичность (отравление плода) данного вещества, его мутагенность (изменение наследственных функций), канцерогенность, аллергенность, а также другие вредные побочные действия – головокружение, тошнота, рвота. ПЛВ не должно содержать токсофорные группы атомов и давать токсичные метаболиты. Тем не менее, следует заметить, что иногда в медицине пользуются контролируемой токсичностью, например, при лечении алкоголизма. Так, дисульфиды обладает необычной дитиокарбаматной группой, которая при попадании этого вещества в кровь больного блокирует метаболическое окисление этанола в альдегид. В результате употребление пациентом даже малейших доз алкоголя приводит его в чрезвычайно болезненное состояние.

5) ПЛВ должны иметь хорошие фармакодинамические характеристики, т.е. требуемую селективность и прочность связывания с

биомишенью; структура лидера должна соответствовать активному центру целевого белка (АЦ), чтобы, как ключ в замок, входить в него и неконкурентно (предпочтительно обратимо) блокировать доступ к нему нативного субстрата (принцип ингибирования). Подобные свойства сообщаются лидерной молекуле методами химической модификации (оптимизации) её структуры – введением: 5а) заряженных и полярных группировок; 5б) доноров и акцепторов водородных связей; 5в) π-электронных систем для стэкинг-взаимодействия; 5г) объёмных групп атомов. При эмпирическом дизайне лидера обычно стремятся, чтобы ПЛВ было структурно похоже на природный субстрат данной мишени. Однако при этом оно должно содержать и заметное отличие от него из-за опасности быстрого метаболизма конструируемого ЛВ ферментом. Специфичность связывания лидера с определённой биомишенью – важная характеристика создаваемого ЛВ. Её отсутствие указывает на риск проявления ПЛВ массы побочных эффектов (аллергий, головокружений, тошноты, рвоты, выпадения волос, потеря слуха болезненных привыканий и др.) из-за возможности взаимодействия такого ПЛВ со многими и разнообразными белками (типичный пример – мощные противораковые средства группы цисплатина). С другой стороны, в настоящее время развивается направление по дизайну неспецифических ПЛВ, которые могут оказывать лечебное действие разной силы сразу по двум-трем сопутствующим заболеваниям у одного пациента (мультицелевые ЛВ).

6) ПЛВ должны обладать простотой синтеза и высокой стабильностью;

7) быть новыми соединениями, что является важным в отношении патентуемости.

8) лидеры должны быть разделяемы на индивидуальные энантиомеры или диастереомеры в случае наличия у проектируемого ЛВ хиральности.

### ***1.3. Испытания на животных***

Отобранные на предшествующих испытаниях вещества-лидеры поступают на стадию их более углубленного тестирования – испытания на животных (*in vivo*). Эти более дорогие тесты осуществляют на млекопитающих – мышах, крысах, кроликах, собаках, морских свинках и обезьянах. Изучаются при этом: 1) эффективность потенциального ЛВ (ПЛВ); 2) его острая и хроническая токсичность (в целом изучение длится до 6-7 лет); 3) побочные эффекты; 4) оральная биодоступность лидеров и их модифицированных аналогов; 5) их соответствие другим фармакокинетическим и фармакодинамическим характеристикам и требованиям; 6) наиболее подходящие формы применения; 7) условия хранения. При этом между фармакологом и химиком устанавливается тесная интерактивная связь, которая способствует быстрейшему проведению химической модификации и созданию наиболее эффективных

аналогов-лидеров. По достижении удовлетворительных результатов, отвечающим основным требованиям, формируется группа «кандидатов» в ЛВ, которые передаются на завершающий этап экспериментального тестирования – углублённые испытания на людях.

#### ***1.4. Клинические испытания на людях***

Данный этап тестирования (*блок 4* схемы) – наиболее ответственная стадия. Она состоит из трёх фаз. Фаза I заключается в проверке безопасности ПЛВ для здорового взрослого человека. Эта стадия не связана с той болезнью, которую предназначено лечить тестируемое ПЛВ. Она продолжается 1-2 года и на ней отсев ПЛВ составляет до 30%.

Фаза II имеет цель установить на нескольких сотнях больных определённой болезнью (с различными стадиями заболевания): а) успешность её лечения данным ПЛВ; б) необходимые терапевтические дозы; в) наличие побочных эффектов. Изучение продолжается 2 года при дальнейшем отсеве ПЛВ до 70%.

Фаза III тестирования предназначена для изучения и уточнения на нескольких тысячах пациентов:

- а) доз и режимов приёма ЛВ;
- б) побочных эффектов;
- в) совместимости данного ПЛВ с другими ЛВ;
- г) этнической, сезонной, возрастной и половой зависимости уровня проявления лечебного действия ПЛВ.

Совсем недавно возникла наука фармакогенетика – часть фармакологии, изучающая зависимость лечебных и токсических эффектов одного и того же лекарственного вещества не только от пола и возраста больных, но и от их генетических особенностей и, в частности, от их этнической принадлежности. Продолжается это тестирование 1-2 года при 75% отсеве ПЛВ.

Отсевы потенциальных лекарственных веществ основаны на плохих параметрах их фармакокинетического поведения в организме больного – на их неудовлетворительной абсорбции, распределении, метаболизме, элиминировании из организма и токсичности. Все ПЛВ должны соответствовать основным принципам АРМЭТ (по-английски это сокращение пишется «ADMET» и расшифровывается следующим образом: Adsorption – Distribution – Metabolism – Elimination – Toxicity).

Третий и четвертый исследовательские этапы-блоки общей схемы (**Рисунок 1**) наиболее длительны, и в них принимают участие фармакологи, биологи, токсикологи и медики.

#### ***1.5. Регистрация и технология производства нового лекарственного препарата***

В случае положительных клинических испытаний вся документация о потенциальном лекарственном веществе (ПЛВ) поступает

на рассмотрение в Фармацевтический Комитет государства, где законодательно утверждается, т. е. проходит государственную регистрацию (*блок 5*) и получает официальный статус лекарственного вещества (ЛВ).

После этого наступает этап разработки технологии промышленного синтеза нового ЛВ – шестая и седьмая стадии (*блоки 6 и 7* общей схемы), которые включают разработку технологии пилотного, полужаводского и, наконец, промышленного масштабирования производства нового ЛВ. Эти стадии являются самыми дорогостоящими, трудоемкими и энергоемкими. Их осуществлением занимаются технологи, инженеры, химики, физикохимики и экономисты.

В настоящее время в общую схему включают также стадию (*блок 8*), на которой производимая субстанция проходит государственную валидацию и сертификацию, где ей придается статус полного соответствия требованиям к лекарственному препарату и данное лекарство, таким образом, получает разрешение на широкое применение в медицине. Под термином «валидация» ЛВ подразумевается официальная оценка соответствия утвержденным нормативам всех этапов производства и контроля ЛВ (начиная от исходного сырья и полупродуктов и кончая самой лекарственной субстанцией и готовой лекарственной формой). Сертификация лекарственной субстанции (ЛВ) и процесса его производства представляет собой процедуру получения производителем и/или распространителем ЛВ письменного свидетельства (гарантии) от независимой третьей стороны. Такое свидетельство выдается органами, специально аккредитованными министерством здравоохранения. В этом документе указывается, что данное ЛВ (субстанция, препарат) по качеству и безопасности соответствует требованиям официальной спецификации, а используемый процесс производства этого препарата отвечает международным правилам «надлежащей производственной практики» (Good Manufacturing Practice – GMP). Аналогичной проверке подвергается и этап лабораторного синтеза данного ЛВ (подтверждение «надлежащей лабораторной практики» – GLP). К современным лекарственным веществам предъявляют многочисленные жесткие требования и поэтому валидация и сертификация могут занять по времени от полугода до трех лет.

На девятой стадии (*блок 9*) изучаются и создаются приемлемые формы применения препарата – порошки, растворы, мази, капсулы, таблетки, аппликаторы и т.п. После достижения соответствия требованиям международным стандартам GMP лекарственный препарат поступает в продажу (*блок 10*). Эффективность рекламы полученного таким образом препарата, потребности рынка в нем, эффективность лечения пациентов, объемы и сроки доставки и продажи определяют длительность существования данного лекарственного вещества на фармацевтическом рынке.



Расходы по осуществлению работ в рамках лабораторного синтеза (см. первые два блока, указанные на **Рисунок 1**) составляют от 10 до 15% от общей стоимости создания нового лекарства. Затраты на скрининг и другие доклинические биотесты (третий блок схемы, представленной на **Рисунок 1**) достигают 30% общей себестоимости. Издержки по клиническим испытаниям составляют 10% стоимости. Суммарные расходы на разработку промышленной технологии производства лекарственной субстанции и её готовых форм (включая регистрацию, валидацию и сертификацию) колеблются от 25 до 40% от общей стоимости. Оплата рекламирования нового лекарства (продвижение его на фармацевтический рынок) может достигать 1025%. Суммарные затраты на создание нового препарата может колебаться в настоящее время от 0.3 до 1.0 миллиарда долларов. По некоторым данным только три из десяти ведущих лекарственных препаратов покрывают расходы на их создание. Тем не менее, в целом химико-фармацевтическая промышленность считается в настоящее время одной из самых привлекательных по прибыльности. Действительно в США каждый доллар инвестиций в производство лекарственного вещества приносит десять долларов прибыли, что привело даже к появлению нового термина «фармакоэкономика». Отметим, что в 2007 году объем мирового фармацевтического рынка превысил 500 млрд. долларов (на Россию приходилось около 15 млрд. долларов).

Таким образом, к началу третьего тысячелетия нашей эры накоплен большой арсенал лекарственных субстанций, как природного происхождения, так и синтетических. Достаточно указать, что к концу первого десятилетия 21 века в этом арсенале насчитывается от 4000 до 6000 лекарственных субстанций и около 15000 препаративных форм и каждый год наблюдается стабильный прирост числа новых структур на 30-40 веществ. В России на 2012 г. зарегистрировано более 12 тысяч препаратов, из них 50% – отечественные, 10% – оригинальные, а остальные – дженерики – препараты, которые после истечения срока действия на них патентов может производить любая фирма в любой стране.

### ***1.6. Методы анализа органических соединений***

Для выделения, очистки, анализа и идентификации органических соединений используются химические и физические методы. Конечным результатом данных исследований является установление структуры органических веществ. Для достижения этой цели каждое соединение необходимо в первую очередь выделить из реакционной смеси или из смеси природных продуктов и очистить его, т.е. получить в химически чистом состоянии.

Выделение и очистку органических веществ существуют традиционные химические классическими методами, такими как: перекристаллизация, возгонка, различные виды перегонки, экстракция.

Наиболее перспективными в современной органической химии большое значение имеют физико-химические методы: хроматографические и спектральные. Особенно они важны при исследовании структуры сложных органических молекул.

Несмотря на широкое применение в анализе органических веществ физико-химических методов, химические методы не только утрачивают свое значение, но и продолжают развиваться. Причинами такой «жизнеспособности» химических методов анализа являются: 1) в некоторых случаях химические методы более применимы, чем инструментальные. Возможность широкого выбора реакций придает химическому анализу достаточную гибкость. Для анализа следов веществ также предпочтительны химические методы с использованием специфической для исследуемых веществ колориметрической реакции; 2) для анализа инструментальными методами, как правило, необходимы калибровочные кривые или числовые данные калибрования. Для калибрования нужны чистые образцы исследуемых веществ. Для химических методов подобная калибровка не требуется; 3) при проведении химического анализа не требуется дорогостоящего оборудования, применяются чаще такие стандартные приборы, как весы, бюретки, пипетки, мерные колбы, стаканы.

Общим принципом химических методов является применение характерных реакций для групп, подлежащих определению. Реакция должна быть возможно более специфичной, достаточно быстрой и в ней должны участвовать реагент или продукт реакции, легко поддающиеся определению. Наибольшее применение находят реакции, в которых используются или образуются следующие реагенты или продукты: кислоты, основания, окислители, восстановители, газы, вода, ионы металлов, малорастворимые, окрашенные или комплексные соединения.

В различные времена было предпринято много попыток разработать систематические аналитические методики для идентификации неизвестных органических веществ, подобно тому как это было сделано для группового и элементного анализа неорганических соединений. Однако вследствие фундаментальных различий в природе органических и неорганических соединений такая универсальная система не была разработана. Наиболее известная методика предложена Шрайнером, Фьюзоном, Кертином, суть которой состоит в осуществлении следующих этапов:

- 1) предварительные пробы;
  - 2) определение физических констант;
  - 3) определение элементов в соединении;
  - 4) определение функциональных групп химическими и спектральными методами;
  - 5) сопоставление результатов анализов с литературными данными;
- получение и исследование производных органического соединения.

Выделенное и очищенное органическое соединение идентифицируют путем сравнения его физических констант с аналогичными константами известных веществ. К таким константам относятся температуры кипения и плавления, показатель преломления, молекулярная рефракция, удельное вращение, хроматографические и спектральные характеристики. Одновременно они служат и для оценки степени чистоты соединения.

Для исследуемых соединений определяют также молекулярную формулу, указывающую на природу и количество присутствующих в молекуле атомов. Для этого сначала проводят качественный и количественный анализ. С помощью качественных реакций устанавливают, какие элементы входят в состав анализируемого соединения. Затем определяют процентное содержание углерода, водорода, азота, серы, галогенов и других элементов. Количество кислорода обычно определяется косвенным путем по разности.

На основании данных количественного анализа рассчитывается эмпирическая формула, которая показывает лишь соотношение атомов в молекуле. Для установления истинной молекулярной формулы необходимо кроме того знать молекулярную массу соединения, которую определяют криоскопическим (по понижению температуры замерзания), эбуллиоскопическим (по повышению температуры кипения), осмометрическим (по изменению осмотического давления) методами или с помощью масс-спектропии.

### ***1.7. Категории чистоты вещества: определение температуры кипения и плавления***

На практике **температурой плавления** твердых органических соединений является температура, при которой кристаллы твердого вещества переходят в жидкость (расплав). Теоретически температура плавления совпадает с температурой затвердевания, однако на значение последнего параметра часто влияет переохлаждение. Поэтому температура затвердевания может быть на несколько градусов ниже температуры плавления.

Чистое вещество плавится в узком температурном интервале. Наличие в веществе примесей понижает температуру плавления и увеличивается температурный интервал.

В препаративной органической химии используется достаточно старый метод термометр – капилляр.

Определяют температуру плавления в стеклянном капилляре с внутренним диаметром 1 мм и высотой 40 – 50 мм; один конец капилляра запаивают. Стекло капилляра должно быть химически устойчивым, так как обычное стекло, содержащее много натрия, при нагревании может выделять загрязнения, которые понижают температуру плавления.

Капилляр набивают измельченным твердым веществом так, чтобы на дне капилляра образовался компактный слой толщиной 0,2 – 0,5 см.

Прибор для определения температуры плавления состоит из длинногорлой круглодонной колбы и вставленной в нее широкой пробирки, куда помещается термометр с капилляром.

Для предварительных измерений используют термометр с большим интервалом температур (20 – 250<sup>0</sup>С). При точных измерениях, когда известно приблизительное значение температуры плавления, рекомендуется использовать термометр с более узким интервалом температур с делениями, позволяющими производить отсчет температуры с точностью до 0,5<sup>0</sup>с и оценкой до 0,1<sup>0</sup>С. Можно посоветовать откалибровать термометр по четырем или пяти стандартным веществам с известными температурами плавления (например, салициловая кислота, ванилин, нафталин, янтарная кислота, бензойная кислота, мочеви́на, ацетанилид, антрацен).

В длинногорлую круглодонную колбу наливают серную кислоту или силиконовое масло, или глицерин. Приборы, содержащие эти жидкости, можно нагревать не выше 250<sup>0</sup>С. Капилляр закрепляют на термометре резиновым кольцом или проволокой. Конец капилляра должен быть на уровне или немного выше шарика термометра. Затем закрепляют термометр с капилляром в горле пробирки на пробке с вырезом. Внутреннее пространство колбы должно сообщаться с атмосферой.

Прибор нагревают так, чтобы повышение температуры происходило на 5 - 10<sup>0</sup>С в минуту, а вблизи температуры плавления на 1 – 2<sup>0</sup>С в минуту.

Температурой плавления данного вещества считается температурный интервал с момента появления жидкой фазы до полного расплавления вещества. Чем вещество чище, тем этот интервал уже (для чистых веществ он составляет 0,1 – 0,5<sup>0</sup>С).

Капилляр с веществом, разлагающимся при плавлении, следует вносить в уже нагретый прибор за 1- 15<sup>0</sup>С до температуры плавления вещества.

**Температура кипения** является важнейшей константой жидких веществ. Кроме того, она может служить характеристикой и для твердых тел. Вещества, способные к сублимации, характеризуются температурой сублимации при атмосферном давлении.

Температура кипения – это температура, при которой давление паров жидкости равно внешнему давлению.

Для определения температуры кипения жидкость перегоняют в соответствующем приборе для перегонки. Чем чище вещество, тем меньше интервал температур от начала и до конца перегонки. Индивидуальное вещество выкипает в узком интервале температур (0,5 – 1<sup>0</sup>С). При определении температуры кипения необходимо учитывать давление, т.к. отклонение от нормального давления влияет на величину температуры кипения. Если температуру кипения определяют при давлении, отличном

от атмосферного, то его указывают в скобках после температуры кипения. Температуры кипения при пониженном давлении определяют главным образом для веществ, которые при нагревании разлагаются, прежде чем будет достигнута температура кипения.

Кроме давления, температура кипения зависит от перегрева жидкости, при этом наблюдается кипение «с толчками». Оно приводит не только к ошибочной температуре кипения, но и к выплескиванию жидкости из сосуда или к перебросу жидкости в холодильник (во время перегонки). Перегрев жидкости не происходит в присутствии газов, растворенных в жидкости, или в присутствии небольших пористых твердых частиц (пемза, фарфор, стеклянные капилляры, запаянные с одного конца).

При перегонке высококипящего вещества иногда требуется вводить поправку к найденной величине температуры кипения. Если при перегонке не весь ртутный столбик термометра находится в парах жидкости, а выступает наружу и постоянно охлаждается внешним воздухом, то это приводит к заниженным результатам. Ошибка может исчисляться в 6 – 10<sup>0</sup>С при 250<sup>0</sup>С. Ошибка может быть исправлена «поправкой на выступающий столбик ртути». Поправка к найденной опытным путем температуре кипения вычисляется по формуле:

$$\Delta t = kn \cdot (t_1 - t_2)$$

k – коэффициент линейного расширения ртути в стекле (0,000158 от 0 до 150<sup>0</sup>С);

n – длина выступающего столбика ртути, не нагреваемого парами жидкости;

t<sub>1</sub> – температура, показываемая термометром; t<sub>2</sub> – средняя температура выступающего столбика. Температура t<sub>2</sub> определяется вспомогательным термометром, шарик которого плотно прилегает к основному термометру посередине выступающего столбика.

Температуру кипения малого количества вещества (0,2 – 1 мл) удобно определять по способу Сиволобова. На дно широкого тонкостенного капилляра диаметром

3 – 4 мм помещают каплю исследуемой жидкости. Затем в эту жидкость погружают другой, очень тонкий капилляр, заплавленный сверху. Капилляр прикрепляют к термометру и нагревают в приборе для определения температуры плавления. Вначале из внутреннего капилляра выделяются редкие пузырьки воздуха. Когда будет достигнута температура кипения, образуется цепочка пузырьков, поднимающаяся равномерной струей.

Данные по температурам кипения важны для идентификации. Они приведены в справочниках для большинства органических соединений и даже для твердых веществ.

### ***1.8. Категории чистоты вещества: плотность, показатель преломления; молекулярная рефракция, удельное вращение***

**Плотность** – одна из констант, характеризующая степень чистоты органического соединения. Величина ее сильно зависит от температуры. Обычно определяют относительную плотность чаще всего по воде, плотность которой при 4<sup>0</sup>С почти равна единице (0,99997г/см<sup>3</sup>).

Определение плотности вещества проводят в пикнометре емкостью

1 – 2 мл. Пикнометр предварительно моют ацетоном, спиртом, эфиром и высушивают в сушильном шкафу. Сухой пикнометр взвешивают на аналитических весах при комнатной температуре. Затем определяют «водное число пикнометра», которое является постоянным для каждого пикнометра и соответствует массе воды в объеме пикнометра при 20<sup>0</sup>С, приведенной к массе воды при 4<sup>0</sup>С. Предварительно дистиллированную воду кипятят в небольшом стаканчике в течение 10 – 15 мин для удаления растворенного в ней воздуха. Затем заполняют ею пикнометр выше метки на шейке пикнометра с помощью резиновой груши, снабженной трубкой с капилляром. Наполненный пикнометр закрепляют в держателе и помещают в термостатированный сосуд с водой (стакан с водой) на 10мин при 20<sup>0</sup>С так, чтобы уровень жидкости в шейке пикнометра был ниже уровня воды в сосуде. Затем, не вынимая пикнометр из стакана, доводят уровень воды в шейке пикнометра до метки, отбирая лишнюю воду с помощью капилляра. Затем пробку и шейку пикнометра тщательно вытирают снаружи и внутри. Пикнометр вынимают из стакана, закрыв пробкой, тщательно вытирают снаружи и оставляют при комнатной температуре на 15 – 20мин, а затем взвешивают на аналитических весах. Полученную массу воды в объеме пикнометра при 20<sup>0</sup>С приводят к массе воды при 4<sup>0</sup>С. Находят массу воды в объеме пикнометра (х) при 4<sup>0</sup>С. 0,99823 – плотность воды при 20<sup>0</sup>С:

$$\frac{\text{масса воды в объеме пикнометра при } 20^0\text{С}}{\text{масса воды в объеме пикнометра при } 4^0\text{С}(x)} = \frac{0,99823}{1}$$

где

$$\frac{\text{масса 1 мл воды при } 20^0\text{С}}{\text{масса 1 мл воды при } 4^0\text{С}} = \frac{0,99823}{1}$$

Полученная величина х является «водным числом» пикнометра (В). Эта константа и масса пикнометра могут быть определены заранее и приложены к данному пикнометру.

Для определения плотности исследуемой жидкости взвешивают сухой чистый пикнометр и сверяют массу его с массой, определенной при вычислении «водного константы». Затем пикнометр наполняют исследуемой жидкостью и производят такие же измерения, как описано

выше для воды. Отношение массы вещества в объеме данного пикнометра к величине водной константы соответствует плотности данного вещества:

$$\rho_4^{20} = \frac{m - m_n}{V}$$

V – водное число пикнометра;

m – масса пикнометра с веществом;

m<sub>n</sub> – масса пустого пикнометра.

В лабораторной практике плотность вещества часто измеряют с помощью набора ареометров.

**Показатель преломления** относится к числу весьма важных физических констант, характерных для индивидуального вещества. Величина его изменяется с изменением температуры и длины волны, при которых проводится измерение. Как правило, значение показателя преломления находят при длине волны, соответствующей длине волны желтой линии натрия D (λ=589,3нм).

Показатель преломления обозначают символом

$$n_D^{20}$$

и показывает, что показатель преломления определен для линии D при 20<sup>0</sup>C.

Показатель преломления определяют с помощью рефрактометра. Во время измерения следует поддерживать постоянную температуру. Для жидких органических веществ показатель преломления колеблется от 1,3 до 1,8. Обычно на лабораторном рефрактометре показатель преломления определяют до четвертого знака после запятой.

С изменением концентрации раствора величина показателя преломления меняется. С ростом температуры величина показателя преломления падает.

Значение показателя преломления и плотности используют для нахождения величины молекулярной рефракции MR<sub>D</sub>, являющейся характеристикой вещества:

$$MR_D = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{M_r}{\rho}$$

M<sub>r</sub> - относительная молекулярная масса вещества;

n – показатель преломления;

ρ – плотность вещества

**Молекулярная рефракция** имеет аддитивные свойства, т.е. молекулярная рефракция молекулы может быть получена суммированием рефракций составных частей молекулы. Такими составными частями являются химические связи и совокупности связей и атомов. Эти рефракции вычислены на основе исследований многих органических соединений и могут быть найдены в справочниках. Например, R(CH<sub>4</sub>) = 4R<sub>C-H</sub>; R(CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>) = 3R<sub>C-H</sub> + R<sub>C-N</sub> + R<sub>NO2</sub>

Явление преломления света связано с поляризуемостью электронной системы молекул. Под влиянием электромагнитного поля света происходит поляризация молекул, в основном их электронных систем. Чем подвижнее электронная система молекулы, тем больше коэффициент преломления света и молекулярная рефракция.

Для изучаемого соединения экспериментально определяют молекулярную рефракцию и сравнивают с рефракцией, полученной суммированием рефракцией связей по предполагаемой структурной формуле. Если результаты совпадают, то можно считать структуру доказанной, если нет, то надо искать другую структуру. В некоторых случаях наблюдают сильное увеличение молекулярной рефракции по сравнению с ожидаемой (экзальтация рефракции). Это характерно для сопряженных систем.

Метод исследования хиральных молекул – поляриметрия, в основе которого лежит способность хиральных молекул отклонять плоскость поляризованного света при его прохождении через раствор оптически активного соединения. Угол вращения плоскости поляризованного света  $\alpha$  является характеристической величиной для данного вещества и зависит не только от природы вещества, но и от длины волны поляризованного света, температуры, природы растворителя, концентрации раствора и толщины слоя, через который проходит луч света. Для возможности сравнения получаемых экспериментальных данных рассчитывают **удельного вращения**  $[\alpha]$ , т.е. величину вращения раствора с концентрацией 1 г в 1 мл при толщине слоя раствора 1 дм. Расчет производят по формуле

$$[\alpha] = \alpha / l \cdot c$$

$c$  – концентрация раствора, г/мл;

$l$  – длина поляриметрической трубки, дм;

$\alpha$  – наблюдаемая величина угла вращения исследуемого раствора.

При записи удельного вращения в виде подстрочного индекса указывается длина волны поляризованного света (обычно D – линия натрия с длиной волны 589нм) и в виде надстрочного индекса температура, при которой проводилось определение, например

$$[\alpha]_D^{20}$$

Удельное вращение определяют с помощью поляриметра. Монохроматический свет поляризуют и пропускают через кювету с раствором образца. Величина угла, на который надо повернуть анализатор, дает угол вращения, а направление вращения указывает на право- или левовращающую природу образца.

Для характеристики оптически активного вещества определяют также молярное вращение  $[M]$ :

$$[M] = M \cdot [\alpha] / 100, \quad \text{где } M \text{ – молярная масса вещества}$$

Используя величины молярного вращения, можно сравнивать вращение веществ с различной молярной массой.



Зная удельное вращение, можно определить концентрацию раствора.

### **1.9. Основные группы и фрагменты в структурах известных лекарств**

Химическое и пространственное строение вещества определяет наличие у него биоактивности. Её вид, уровень (эффективность действия), побочные эффекты, фармакокинетические и фармакодинамические свойства могут в значительной степени зависеть от разнообразных структурных факторов. Анализ накопленных к настоящему времени данных о результатах экспериментального биоскрининга огромного числа веществ, их применении в медицине и их строении позволил выделить ряд структурных мотивов, наиболее часто встречающихся в известных ЛВ алифатического, алициклического, ароматического и гетероциклического рядов. Совокупность указанных фрагментов обеспечивают конечной молекулярной структуре ПЛВ как ожидаемое лекарствовоподобное действие, так и набор необходимых фармакокинетических и фармакодинамических свойств.

В алифатической группе используемого ныне арсенала ЛВ часто используются следующие структурные мотивы: **1)** алкильные: *n*- и изопропильный, *n*- и изобутильный, *трет*-бутильный; **2)** алкиламинные: моно- и диэтиламинный, диметиламинный, моноэтаноламинный; **3)** амидные: ацетиламидный,

карбамоилметильный; **4)** кетонный: этилкарбонилметильный; **5)** кислотный: гидроксикарбонилметильный; **6)** эфирный: этилоксидный; **7)** сложноэфирные: О-ацетильный, метил- и этилкарбоксилатный, нитратный. Кроме того в подобных ЛВ могут присутствовать в качестве заместителей атомы галогенов, ОН-группы, нитрильные и С=С-группы, трифторметильные группы и др.

В группе ЛВ циклоалифатического ряда базовыми структурными мотивами являются:

- 1) циклопентанилиден;
- 2) циклогексильный и адамантильный;
- 3) пергидроциклопентенофенантрен и его дидегидро- и тетрадегидропроизводные.

В качестве заместителей часто присутствуют бром, метильные и метиленовые группы, гидрокси- и оксогруппы, гидроксиметилкарбонильные группы.

В группу ароматических структурных мотивов входят:

- 1) фенильный, дифенильный и нафтильный;
- 2) дифенилметильный, дифенилоксидный и дифениламинный; **3)** 1,1-дифенилэтенильный и 1,2-дифенилэтановый.

Указанные типы скелетов называют «привилегированными» структурами, так как они очень являются предпочтительными для определённого пространства многих биомишений и часто используются в качестве основы в дизайне многих ПЛВ. В качестве активных

заместителей в этих структурных мотивах могут выступать атомы галогенов, алкильные и трифторметильные группы, амино-, аминоалкильные и амидные группы, ацетильные, гидроксиметильные, гидроксильные, карбоксильные, эфирные и сложноэфирные группы, сульфамойльные группы.

В качестве гетероциклических привилегированных структурмотивов наиболее часто в ЛВ используются следующие фрагментные остовы:

- 1) азиридиновые и азетиридиновые;
- 2) фурановый;
- 3) пирролидиновый и индольный;
- 4) имидазольный;
- 5) пиридиновый, 4-фенилдигидропиридиновый и 4-фенилпиперидиновый;
- 6) бензопирановый, хинолиновый и изохинолиновый;
- 7) морфолиновый, 2,4-диоксо- и 2,4,6-триоксопиримидиновые, пиримидиновый;
- 8) бензо- и дибензотиазиновые;
- 9) пуриновый и птеридиновый;
- 10) дибензо[b,f]азепиновый и бензо[f]-1,4-дiazепиновый;
- 11) морфиновый, морфинановый и бензоморфановый.

В ЛВ, которые имеют гетероциклические остовы, встречаются все заместители, указанные выше для других групп ЛВ. Отметим, что половина из всех действующих ЛВ составлена из примерно 30 лекарствовподобных структур (или скаффолдов), в которых имеются в среднем по четыре заместителя.

### ***1.10. Принципы химической модификации для моделирования их биологической активности***

Компьютерное моделирование позволяет с достаточно высокой точностью предсказывать активность молекул на основе информации об их строении, так как именно структура химического соединения во многом определяет его свойства. Этот метод может эффективно применяться в тестировании и создании новых лекарственных препаратов с гораздо меньшими временными и материальными затратами.

На первом этапе специалисты классифицируют изученные соединения. На основе данных о структуре молекулы и ее активности и создаются модели, определяющие взаимосвязь между ними (SAR-модели). Затем выстраиваются модели, целью которых служит количественное предсказание биологической активности и физико-химических свойств соединений при помощи статистики и машинного обучения (QSAR-модели).

С помощью другого метода молекулярного моделирования – так называемого молекулярного докинга – ученые определяют наиболее

выгодную ориентацию молекулы при взаимодействии с целевыми ферментами.

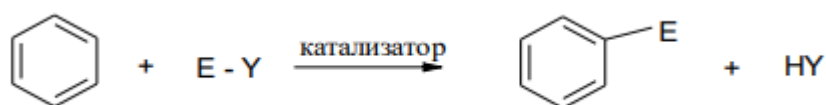
Построенные ранее модели позволили выявить несколько соединений, обладающих повышенной биологической активностью. Замена ряда химических групп в молекуле парацетамола позволила получить 4-фторметилсульфон, обладающий ярко выраженной противовоспалительной активностью. Для веществ, полученных при модификации цитизина – соединения из бобовых растений, – был предсказан ноотропный эффект, который впоследствии был подтвержден в исследованиях *in vitro*.

К другим примерам молекулярного дизайна относится химическая модификация соединений на основе производных пиримидина, представляющего собой плоский цикл из четырех атомов углерода и двух атомов азота. Примером может служить исследование измененных молекул урацила – одного из структурных элементов нуклеиновых кислот, входящих в состав РНК. Результаты этого исследования выявили высокую антиоксидантную активность у 5-амино-6-метилурацила и его N-метилированных производных.

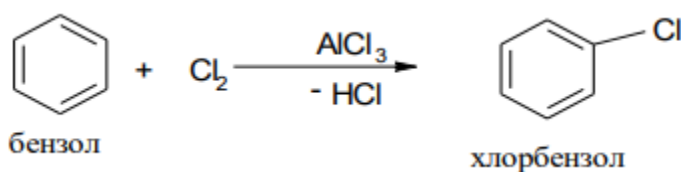
Весьма перспективным является создание гибридных молекул – конъюгатов. Их получают, вводя природные аминокислоты (составные части белка) в молекулу урацила. Еще одно направление исследований связано с получением комплексных соединений. Таким образом можно увеличить активность препарата и уменьшить его токсичность. Некоторые комплексные соединения из производных урацила и фруктовых сахаров или органических кислот обладают противоязвенной, антидотной и антиоксидантной активностью.

### 1.11. Особенности химии ароматических соединений.

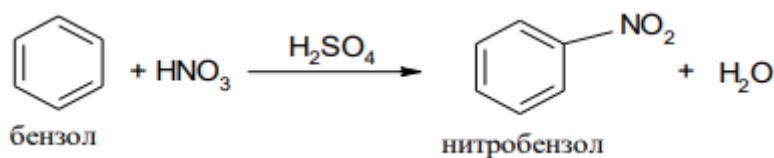
I. Для бензола и его гомологов характерны реакции электрофильного замещения.



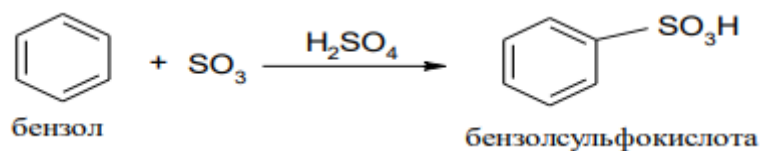
1) Галогенирование бензола:



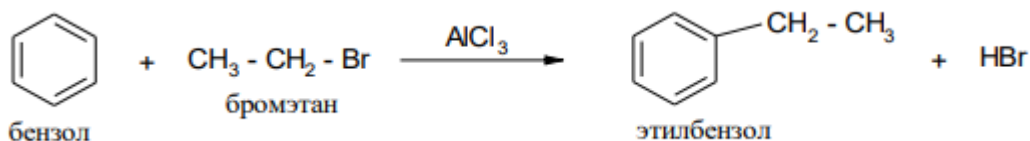
2) Нитрование



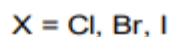
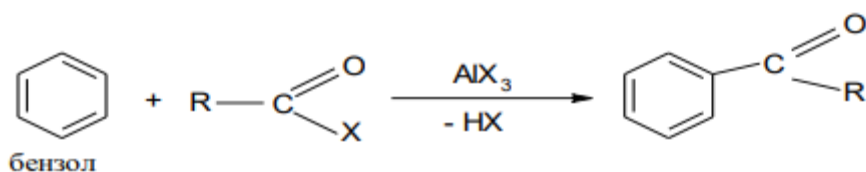
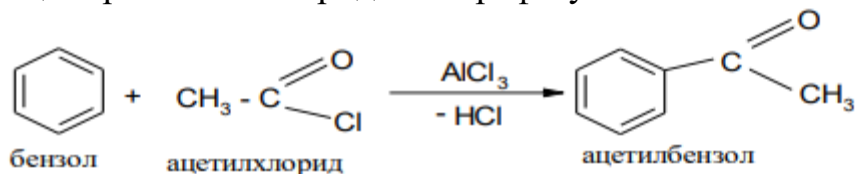
3) Сульфирование



4) Алкилирование по Фриделю-Крафтсу:



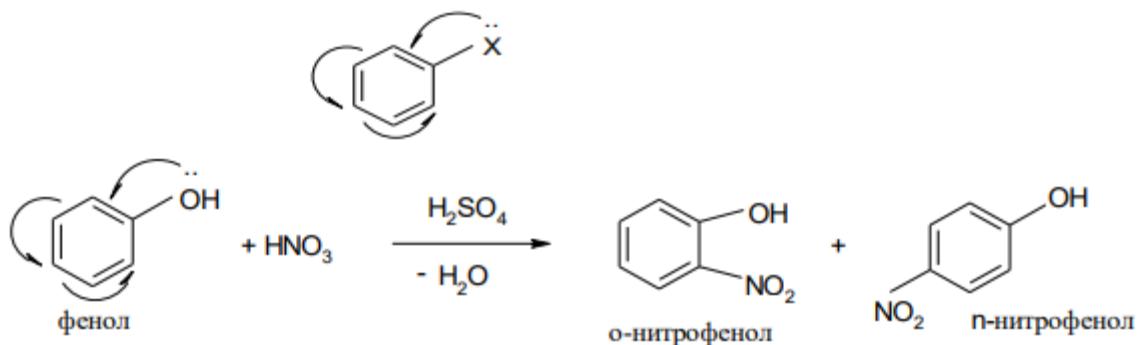
5) Ацилирование по Фриделю-Крафтсу:



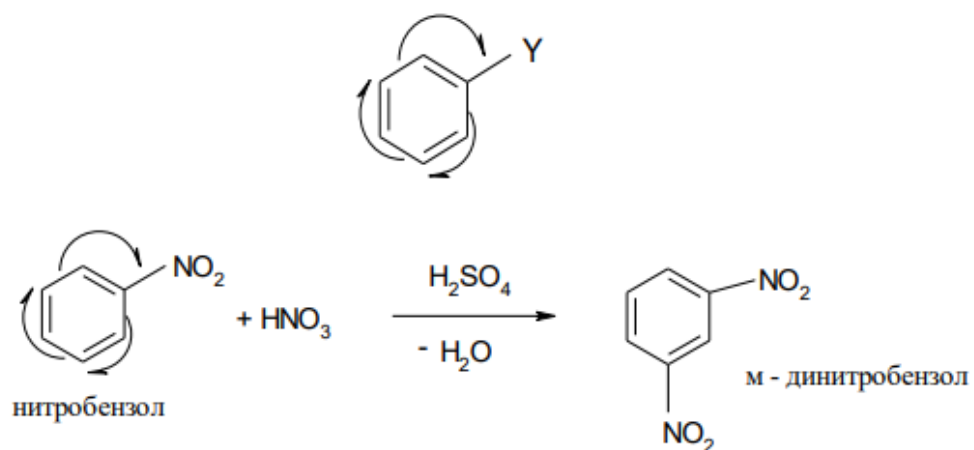
II. Ориентирующее действие заместителей в бензольном кольце:

1. Электронодонорные заместители увеличивают электронную плотность в бензольном кольце, облегчают реакции электрофильного замещения и направляют новый заместитель в орто- и пара-положения (ориентанты I рода):

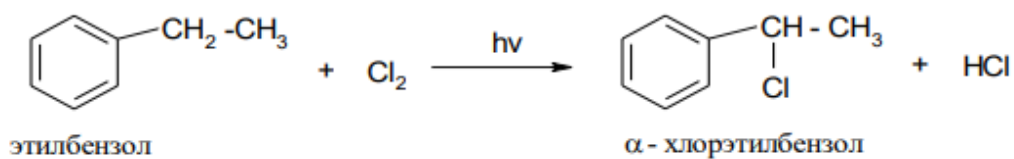
– CH<sub>3</sub> ; – CH<sub>2</sub>R ; – CH = CH<sub>2</sub> ; – C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> ; – OH ; – OR ; – NH<sub>2</sub> ; – F ; – Cl ; – Br ; – I



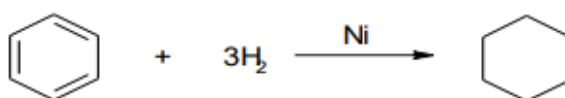
2. Электронакцепторные заместители уменьшают электронную плотность в бензольном кольце, замедляют реакции электрофильного замещения и направляют новый заместитель в мета-положение (ориентанты II рода): – NO<sub>2</sub> ; – SO<sub>3</sub>H ; – C(O)H ; – COOH ; – COOR ; – CN



### III. Реакции радикального замещения:



### IV. Восстановление:



### V. Окисление:

