

Основы дизайна и химии лекарств (часть 1)

Учебное пособие
для студентов IV курса
фармацевтического факультета

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

Основы дизайна и химии лекарств (часть 1)
Учебное пособие для студентов IV курса
фармацевтического факультета

Волгоград, 2024 г.

ISBN
УДК 547:615.012.1(07)
ББК 24.2+52.81я73

Составители:

д.х.н., профессор ВолгГМУ А.К. Брель;
к.х.н, доцент ВолгГМУ Ю.Н. Будаева
к. фарм.н. старший преподаватель Н.В. Атапина

Рецензенты

доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии
ФГБОУ ВО ВолгГМУ, кандидат фармацевтических наук Г.Н. Солоду-нова

профессор кафедры технология органического и нефтехимического синтеза
ФГБОУ ВО ВолгГТУ, доктор химических наук, профессор Ю.Л. Зотов

О-751 Основы дизайна и химии лекарств (часть 1): учебное пособие для студентов IV курса фармацевтического факультета обучающихся по образовательной программе 33.05.01 Фармация (уровень специалитет) / А.К. Брель, Ю.Н. Будаева, Н.В. Атапина – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2024. – 182 с.

Настоящее пособие посвящено рассмотрению основных принципов молекулярного дизайна структур, обладающих потенциальным лекарственным действием. Изложены главные концепции химии – химической стратегии конструирования и создания лекарственных веществ. Освещена методология предсказания виртуальной биологической активности молекулярных структур и поиска среди выявленных фармакологически ценных органических соединений тех, которые эффективно взаимодействуют с активными центрами ферментов, клеточных рецепторов и ДНК. Приведены основные пути получения методами современной фармацевтической промышленности некоторых важнейших природных и синтетических лекарственных веществ. Рассмотрены основные методы качественного и количественного анализа лекарственных веществ. Излагаемый материал способствует формированию следующих компетенций студентов: способность осуществлять критический анализ проблемных ситуаций на основе системного подхода, вырабатывать стратегию действий (УК-1); способность использовать основные биологические, физико-химические, химические, математические методы для разработки, исследований и экспертизы лекарственных средств, изготовления лекарственных препаратов (ОПК-1); способность выполнять клинические лабораторные исследования третьей категории сложности, в том числе на основе внедрения новых методов и методик исследования (ПК-5); способность принимать участие в исследованиях по проектированию состава лекарственного препарата (ПК-8); способность участвовать в проведении научных исследований (ПК-11).

Введение

Настоящее пособие посвящено рассмотрению основных принципов молекулярного дизайна структур, обладающих потенциальным лекарственным действием. Изложены главные концепции химии – химической стратегии конструирования и создания лекарственных веществ. Освещена методология предсказания виртуальной биологической активности молекулярных структур и поиска среди выявленных фармакологически ценных органических соединений тех, которые эффективно взаимодействуют с активными центрами ферментов, клеточных рецепторов и ДНК. Приведены основные пути получения методами современной фармацевтической промышленности некоторых важнейших природных и синтетических лекарственных веществ. Рассмотрены основные методы качественного и количественного анализа лекарственных веществ. Излагаемый материал способствует формированию следующих компетенций студентов: способность осуществлять критический анализ проблемных ситуаций на основе системного подхода, вырабатывать стратегию действий (УК-1); способность использовать основные биологические, физико-химические, химические, математические методы для разработки, исследований и экспертизы лекарственных средств, изготовления лекарственных препаратов (ОПК-1); способность выполнять клинические лабораторные исследования третьей категории сложности, в том числе на основе внедрения новых методов и методик исследования (ПК-5); способность принимать участие в исследованиях по проектированию состава лекарственного препарата (ПК-8); способность участвовать в проведении научных исследований (ПК-11). Авторы надеются, что материал, изложенный в настоящем пособии, будет служить основой для самостоятельной работы студентов.

Оглавление

Занятие 1.	8
Вопросы к занятию:	8
1.1. Этапы создания и лабораторный синтез потенциальных лекарственных препаратов.	8
1.2. Первичные этапы биотестирования. Требования к молекулам-лидерам.	10
1.3. Испытания на животных.	14
1.4. Клинические испытания на людях	14
1.5. Регистрация и технология производства нового лекарственного препарата	15
1.6. Методы анализа органических соединений	17
1.7. Категории чистоты вещества: определение температуры кипения и плавления.	19
1.8. Категории чистоты вещества: плотность, показатель преломления; молекулярная рефракция, удельное вращение.	21
1.9. Основные группы и фрагменты в структурах известных лекарств	25
1.10. Принципы химической модификации для моделирования их биологической активности	26
1.11. Особенности химии ароматических соединений.	27
1.12. Лабораторный практикум	29
Занятие 2.	34
Вопросы к занятию:	34
2.1. Создание групп синтетических лекарственных веществ случайными открытиями и аналоговыми синтезами на основе принципа химической модификации.	34
2.2 Регрессионный анализ	39
2.3. Химические особенности гетероциклических соединений	43
2.4. Лабораторный практикум	52
Занятие 3.	55
Вопросы к занятию:	55
3.1 Формирование протоарсенала природных лекарственных средств. Лекарственные средства растительного происхождения.	55
3.2. Формирование протоарсенала природных лекарственных средств. Лекарственные средства бактериального происхождения.	59
3.3. Комбинаторная химия.	60
3.4. Ввод химической структуры в программе HyperChem	63
3.5. Оптимизация геометрии в программе HyperChem	66

3.6. Основные понятия, современная химическая классификация алкалоидов.	68
3.7. Химические особенности алкалоидов: хинина.	71
3.8. Химические особенности синтеза алкалоидов: папаверин.	73
3.9. Химические особенности алкалоидов: морфин, кодеин.	74
3.10. Химические особенности алкалоидов: атропин, кокаин.	76
3.11. Лабораторный практикум.	79
Занятие 4.	81
Вопросы к занятию:	81
4.1 Пролекарства. Эмпирические основы их дизайна. Фармакокинетические свойства лидерных молекул (показатели АРМЭТ).	81
4.2 Принцип антиметаболитов в умозрительном дизайне ЛП.	85
4.3 Конформационный анализ в программе HyperChem.	88
4.4 Особенности конформационного поиска.	93
4.5 Определение активной группы в семействах биологически активных веществ. Принцип фармакофора. Умозрительный и эмпирический дизайн опиоидных анальгетиков на основе лидера-морфина.	95
4.6 Химические особенности гликозидов.	98
4.7 Лабораторный практикум по квантово-химическому расчету физико-химических свойств молекул в программе «HyperChem».	99
Занятие 5.	110
Вопросы к занятию:	110
5.1 Распознавание белковыми мишенями лекарственного вещества.	110
5.2 Дизайн активного центра белка известной структуры.	111
5.3 Дизайн активного центра белка неизвестной структуры по методу гомологии.	112
5.4 Дизайн модели всего белка.	113
5.5 Природные белокобразующие α -аминокислоты.	114
5.6. Функциональная протеомика.	118
5.7. Строение, функции и активные центры ферментов.	119
5.8 Белковые рецепторы-мишени. Строение и функции.	123
5.9 Лабораторный практикум.	125
Занятие 6.	126
Вопросы к занятию:	126

6.1 Проблема резистентности к лекарственным веществам. Механизмы выработки резистентности к лекарствам	126
6.2 Некоторые химические и комбинированные приёмы борьбы с возникающей устойчивостью патогенных микроорганизмов к классическим лекарствам	127
6.3 Сравнительный анализ молекулярных полей (САМП)	129
6.4 Строение и функции ДНК	136
6.5. Гены и их кодирование	141
6.6. Геном и функциональная геномика	142
6.7. Мутации генов	144
6.8.Хемогамика. Типы взаимодействий лекарств с ДНК.....	148
6.9 Лабораторный практикум	151
Занятие 7.	156
Вопросы к занятию:	156
7.1. Полимерные материалы для создания наноматрицы-носителя лекарственного агента. Их структуры и синтеза	156
7.2. Гомоцепные (карбоцепные) полимеры и сополимеры для создания лекарственных наночастиц.....	157
7.3. Гетероцепные полимерные материалы	159
7.4. Нанотехнологии в дизайне устройств для защиты и доставки наночастиц.....	164
7.5 Примеры успешного дизайна лечебных наночастиц.....	166
7.6 Программа PASS.....	170
7.7 Лабораторный практикум	179
Занятие 8.	182
Вопросы к занятию:	182
ЛИТЕРАТУРА	184

Занятие 1.

Тема занятия: Дизайн структуры синтетических лекарственных веществ на основе принципа химической модификации для моделирования их биологической активности. Производные ароматических соединений.

Цель занятия: изучить современные подходы к дизайну синтетических лекарственных веществ на основе принципа химической модификации для моделирования их биологической активности.

Вопросы к занятию:

1. Этапы создания и лабораторный синтез потенциальных лекарственных препаратов.
2. Первичные этапы биотестирования и доклинические и клинические испытания.
3. Методы анализа органических соединений.
4. Категории чистоты вещества: определение температуры кипения и плавления.
5. Категории чистоты вещества: плотность, показатель преломления; молекулярная рефракция, удельное вращение.
6. Принципы химической модификации для моделирования их биологической активности.
7. Особенности химии ароматических соединений.

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-синтетикам, 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, химиксинтетик 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) выбираются проявившие желаемый вид биоактивности вещества, называемые «хитами». Их может остаться всего одна тысяча можно условно представить в виде опрокинутой пирамиды (Рисунок 2).

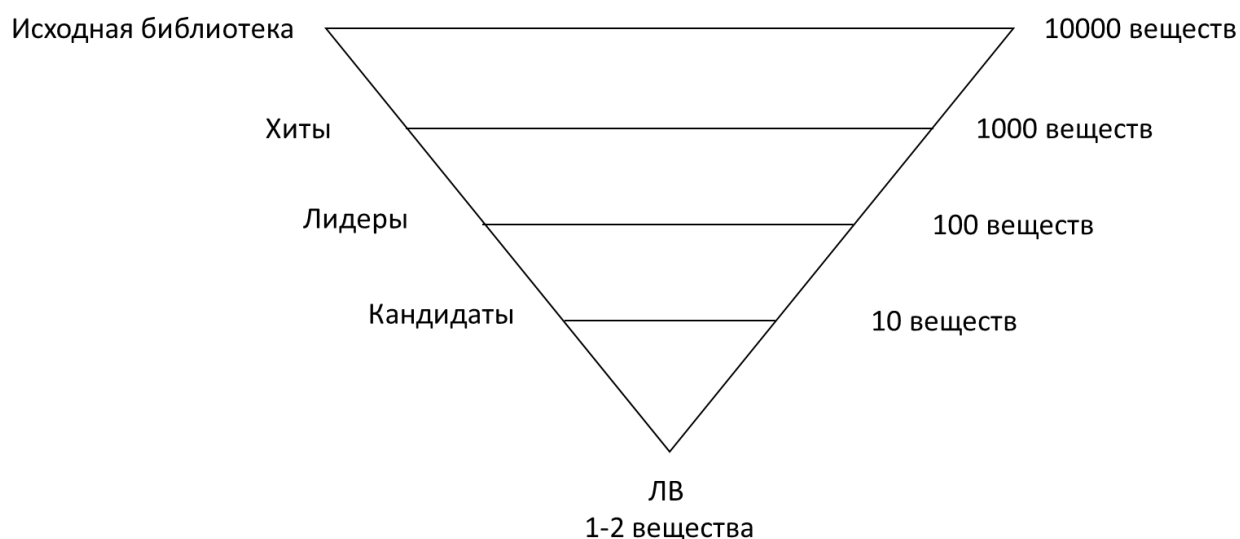


Рисунок 2. Напряжённость отбора веществ

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 (CYP – P450), 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 ЛД₅₀, 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 LD₅₀. 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 токсифорные группы атомов и давать токсичные метаболиты. Тем не менее, следует заметить, что иногда в медицине пользуются контролируемой токсичностью, например, при лечении алкоголизма. Так, дисульфиды обладают 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 биомшенью; 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 биомшенью – 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-трём 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 отсеке 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% отсеке 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, полужаковского 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 ПЛВ (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 – 250⁰С). 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 0,5⁰с и оценкой до 0,1⁰С. 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 250⁰С. 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 - 10⁰С в минуту, а вблизи температуры плавления на 1 – 2⁰С 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 $0,1 - 0,5^{\circ}\text{C}$).

Капилляр с веществом, разлагающимся при плавлении, следует вносить в уже нагретый прибор за $1- 15^{\circ}\text{C}$ 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 ($0,5 - 1^{\circ}\text{C}$). 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 $6 - 10^{\circ}\text{C}$ при 250°C . 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°C);

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

t_1 – температура, показываемая термометром; t_2 – средняя температура выступающего столбика. Температура t_2 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 4⁰С почти равна единице (0,99997г/см³).

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 20⁰С, приведенной к массе воды при 4⁰С. 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 10 мин при 20⁰С 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 – 20 мин, а затем взвешивают на аналитических весах. Полученную массу воды в объеме

пикнометра при 20⁰С приводят к массе воды при 4⁰С. Находят массу воды в объеме пикнометра (х) при 4⁰С. 0,99823 – плотность воды при 20⁰С:

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

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:

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

В – водное число пикнометра;

m – масса пикнометра с веществом;

m_n – 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 20⁰С.

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_D , являющейся характеристикой вещества:

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

M_r - 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, $R(CH_4) = 4R_{C-H}$; $R(CH_3NO_2) = 3R_{C-H} + R_{C-N} + R_{NO_2}$

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 рефракций 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 α 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 поляризметрической трубки, дм;

α – 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

$$[\alpha]_D^{t_0}$$

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 лекарствовподобное 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 биомолекул 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, amino-, aminoалкильные 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 азетидиновые;
- 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-

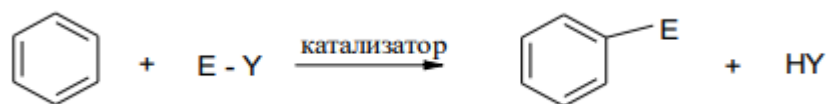
фторметилсульфон, обладающий ярко выраженной противовоспалительной активностью. Для веществ, полученных при модификации цитизина – соединения из бобовых растений, – был предсказан ноотропный эффект, который впоследствии был подтвержден в исследованиях *in vitro*.

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-метилованных производных.

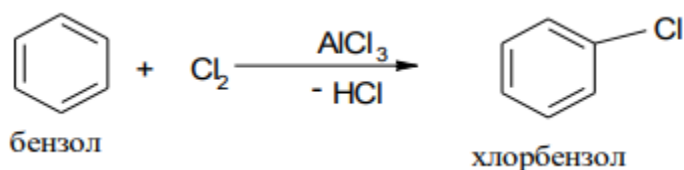
Весьма перспективным является создание гибридных молекул – конъюгатов. Их получают, вводя природные аминокислоты (составные части белка) в молекулу урацила. Еще одно направление исследований связано с получением комплексных соединений. Таким образом можно увеличить активность препарата и уменьшить его 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.

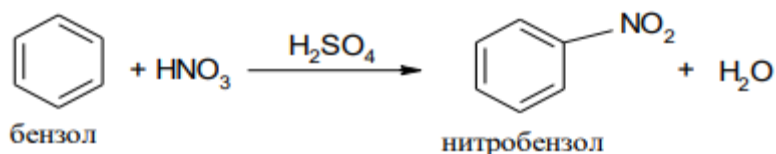
I. Для бензола и его гомологов характерны реакции электрофильного замещения.



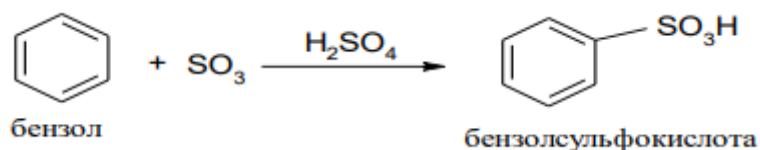
1) Галогенирование бензола:



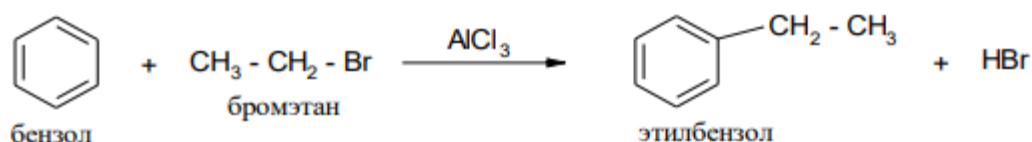
2) Нитрование



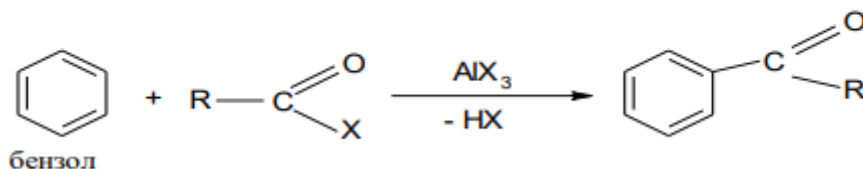
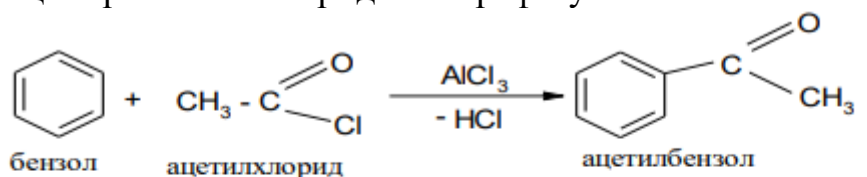
3) Сульфирование



4) Алкилирование по Фриделю-Крафтсу:



5) Ацилирование по Фриделю-Крафтсу:

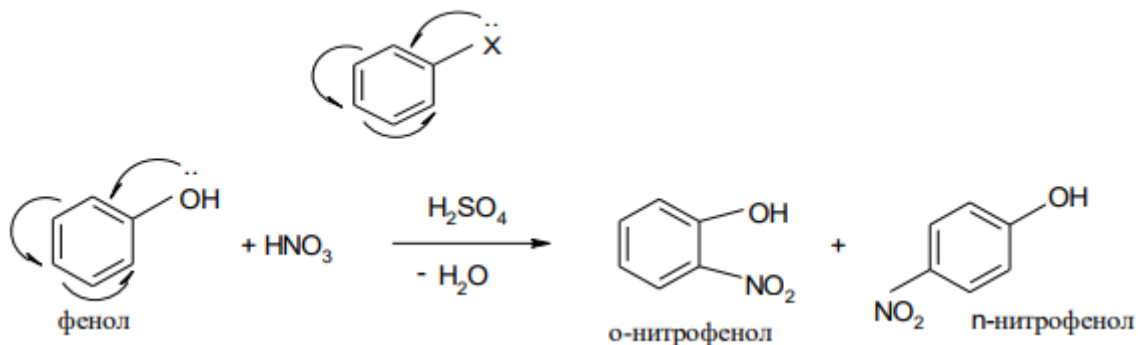


$\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$

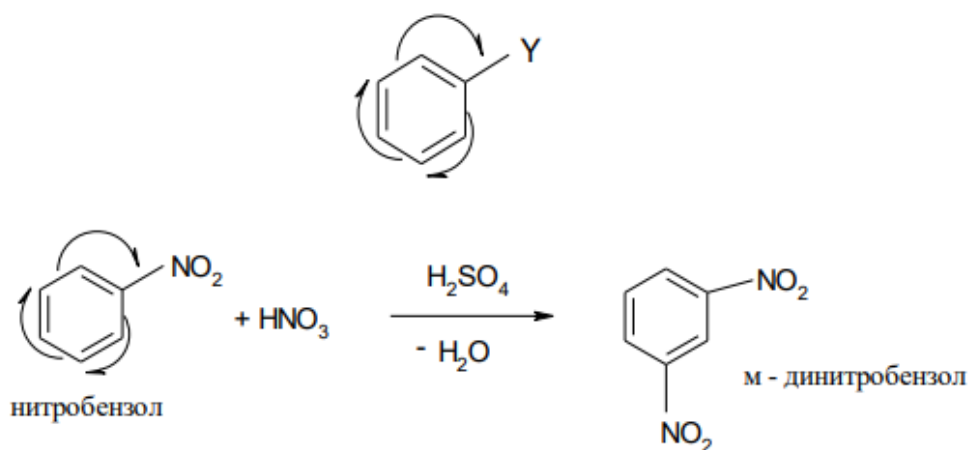
II. Ориентирующее действие заместителей в бензольном кольце:

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):

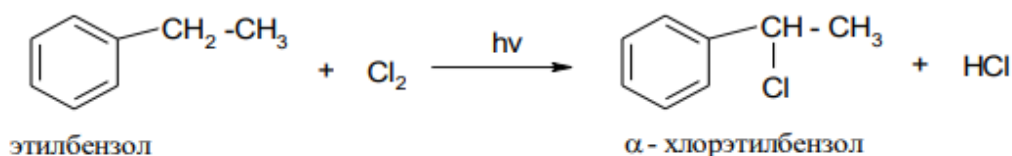
– CH_3 ; – CH_2R ; – $\text{CH}=\text{CH}_2$; – C_6H_5 ; – OH ; – OR ; – NH_2 ; – F ; – Cl ; – Br ; – I



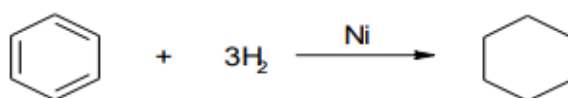
2. Электронакцепторные заместители уменьшают электронную плотность в бензольном кольце, замедляют реакции электрофильного замещения и направляют новый заместитель в мета-положение (ориентанты II рода): – NO_2 ; – SO_3H ; – $\text{C}(\text{O})\text{H}$; – COOH ; – COOR ; – CN



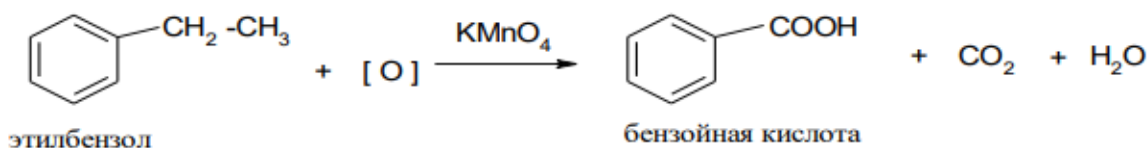
III. Реакции радикального замещения:



IV. Восстановление:



V. Окисление:



1.12. Лабораторный практикум

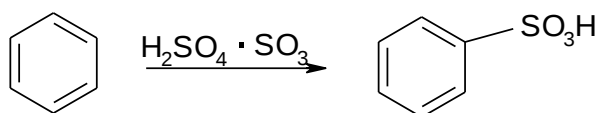
Известно несколько реакций для определения ароматических углеводородов и их простых производных, позволяющих отличить их от алифатических соединений, однако эти реакции не всегда однозначны.

При анализе ароматических соединений часто используют введение новых заместителей в ароматическое ядро или модифицируют имеющиеся заместители с целью получения новых продуктов, удобных для идентификации исследуемого соединения.

Реакция с серной кислотой

При смешении простых, твердых или жидких, ароматических соединений с концентрированной серной кислотой, содержащей 20% олеума, происходит их растворение или реакция, которая может сопровождаться повышением температуры. Напротив, алифатические соединения либо не растворяются в серной кислоте, либо разрушаются в ней с образованием раствора темно-коричневого или черного цвета. Растворение ароматических соединений обусловлено или реакцией сульфирования, или

простым растворением в реагенте с высокой диэлектрической проницаемостью.



Экспериментальная часть.

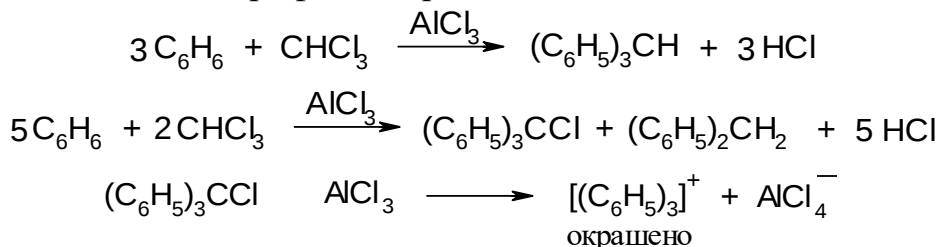
Реакция с серной кислотой

В чистую сухую пробирку наливают 2 мл 20% дымящей серной кислоты и прибавляют 1 мл или 0,1г ароматического соединения. Смесь сильно встряхивают и дают постоять несколько минут. Следует обратить внимание, произошло ли полное растворение.

Эта проба неоднозначна, так как ароматические соединения, содержащие боковую цепь с более чем двумя атомами углерода, также могут давать темный раствор.

Реакция с хлороформом в присутствии хлорида алюминия

Для того, чтобы отличить ароматические углеводороды от алифатических, можно использовать некоторые цветные реакции, к которым относится взаимодействие аренов с хлороформом в присутствии AlCl_3 . Эта реакция сопровождается образованием окрашенных продуктов. Так, при взаимодействии бензола с хлороформом в присутствии AlCl_3 кроме основного продукта реакции – бесцветного трифенилметана, образуется также окрашенная соль трифенилкарбеня:



При этой реакции появляются следующие характерные цвета:

Таблица 1

Соединения	Окраска
Бензол и его гомологи	От оранжевого до красного
Арилгалогениды	То же
Нафталины	Синий
Бифенил	Пурпурный
Фенантрен	Пурпурный
Антрацен	Зеленый

С течением времени цвета изменяются, принимая различные оттенки коричневого цвета. Такие же цвета получаются, если заменить хлороформ четыреххлористым углеродом.

Алифатические соединения, нерастворимые в серной кислоте, либо не дают никакой окраски, либо окрашиваются только в очень слабый светло-желтый цвет.

Экспериментальная часть.

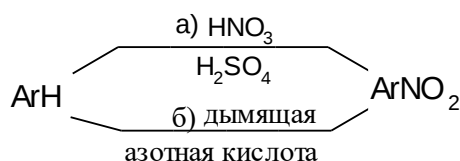
Реакция с хлороформом

К 1-2 мл хлороформа, высушенного над CaCl_2 , прибавляют 2-3 капли бензола, тщательно перемешивают и пробирку слегка наклоняют, чтобы смочить стенки. Добавляют 0,5-0,6 г AlCl_3 таким образом, чтобы часть порошка попала на стенки пробирки. Обратите внимание на окраску порошка на стенке и на цвет раствора.

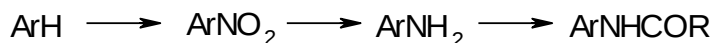
Эту реакцию можно также использовать для обнаружения ароматических галогенпроизводных.

Нитрование ароматических соединений

Нитрование ароматических соединений, тем более неизвестных, следует проводить с особыми предосторожностями, так как многие из них реагируют весьма бурно.



Введение нитрогруппы в ароматическое кольцо позволяет получать другие замещенные ароматические соединения. Так, например, полизамещенные бензольные производные могут быть идентифицированы с помощью реакции нитрования и последующего восстановления нитросоединения до амина, который в свою очередь ацетируется или бензоилируется, давая моно- или диацетида- или бензамидопроизводные:



Экспериментальная часть.

а) К 4 мл концентрированной серной кислоты прибавляют 1 г исследуемого вещества. Затем приливают по каплям 4 мл концентрированной азотной кислоты, встряхивая смесь после прибавления каждой капли. Колбу соединяют с обратным холодильником и помещают в стакан с водой на 5 мин при 45°C . Реакционную смесь выливают на 25 г мелкоизмельченного льда. Выпавший осадок отфильтровывают. Продукт можно перекристаллизовать из разбавленного этанола.

б) Нитрование проводят по описанной выше методике, однако вместо концентрированной азотной кислоты берут 4 мл дымящей азотной кислоты и реакционную смесь нагревают на паровой бане в течение 10 мин. В тех случаях, когда исследуемое соединение плохо нитруется, можно вместо концентрированной серной кислоты использовать дымящую серную кислоту.

По методу а) можно получать м-динитробензол из бензола или нитробензола и п-нитропроизводные из хлорбензола, бромбензола, бензилхлорида или толуола. Фенол, ацетанилид, нафталин и дифенил дают динитропроизводные. В случае галогенпроизводных ароматических соединений лучше использовать методику б), так как при этом образуются динитропроизводные, которые легче очистить, чем монопроизводные,

получаемые по методике а). Мезитилен, ксилолы и псевдокумол дают тринитропроизводные.

Получение производных. Идентификация

Ароматические углеводороды образуют продукты присоединения с 1,3,5-тринитробензолом, пикриновой кислотой и некоторыми другими веществами. Эти продукты присоединения в большинстве случаев имеют достаточно четкие температуры плавления и могут быть использованы для идентификации.

Экспериментальная часть.

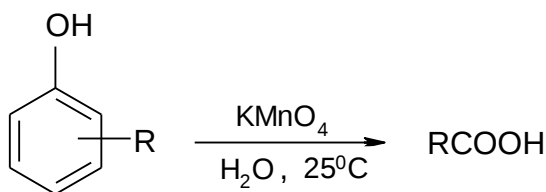
Получение пикрата нафталина.

В небольшой колбе с обратным холодильником растворяют при нагревании 0,1 г нафталина в 1,5 мл этанола. К горячему раствору приливают приготовленный отдельно раствор 0,1 г пикриновой кислоты в 1 мл этанола. При охлаждении раствора выпадают игольчатые желтые кристаллы молекулярного соединения нафталина с пикриновой кислотой. Осадок отделяют фильтрованием, промывают 0,5 мл спирта, сушат и определяют температуру плавления. Температура плавления пикрата нафталина 149⁰С.

Окисление боковой цепи в ароматических соединениях

Ароматические углеводороды, имеющие боковую цепь, могут быть окислены до соответствующих кислот. Этот метод хорош для соединений, имеющих только одну боковую цепь. Лучше всего для этой цели использовать перманганат калия. Ароматические кислоты, имеющие несколько карбоксильных групп, иногда трудно поддаются разделению. Поэтому применение окислительных методов в этих случаях довольно ограничено. Однако окисление можно рекомендовать, если две боковые цепи находятся рядом друг с другом в кольце, так как при таком расположении заместителей в результате окисления образуется фталевая кислота, которую легко идентифицировать. о-Диалкилбензолы, так же как и другие соединения, имеющие заместители в о-диалкильных цепях, претерпевают полное окисление при действии бихромата калия. Таким образом, применение бихромата может привести к ошибочным выводам. Поэтому следует использовать окисление перманганатом калия. Температуры плавления кислот, получаемых при окислении алкилбензолов, можно найти в справочной литературе.

Ароматические кольца, имеющие электроноакцепторные заместители (нитрогруппа, галогены и т.п.), не затрагиваются даже при очень жестких условиях окисления. Напротив, в случае ароматических соединений с электронодонорными заместителями окисление с участием углеродных атомов кольца протекает легче, чем окисление боковой цепи. Например, при окислении замещенного фенола образуется алифатическая кислота с выходом, достаточно высоким для ее идентификации:



Экспериментальная часть.

а) Окисление бихроматом натрия.

В небольшую колбу помещают 15 мл воды, 7 г бихромата натрия и 2-3 г окисляемого соединения. Прибавляют 10 мл концентрированной серной кислоты и, соединив колбу с обратным холодильником, сильно встряхивают смесь. Осторожно нагревают колбу до начала реакции, затем нагрев убирают, в случае необходимости колбу охлаждают. После того, как смесь перестанет кипеть за счет теплоты реакции, колбу нагревают с обратным холодильником еще 2 часа, после чего содержимое колбы в 25 мл воды и осадок отфильтровывают. Осадок смешивают с 20 мл 5%-ной серной кислоты и нагревают на кипящей водяной бане при энергичном перемешивании. После охлаждения осадок отделяют и промывают 20 мл воды. Остаток растворяют в 20 мл 5%-ного раствора гидроксида натрия, и раствор фильтруют. Фильтрат при сильном перемешивании выливают в 25 мл 10%-ной серной кислоты. Осадок собирают на фильтре, промывают водой и очищают перекристаллизацией из этанола или бензола.

б) Окисление перманганатом калия.

Прибавляют 1 г исследуемого соединения к 80 мл раствора, содержащего 4 г перманганата калия, добавляют 1 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия, и смесь нагревают с обратным холодильником до тех пор, пока не исчезнет пурпурный цвет перманганата (от 0,5 до 3 час). После этого смеси дают остыть и затем осторожно подкисляют серной кислотой. Подкисленную смесь нагревают 0,5 час и охлаждают. Избыток диоксида марганца удаляют прибавлением небольшого количества бисульфита натрия. Выпавшую кислоту собирают на фильтре и перекристаллизовывают из бензола или этанола. Если кислота достаточно растворима в воде, то она может не выпасть в осадок из таких разбавленных растворов. В этом случае полученную кислоту можно экстрагировать хлороформом, бензолом или эфиром.

Занятие 2.

Тема занятия: Дизайн структуры синтетических лекарственных веществ на основе принципа химической модификации для моделирования их биологической активности. Производные гетероциклических соединений с одним гетероатомом.

Цель занятия: Изучить современные подходы к дизайну синтетических лекарственных веществ на основе принципа химической модификации для моделирования их биологической активности.

Вопросы к занятию:

1. Создание групп синтетических лекарственных веществ случайными открытиями и аналоговыми синтетами на основе принципа химической модификации
2. Регрессионный анализ
3. Химические особенности гетероциклических соединений

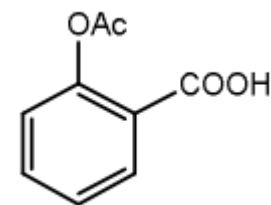
2.1. Создание групп синтетических лекарственных веществ случайными открытиями и аналоговыми синтетами на основе принципа химической модификации

Синтетические вещества, обладающие фармакологическим действием, стали также появляться в 19 веке - параллельно с зарождением и началом развития органической химии.

Их биологическую активность часто открывали в результате случайных наблюдений самих же химиков. Внимательные и разносторонне мыслящие учёные, сталкиваясь с подобными случаями, стремились разнообразить структуру такой найденной биоактивной молекулы, чтобы подтвердить правильность наблюдения. Этот подход позднее назвали эмпирическим принципом химической модификации первоначальной биоактивной молекулы (аналоговым синтезом или концепцией «сходство - различие») при конструировании производных лидерных молекул с целью улучшения фармакологической картины и терапевтического эффекта в рядах потенциальных лекарств. Подобный приём химического модифицирования структуры известных природных или синтетических лекарственных веществ является интуитивным, умозрительным. С его помощью, исходя из аналогии двух структур - известного лидера и его конструируемого производного, - биоактивность известного вещества как бы переносят на новое соединение. Ожидают при этом, что биоактивность новогосинтетического аналога и в целом фармакологическая картина последнего окажется улучшенной. Рассмотрим несколько примеров успешного применения указанного принципа для получения некоторых лидерных структур с лекарственным действием.

Аспирин. орто-Гидроксibenзойная (салициловая) кислота является природным веществом, содержащимся в виде эфира в цветах растений вида спиреи (*spīraea ulmaria*). Синтетическое Оацетилпроизводное этой кислоты (О-ацетилсалициловая кислота) было введено в медицинскую практику для

лечения острого суставного ревматизма еще в 1874 году. Как одно из первых синтетических лекарственных веществ это производное стало выпускаться в промышленных масштабах в самом конце 19-го века под названием аспирин (приставка «а» означала, что данное лекарственное вещество не добывается из спиреи, а делается химическим путем).



аспирин

Аспирин называют лекарством 20-го столетия, и в настоящее время его производят в мире в количестве, превышающем 100 тысяч тонн в год. Известны его противовоспалительные, жаропонижающие и болеутоляющие свойства. Обнаружено также, что он препятствует образованию тромбов, оказывает сосудорасширяющее действие и начинает применяться даже для профилактики и лечения инфарктов и инсультов. Считают, что весь потенциал лечебных свойств этого вещества еще не исчерпан. В то же время аспирин раздражает слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта, что может вызывать кровотечения. Возможны также аллергические реакции. Аспирин в организме влияет на синтез простагландинов (контролирующих в частности образование тромбов) и гормона гистамина (расширяющего сосуды и вызывающего приток иммунных клеток к месту воспаления; кроме того он может препятствовать при воспалительных процессах биосинтезу болевых веществ).

Несмотря на долгую историю использования в качестве лекарственного средства, АСК по-прежнему вызывает восхищение исследователей в области химии, биологии и медицины. В связи с этим разработка производных АСК с новыми, биологическими свойствами продолжает оставаться актуальной задачей химиков.

Металлоорганическая дериватизация АСК оказывает сильное влияние на его профиль действия и биологическую активность. В большинстве металлоорганических производных АСК первоначальная способность к ацетилированию ЦОГ-1 и ЦОГ-2 сохраняется, но органы и ткани, в системе которых происходит ацетилирование, отличаются от тех, в которых этот процесс запускается оригинальной АСК. Это чередование является результатом комбинации электронных и стерических эффектов, создаваемых металлоорганическим объектом.

Металлический центр молекулы оказывает сильное влияние на её биологическую активность, например, через способность к образованию активных форм кислорода (АФК) в клетках, что не является характерным эффектом АСК и вносит вклад в фармакологические свойства. Эти новые свойства металлоорганических производных АСК включают

противоопухолевую, противопаразитарную и антибактериальную активность.

Ссылаясь на современные литературные данные о металлоорганических производных ацетилсалициловой кислоты (со связью металл-углерод), известные соединения можно разделить на три класса.

Первый – объединяет соединения, в которых бензольное кольцо АСК полностью замещено металлоорганической группой, во втором – металлоорганический фрагмент периферически присоединен к ядру ацетилсалициловой кислоты с помощью подходящего мостика, а у третьего – металлоорганический лиганд координирован с ядром АСК через один или два атома кислорода. Из трёх классов гексакарбонилдикообальтатиновое производное занимает лидирующую позицию в качестве наиболее многообещающего противоракового активного агента; данное соединение является активным в отношении саркоматоидных раковых клеток.

Металлоорганическая функционализация аспирина может быть полезной для разработки новых антибактериальных и средств против лейшманиоза. Разработка новых противопаразитарных средств для лечения забытых тропических болезней в настоящее время является актуальной и металлоорганические производные аспирина могут играть важную роль в этой области. Люминесцентные производные органометаллического аспирина представляют собой развивающуюся группу соединений с потенциальным применением в качестве тераностических агентов или люминесцентных зондов для визуализации.

Металлоорганический компонент привносит новый фармакологический эффект и изменяет первоначальную способность аспирина к ацетилированию и ингибированию ферментов ЦОГ. Несмотря на многообещающую противораковую активность металлоорганических производных АСК, необходимы исследования, чтобы сделать эти соединения более подходящими прототипами для потенциальных кандидатов в лекарственные средства и их последующей разработки для клинического применения. В ходе последовательной модернизации молекул должно быть достигнуто оптимальное соотношение между желаемой противораковой активностью и нежелательной токсичностью по отношению к здоровым клеткам человека.

Исследователи разрабатывают новые производные аспирина, которые лучше растворяются в воде и оказывают более выраженные противораковые эффекты с минимальными побочными эффектами. Фосфо-аспирин является производным аспирина, модифицированным по его карбоксильной группе. По сравнению с аспирином, фосфо-аспирин в большей степени подавляет онкогенез и имеет лучшую безопасность на моделях животных таких как рак толстой кишки и поджелудочной железы, чем аспирин. Для повышения эффективности и минимизации токсичности были разработаны пролекарства сложного эфира аспирина на основе фумарата. Одно из пролекарств аспирина на основе фумарата способно эффективно воздействовать на раковые стволовые клетки, одновременно блокируя пути ЦОГ,

простагландина и ядерного фактора «каппа-би», может быть использовано в качестве химиопрофилактических или терапевтических агентов при лечении рака груди.

NO-высвобождающий аспирин является еще одним сложноэфирным производным аспирина (Pereira-Leite C. et al., 2017). При высвобождении из пролекарства аспирина NO способен предотвращать повреждение слизистой оболочки желудка за счёт увеличения секреции слизи, улучшения микроциркуляции оболочки и снижения агрегации нейтрофилов в ней (Wallace J.L., Granger D.N. et al., 1996). Кроме того, высвобожденный NO оказывает дополнительное антиагрегантное действие (Cena C. et al., 2003). Таким образом, аспирин, высвобождающий NO, может иметь лучшую противораковую активность и меньшую желудочно-кишечную токсичность, чем у исходного соединения аспирина. К настоящему времени разработано много вариантов молекул АСК, высвобождающей NO.

Кроме NO, другим газопередатчиком является сероводород (H_2S). NO и H_2S имеют много схожих функций, таких как защита от ишемического повреждения миокарда, цитопротекция при окислительном стрессе и ингибирование воспаления (Zheng Y. et al., 2018). Были разработаны H_2S -высвобождающие производные аспирина, которые обычно синтезируются путём связывания аспирина с дитиолетионовой или тиобензамидной составляющей. Подобно NO-аспирину, H_2S -аспирин обладает противоопухолевым действием и защитным, против вызванного АСК повреждения желудка в доклинических моделях. Кроме того, NOSH-аспирин, гибрид аспирина, который несет как NO-, так и H_2S -высвобождающие части, эффективен в подавлении роста раковых клеток (Vannini F. et al., 2015). NOSH-аспирин в доклинических исследованиях был менее токсичен и лучше в качестве химиопрофилактического средства против рака, чем аспирин.

Глюкоза-аспирин синтезируется путём конъюгирования ацетилсалициловой кислоты с глюкозой. Примечательно, что данное соединение в семь раз более растворимо в воде и примерно в восемь-девять раз более активно в подавлении роста раковых клеток, чем АСК (Jacob J.N., Tazawa M.J., 2012).

Аспирин-фосфатидилхолин – производное АСК, в состав которого входит соевый лецитин, обогащённый фосфатидилхолином. Связанный с фосфатидилхолином аспирин оказывает более сильное ингибирующее действие на рост клеток рака яичников, чем аспирин, *in vitro* и *in vivo* (Zhu Y. et al., 2015). Кроме того, производные аспирина на основе ресвератрола высвобождают ресвератрол, чтобы облегчить побочные действия аспирина и усилить его эффекты, в том числе противоопухолевый (Huang Y. et al., 2016). В особенности аспириноподобная молекула о-(ацетоксифенил)гепт-2-инилсульфид ингибирует ЦОГ-2 гораздо более мощно и селективно, чем аспирин.

В дополнение к описанным выше производным аспирина альтернативной стратегией является включение в аспирин наночастицы (Hua N. et al., 2019). В 2020 году учёными из Университета имени Адама

Мицкевича в Познани (Польша) получены люминесцентные наночастицы фторида лантанида ядро-оболочка с нанесённой на поверхность ацетилсалициловой кислотой. Спектроскопический анализ модифицированного продукта показал ковалентный или ионный характер связи между группами NH_2 и молекулами АСК, прикреплёнными к поверхности наночастицами. Основываясь на результатах анализов гемосовместимости, можно сделать вывод, что исследованные наночастицы не вызывают изменения структуры мембран эритроцитов и не увеличивают её избирательную проницаемость, существенно влияют на скорость оседания эритроцитов. Полученные соединения можно безопасно использовать в потенциальных биомедицинских приложениях, следовательно, они, могут стать очень хорошими предшественниками для многофункциональных систем доставки лекарств или зондов для приложений биовизуализации.

Синтезированы галогенированные аналоги азо-аспирина, которые проявляют антибактериальную активность в отношении кишечной палочки по сравнению с ампициллином (Ngaini Z., Mortadza N.A., 2019).

Производные ацетилсалициловой кислоты являются потенциальными противомикробными средствами. Бутирил-салициловая кислота, проявляет значительно улучшенную противомикробную активность против *Salmonella Typhimurium*. Исследования структуры-активности показали, что функциональность сложного эфира бутирил-салициловой кислоты имеет решающее значение и связана с ацилированием ключевых факторов бактериальной вирулентности и метаболических ферментов, которые важны для *Salmonella* инфицированных клеток-хозяев и роста бактерий. Помимо грамтрицательных бактериальных патогенов, бутирилсалициловая кислота также показала большую антибактериальную активность по сравнению с аспирином против *Clostridioides difficile*. Примечательно, что введение бутирил-салициловой кислоты снижало патогенное действие сальмонеллы *in vivo* (Yang X. et al., 2020; Ren F.C., 2021).

Оксибензойная кислота благодаря широкому спектру биологических эффектов является перспективной молекулой для структурной модификации с целью создания соединений, обладающих разнонаправленным действием в условиях цереброваскулярной патологии. Соединения, полученные на основе структурной модификации оксибензойной кислоты, сохраняют выраженное антиагрегантное, противовоспалительное, жаропонижающее, антиоксидантное, обезболивающее, эндотелио- и церебропротективное действие, а также приобретают некоторые положительные плеiotропные эффекты, что имеет важное терапевтическое значение в лечении ССЗ (Брель А.К., Лисина С.В., Будаева Ю.Н., 2021; Патент РФ № RU 2632005 C1) (Рисунок 3).

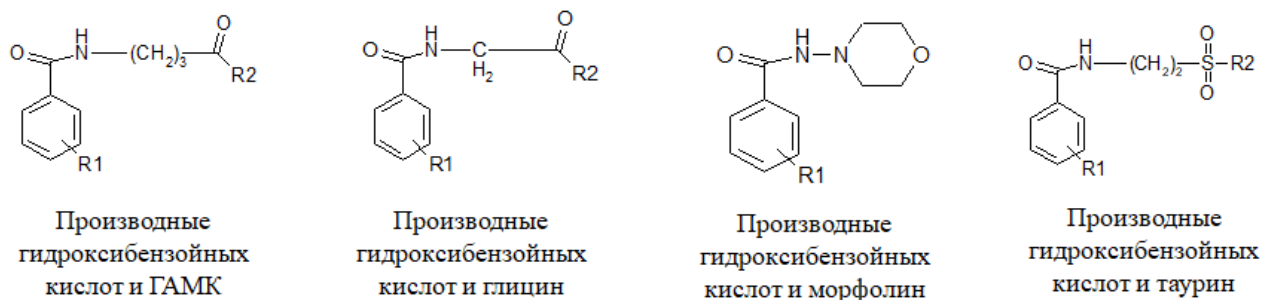


Рисунок 3 Основные формулы синтезированных соединений.

В лаборатории кафедры химии ВолгГМУ были синтезированы новые соединения на основе оксibenзойной кислоты, а на кафедре фармакологии и фармации ИНМФО совместно с сотрудниками лаборатории сердечно-сосудистых средств НЦИЛС проведены исследования их антиагрегантных свойств.

Несмотря на многолетнюю историю изучения и высокую эффективность АСК, химическая модификация молекулы может повысить её эффективность и добавить ей дополнительные свойства. Получение солевых форм повышает растворимость новых соединений, а добавление остатков нейроактивных аминокислот позволяет сообщить психоактивные эффекты и усилить церебропротективное действие. Согласно литературным данным, хлорамины аминокислот и таурина ковалентно модифицируют поверхностные белки тромбоцитов, проявляя антиагрегантные свойства (Ding Z. et al., 2003; Рощупкин Д.И. и др., 2007). Комбинированное применение АСК и производных таурина потенцирует их эффекты. Производные гидроксibenзойной кислоты рассматривают в качестве биорегуляторов, которые могут синтезироваться клетками организма выполняя в них протекторную функцию. Таким образом применение АСК и её производных в современной медицине может быть шире.

В связи с этим, целенаправленный поиск новых высокоэффективных и безопасных веществ на основе гидроксibenзойной кислоты является актуальной задачей фармакологии (Tshane L.S.L., 2021; Брель А.К., Лисина С.В., Будаева Ю.Н., 2021; Патент РФ № RU 2632005 C1).

2.2 Регрессионный анализ

Когда из природы процессов в модели или из данных наблюдений над ней следует вывод о нормальном законе распределения двух случайных величин — y и x , из которых одна является независимой, т. е. $y=f(x)$, появляется кажущаяся возможность выразить эту зависимость аналитически. Наиболее физически обоснована линейная зависимость типа $y = a + bx$. Не случайно это приближение лежит в основе метода МО ЛКАО. Данная задача предполагает следующий способ решения. Выдвигается гипотеза: случайная величина y при фиксированном значении величины x распределена нормально с математическим ожиданием $M_y = a + bx$ и дисперсией Dy , не

зависящей от x . При наличии результатов наблюдений над парами x_i и y_i предварительно вычисляются средние значения M_y и M_x , а затем производится оценка коэффициента b . После этого вычисляется оценка для a и производится проверка значимости полученных результатов. Таким образом, регрессионный анализ является мощным, хотя и далеко не всегда допустимым расширением корреляционного анализа, решая всё ту же задачу оценки связей в сложной системе.

Более подробного рассмотрения требует множественная или многофакторная регрессия по той простой причине, что она лидировала по числу публикаций, связанных с QSAR, вплоть до начала 90-х годов прошлого столетия и, наряду с методом ФКСП, легла в основу всех современных подходов к анализу КССА. Рассмотрим линейную модель вида: $y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_ix_i$. Изучение связи между тремя и более связанными между собой признаками и носит название множественной регрессии. При исследовании зависимостей методами множественной регрессии задача формулируется так же, как и при использовании парной регрессии, т.е. требуется определить аналитическое выражение связи между результативным признаком (y) и факторными признаками ($x_1, x_2, x_3 \dots, x_i$) найти функцию: $y = f(x_1, x_2, x_3 \dots, x_i)$. Построение моделей множественной регрессии для исследования КССА включает несколько этапов:

- выбор формы связи (обычно предполагается ее линейный характер, т.к. дать физическое обоснование нелинейным моделям гораздо труднее);
- отбор независимых и значимых дескрипторов;
- обеспечение достаточного количества молекул совокупности для получения несмещенных оценок.

Важным этапом построения уже выбранного уравнения множественной регрессии являются отбор и последующее включение факторных признаков. Сложность формирования уравнения множественной регрессии заключается в том, что почти все факторные признаки находятся в зависимости один от другого. Проблема размерности модели связи, т. е. определение оптимального числа факторных признаков, является одной из основных проблем построения множественного уравнения регрессии (*это неудобство в большинстве современных алгоритмов прогнозирования устранено*). С одной стороны, чем больше факторных признаков включено в уравнение, тем оно лучше описывает явление. Однако модель размерностью 100 и более факторных признаков сложно реализуема и требует больших затрат машинного времени (строго говоря, ограничения, обусловленные дефицитом машинного времени, в настоящее время также сняты; поэтому особую остроту приобрел дефицит идей). Сокращение размерности модели за счет исключения второстепенных, физически и статистически несущественных факторов способствует простоте и качеству ее реализации. *В то же время построение модели регрессии малой размерности может привести к тому, что такая модель будет недостаточно адекватна исследуемым явлениям и процессам.* Проблема отбора факторных признаков

для построения моделей взаимосвязи может быть решена на основе эвристических или многомерных статистических методов анализа.

Наиболее приемлемым способом отбора переменных является пошаговый регрессионный анализ. Сущность данного метода заключается в последовательном включении переменных в уравнение регрессии и последующей проверке их значимости; в свою очередь различают «прямой метод» (переменные включают в модель поочередно) и «обратный» (сначала в модель включают все переменные, а затем удаляют поочередно, пока не останутся самые лучшие). Наш многолетний опыт работы с множественно регрессией привел к выводу, что более эффективным по времени является именно «обратный» метод пошагового отбора.

При проверке значимости добавленной переменной определяется, насколько уменьшается сумма квадратов остатков и увеличивается величина множественного коэффициента корреляции. Одновременно осуществляется исключение переменных, ставших незначимыми на основе t-критерия Стьюдента. Переменная является незначимой, если ее включение в уравнение регрессии только изменяет значение коэффициентов регрессии, не уменьшая суммы квадратов остатков и не увеличивая их значения.

Взаимная зависимость отдельных дескрипторов, обуславливающих моделируемый биологический эффект, носит название мультиколлинеарности и вызывает изменение смысла интерпретации коэффициентов регрессии и осложняет процесс определения наиболее существенных факторных признаков. Одним из индикаторов определения наличия мультиколлинеарности между признаками является превышение парным коэффициентом корреляции величины 0,8 (некоторые авторы рекомендуют величину 0,75). Устранение мультиколлинеарности заключается в удалении соответствующих переменных.

Качество уравнения регрессии зависит от степени достоверности и надежности исходных данных и длины рядов химических соединений. В общем случае следует стремиться к увеличению числа молекул, так как большой объем наблюдений является одной из предпосылок построения адекватных статистических моделей. С другой стороны, *при достижении выборкой числа порядка 10^3 , добавление новых объектов существенного влияния на параметры и устойчивость модели уже не оказывает.*

Уравнение множественной регрессии имеет вид: $y = a_0 + a_1x_1 + \dots + a_ix_i$

Коэффициенты a_i вычисляются при помощи систем нормальных уравнений. Например, для вычисления коэффициентов регрессии в случае уравнения с двумя независимыми переменными система нормальных уравнений имеет вид:

$$\begin{cases} na_0 + a_1 \sum x_1 + a_2 \sum x_2 = \sum Y \\ a_0 \sum x_1 + a_1 \sum x_1^2 + a_2 \sum x_1x_2 = \sum x_1Y \\ a_0 \sum x_2 + a_1 \sum x_1x_2 + a_2 \sum x_2^2 = \sum x_2Y \end{cases}$$

Проверка адекватности регрессионных моделей заключается в контроле значимости каждого коэффициента регрессии с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Наиболее сложным этапом, имеющим, по сути, философский оттенок и завершающим регрессионный анализ, является интерпретация уравнения, т. е. перевод его с языка статистики и математики на язык химика и фармаколога. Обычно интерпретация моделей регрессии осуществляется методами той отрасли знаний, к которой относятся исследуемые явления. Но всякая интерпретация начинается со статистической оценки уравнения регрессии в целом и оценки значимости входящих в модель дескрипторов, т. е. с выяснения, как они влияют на величину результативного признака. Чем больше величина коэффициента регрессии, тем значительнее влияние данного признака на моделируемую активность. Знаки коэффициентов регрессии говорят о характере влияния.

После подтверждения адекватности модели реализуются три основных случая:

1. Построенная модель на основе проверки по *F*-критерию Фишера в целом адекватна, и все коэффициенты регрессии значимы. Такая модель может быть использована для прогнозирования или объяснения взаимосвязи;
2. Модель по *F*-критерию Фишера адекватна, но часть коэффициентов регрессии незначима. В этом случае модель пригодна для объяснения общей связи, но не для прогнозирования;
3. Модель по *F*-критерию Фишера адекватна, но все коэффициенты регрессии незначимы. В этом случае модель считается неадекватной.

И, наконец, два важных замечания о применимости метода множественной регрессии для построения моделей КССА (редакция материалов компании StatSoft (<http://www.statsoftinc.com>), выпускающей надежный пакет статобработки «STATISTICA»):

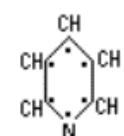
– чем меньше разброс значений остатков около линии регрессии по отношению к общему разбросу значений, тем лучше прогноз. Например, если связь между переменными *x* и *y* отсутствует, то отношение остаточной изменчивости переменной *y* к исходной дисперсии равно 1,0. Если *x* и *y* жестко связаны, то остаточная изменчивость отсутствует, и отношение дисперсий будет равно 0,0. В большинстве случаев отношение будет лежать где-то между этими экстремальными значениями, т.е. между 0,0 и 1,0. Величина 1,0 минус это отношение называется *R*-квадратом или коэффициентом детерминации. Это значение непосредственно интерпретируется следующим образом. Если имеется *R*-квадрат, равный 0,4, то изменчивость значений переменной *y* около линии регрессии составляет 1-0,4 от исходной дисперсии; другими словами, 40% от исходной изменчивости могут быть объяснены, а 60% остаточной изменчивости остаются необъясненными. В идеале желательно иметь объяснение если не для всей, то хотя бы для большей части исходной изменчивости. Значение *R*-квадрата является индикатором степени подгонки модели к данным (значение *R*-квадрата близкое к 1,0 показывает, что модель объясняет почти

всю изменчивость соответствующих переменных). Исходя из вышеизложенного, более правильно включать в научные отчеты и публикации не R , а R^2 ;

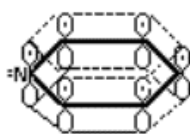
– множественная регрессия – предоставляет пользователю возможность включить в модель все дескрипторы, какие только можно, в надежде, что некоторые из них окажутся значимыми. Это происходит из-за того, что извлекается выгода из случайностей, возникающих при простом включении большого числа переменных. Фиксация случайных зависимостей возможна и тогда, когда мало число наблюдений. Интуитивно ясно, что едва ли можно делать выводы из анализа 150 молекулярных дескрипторов, принадлежащих 10-30 структурам. Большинство авторов советуют использовать, по крайней мере, от 50 наблюдений (респондентов) на одну переменную, в противном случае оценки регрессионной линии будут очень ненадежными и, скорее всего, невоспроизводимыми для желающих повторить это исследование.

2.3. Химические особенности гетероциклических соединений

К ароматическим гетероциклам относятся такие соединения, которые проявляют свойства, подобные бензолу, а именно, более склонны к реакциям замещения, чем к реакциям присоединения, устойчивы по отношению к восстановителям и окислителям и т.д.. Указанные особенности в химическом поведении гетероциклов связаны с их электронным строением. Обычно критерием ароматичности молекул является плоский цикл сопряженных связей, имеющий $4n+2$ электронов (правило Хюккеля), где n – ноль или любое положительное целое число. При $n=1$, количество электронов равно 6, что соответствует числу p -электронов в бензоле. Такая же 6π -электронная сопряженная система имеется и в гетероциклических молекулах. Рассмотрим электронное строение шестичленных гетероциклов, например пиридина, отличающегося от бензола тем, что вместо группы $-CH$ в пиридине содержится азот. Измерения длины связей, дипольных моментов, УФ спектров показало, что длина связей в гетероциклах имеет промежуточное значение между простыми и двойными связями. Для образования 6π -электронной системы в молекуле пиридина используется по одному электрону от каждого атома углерода и азота, при этом у атома азота остается по свободной паре электронов на sp^2 -орбитали вне кольца, обеспечивая тем самым основной характер пиридина и подобных ему соединений. Такая система называется « π -недостаточной», а азот в этом случае называется «пиридиновым».



пиридин

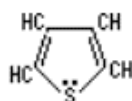


сопряженная система пиридина

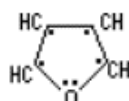


электронное строение атома азота в пиридине

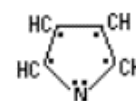
В пятичленных или небензоидных гетероциклах также образуется секстет делокализованных сопряженных p-электронов.



тиофен



фуран

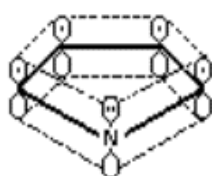


пиррол

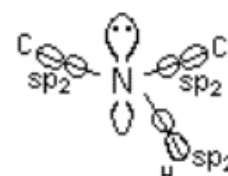
Каждая молекула гетероцикла – плоский пятиугольник. Рассмотрим электронное строение гетероциклов на примере пиррола.



пиррол

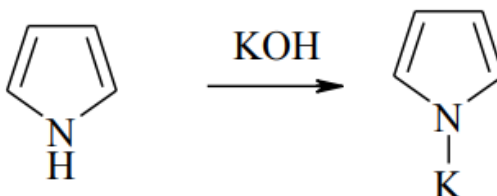


сопряженный π -секстет
в пирроле



электронное строение
атома азота в пирроле

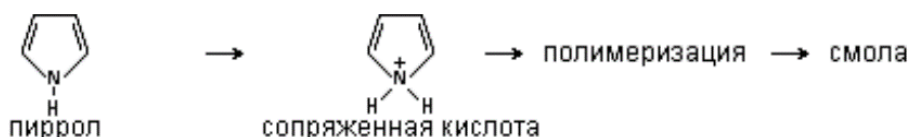
Электроны азота под влиянием соседних связей располагаются также особым образом, а именно три электрона на sp^2 -гибридных орбиталях, участвуют в образовании трех σ -связей (две расходятся на атомы углерода, а одна на водород). Негибридованная p-орбиталь с неподделенной парой электронов входит в сопряженный ароматический секстет. Так как шестиэлектронное облако приходится на пяти-центровую систему, то она называется суперароматической в отличие от шестичленных гетероциклов, а азот называется «пиррольным». За счет пиррольного азота гетероциклическая система приобретает слабокислотный характер, т.е. водород в $-NH-$ группе может замещаться на металлы.



пиррол ($pK_a=16,4$)

пиррол калий

При действии кислот пиррол проявляет ацидофобные свойства, при этом происходит нарушение ароматических свойств и образование неустойчивой диеновой системы с последующей полимеризацией.

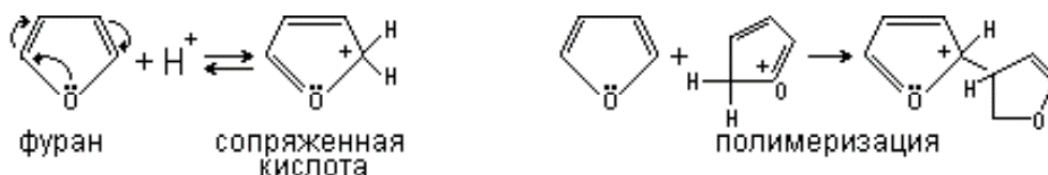


пиррол

сопряженная кислота

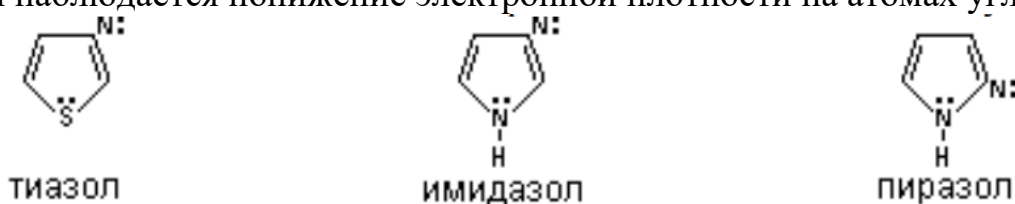
В фуране и тиофене секстет образуют 4 электрона от атомов углерода, а два электрона являются свободной парой атома кислорода и серы, т.е. также являются суперароматической системой и фактически лишены кислотных свойств.

Фуран, подобно пирролу ацидофобен, протонирование под действием кислот происходит, по-видимому предпочтительно по углеродным атомам ядра.

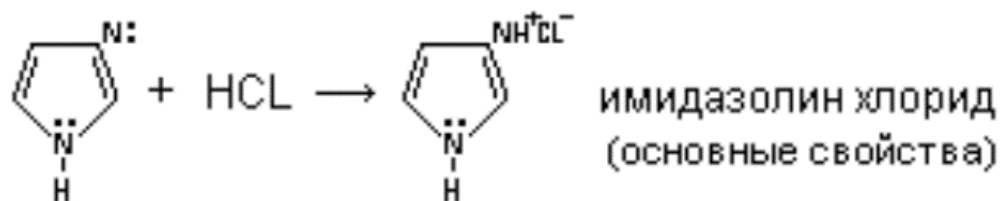


Образующиеся таким образом сопряженные кислоты атакуют молекулу фурана, в результате чего происходит полимеризация. Тиофен по свойствам напоминает бензол, более устойчив по отношению к кислотам, а сера инертна к различным реагентам.

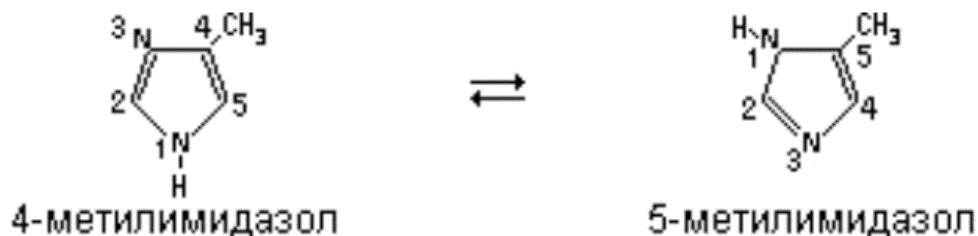
В соединениях с двумя гетероатомами, таких как тиазол, имидазол и пиразол наблюдается понижение электронной плотности на атомах углерода.



Гетероатомы в этих соединениях по разному используют свои электроны, так в тиазоле у атома азота свободная пара электронов вне цикла и не включается в ароматический секстет, поэтому тиазол является основанием, как и пиридин (пиридиновый атом азота), в имидазоле один атом азота «пиридиновый», проявляющий слабо основные свойства, а другой атом азота имеет «пиррольный характер», проявляющий кислотные свойства, т.е. водород может замещаться на металл.



Таким образом, имидазол представляет собой амфотерное соединение. В такого типа соединениях атом водорода становится подвижным и в результате могут образовываться таутомерные формы прототропного характера.



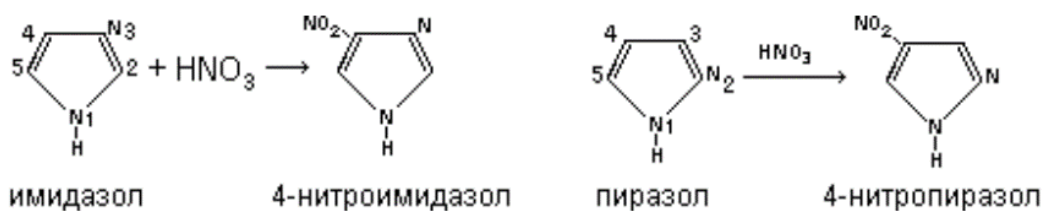
Поэтому для приведенных выше соединений используют обозначения 4-/5-/метилимидазол, это значит, что метильная группа в одном таутомере занимает положение 4, а в другом 5. Кроме того, за счет водородных связей в данных соединениях могут образовываться ассоциаты.



В пиразоле атомы азота расположены рядом, и в отличие от имидазола, он не проявляет ацидофобных свойств, а обладает ясно выраженным основным характером. Ароматические свойства гетероциклов проявляются и в способности этих соединений вступать предпочтительно в реакции электрофильного замещения. При этом у пятичленных гетероциклов по сравнению с шестичленными данное свойство проявляется в большей степени. Объясняется такой факт тем, что перераспределение электронной плотности в пятичленных гетероциклах происходит с повышением нуклеофильности атомов углерода и особенно в положении 2 или 5. Если же заняты эти места, то заместитель направляется к 3-му или 4-му атому углерода. При этом более активными в данной реакции являются пиррол и фуран. Тиофен же менее реакционноспособен. Имидазол и пиразол также вступают в реакции электрофильного замещения, но менее активно по сравнению с моногетероциклами. Заместители атакуют в пиразоле и имидазоле положение 4. Так как в качестве электрофильных реагентов выступают кислоты, такие как азотная, серная и др., то в данных реакциях учитывается ацидофобность некоторых гетероциклов и в качестве реагентов используют не азотную кислоту, а ацетилнитрат, а при сульфировании используют комплекс серного ангидрида с пиридином. Интересно ведет себя в данных реакциях тиофен, занимая промежуточное положение по реакционной способности между бензолом и фураном. Ацидофобность он не проявляет, поэтому нитруется азотной кислотой, а сульфируется концентрированной серной кислотой, а также комплексом ангидрида с пиридином.

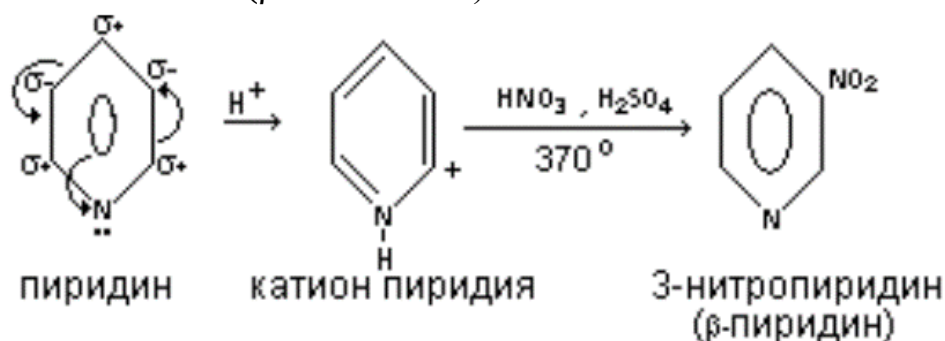


Пиразол и имидазол более устойчивы к действию кислот, поэтому они нитруются и сульфируются соответствующими кислотами в положение 4 или 5.



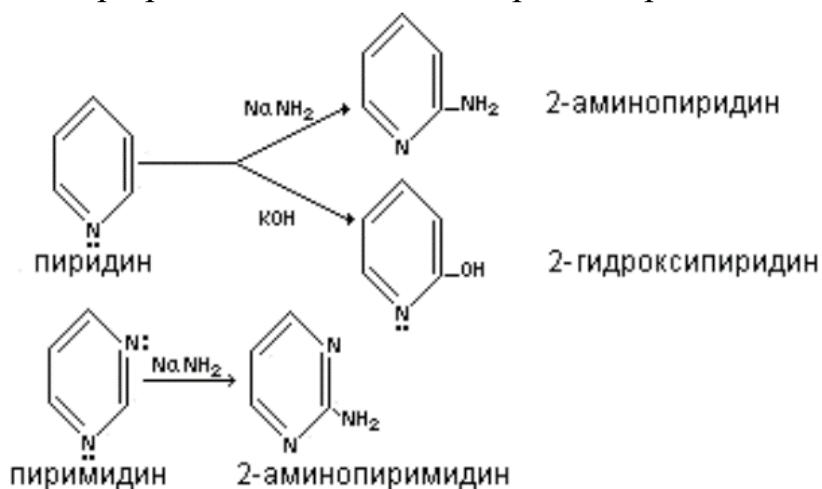
В пиридине электрофильное замещение осуществляется с трудом, отчасти вследствие дезактивирующего действия гетероатома на ядро, отчасти потому, что в кислой среде кольцо еще больше дезактивируется вследствие

образования иона пиридиния. Причем пиридин дает продукт замещения в основном в положение 3 (β - положение).

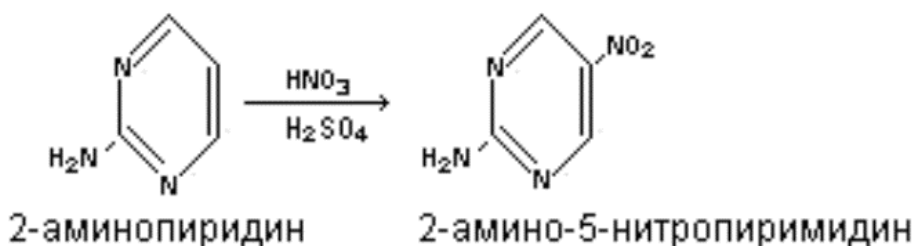


Для гетероциклов с пиридиновым азотом наиболее характерны реакции нуклеофильного замещения. При этом нуклеофильные агенты (амид натрия, алкил лития, гидроокись калия и др.) поступают в положение, где атом азота оказывает наиболее активирующее действие. В пиридине активным в этих реакциях являются 2,/ α /-положение. В α -положение нуклеофильные реагенты вступают и в соединения с двумя гетероатомами, например, в пиримидине. Пиримидин, благодаря наличию двух атомов азота в кольце, имеет пониженную электронную плотность в положении 2,4 и 6.

Поэтому при аминировании пиримидина амидом натрия образуется 2-амидопиримидин, при реакции с KOH – 2-гидроксипиримидин и т.д.

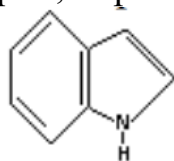


Электрофильные реагенты / / с трудом атакуют пиримидиновое кольцо, но если в кольце имеются дополнительные электронодонорные группировки – NH_2 , OH и др., то атака облегчается и реагент вступает в положение -5, где наиболее отрицательный заряд.

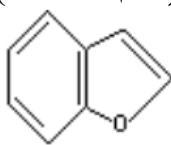


Следует отметить, что гетероциклы с большим количеством гетероатомов в основном близки по химическим свойствам к рассмотренным

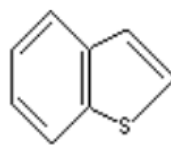
выше моногетероциклов. Подобная аналогия наблюдается и в гетероциклах с конденсированными системами, таких как индол, бензофуран, изохинолин, пурин, пиримидин и др. (Таблица 2).



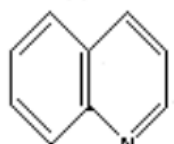
Индол



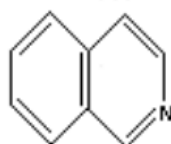
Бензофуран



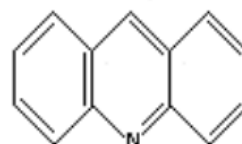
Бензотиофен



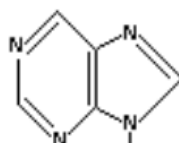
Хинолин



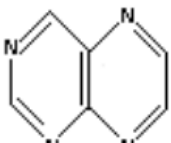
Изохинолин



Акридин

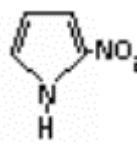
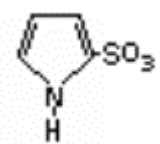
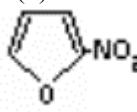
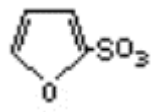


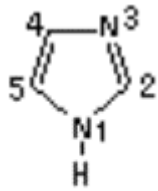
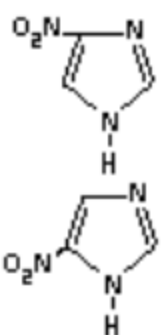
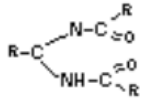
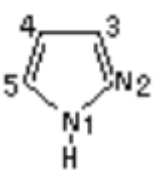
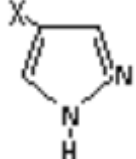
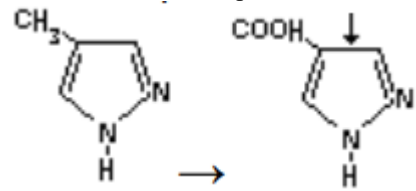
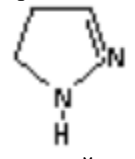
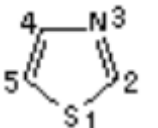
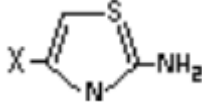
Пурин

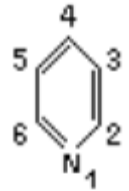
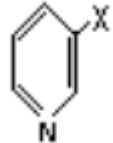
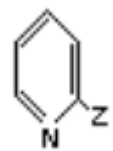
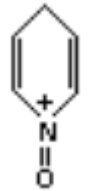
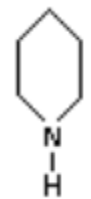


Птиридин

Таблица 2. Физико-химические свойства некоторых гетероциклических соединений

Формула Название	Физическ ие свойства	Кислотно- основные свойства		Электрофильное замещение		Окисление	Восстановление
		K _B	Реакции	Реагент х ⁺	Продукты реакции		
Пятичленные гетероциклы с одним гетероатомами							
 пиррол	Жидк. Слабораств .в сп., эф. t _{пл} = 130 С t _к = 18 С	5 × 10 ⁻⁴	Слабо- кислотные, замещение водорода в - NH группе на маталл (реагент NaNH ₂)	Ацидофобен NO ₂ ⁺ нитрование ацетилнитратом SO ₃ сульфирование с помощью комплекса C ₅ H ₅ N* SO ₃	Направление заместителя 2- (α)положение  2-(α)нитропиррол  2- (α)сульфопиррол	С трудом с разрывом цикла	 пирролин ↓ [H]  пирролидин
 фуран	Жидк. Не растворим в воде, сп.,эф. t _к = 30 С		Нейтрален	NO ₂ ⁺ нитрование азотной кислотой в уксусном ангидриде(ацидофоб ен) SO ₃ сульфирование	В 2-(α)положение  2-(α)нитрофуран  2-(α)сульфофуран		С трудом. Под действием металлического натрия в жидком аммиаке образует тетрагидропроизводные  2-тиофан
Пятичленные гетероциклы с двумя гетероатомами							

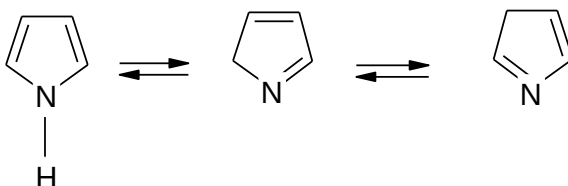
 имидазол	Крист.раств в воде и орг раств tпл= 90 °C tк= 256 °C	1×10^{-7}	амфотерен	Нитруется, сульфируется в кисл. среде	 В положение – 4 (5)	Под действием $KMnO_4$ Диацильное производное 	
 пиразол	Крист.раств в воде и орг раств tпл= 0 70°C tк= 188°C	3×10^{-12}	Амфотерен утойчив к действию кислот	Нитруется, сульфируется в жестких условиях	С трудом в положение – 4 (X⁺) 	Под действием $KMnO_4$ окислятся гомологи пиразола 	Восстановление водородом / кат Pt  неустойчив
 тиазол	Жидк хорошо раств в воде и орг раств tк=117°C	3×10^{-12}	Подобен пиридину, слабоосновн ые свойства	Нитруется, сульфируется	В положении 5 / с трудом При наличии в положении 2 электрононор заместителей/ 		
Шестичленные гетероциклы							

 пиридин	Жидк хорошо раств в воде и орг раств tпл= – 42 °C tк= 115 °C	1,7 × 10^{–9}	Основные	Электрофильное замещение в положении 3,5 с трудом 	Нуклеофильное замещение (Z[–] , – NH₂ ,OH) 	С трудом H₂O₂  Окись пиридиния	[H]  пиперидин
--	---	----------------------------------	-----------------	---	--	---	---

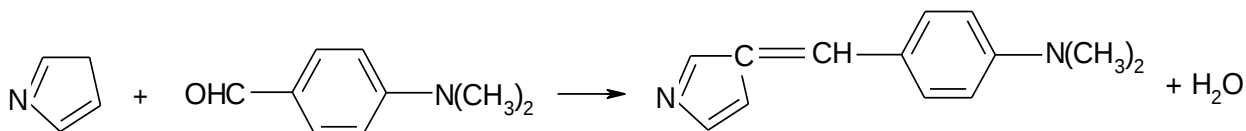
2.4. Лабораторный практикум

Определение пиррола и его производных Гетероциклические азотсодержащие соединения, пирролы и их производные (индол, карбазол, ацетиндоксил), которые содержат группу $=NH$, т.е. которые можно считать вторичными аминами, при сплавлении с дихлорфлуоресцеином и безводным хлоридом цинка дают желтовато-коричневые родаминовые красители. При растворении в разбавленной соляной кислоте эти красители дают голубую флуоресценцию, наблюдаемую в ультрафиолетовом свете.

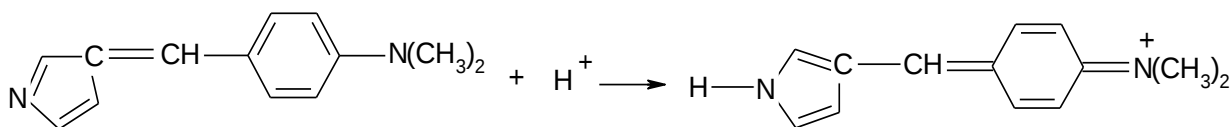
Эти соединения можно определять с п-диметиламинобензальдегидом в слабокислом спиртовом растворе по образованию красно-фиолетовой окраски. В этом случае $=CH_2$ -группа одной из таутомерных форм пиррола



реагирует с выделением молекулы воды:



Продукт присоединяет протон, в результате чего получается хиноидное соединение красновато-фиолетового цвета:



Экспериментальная часть.

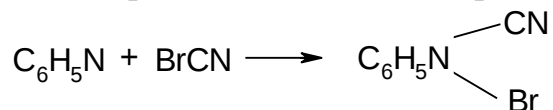
На предметном стекле смешивают каплю эфирного или спиртового раствора анализируемого вещества с 2 каплями 5%-ного раствора п-диметиламинобензальдегида в концентрированной соляной кислоте. В случае пиррола или реакционноспособных производных пиррола капля мгновенно или спустя короткое время окрашивается в фиолетовый цвет. Предел обнаружения пиррола составляет 0,04 мкг, индола 0,06 мкг и триптофана 0,1 мкг.

Карбазол (дибензопиррол) не вступает в эту реакцию. Первичные алифатические и ароматические амины образуют с реагентом окрашенные основания Шиффа, однако в этих случаях наблюдается оранжевая, желтая или коричневая окраска и чувствительность реакции намного ниже.

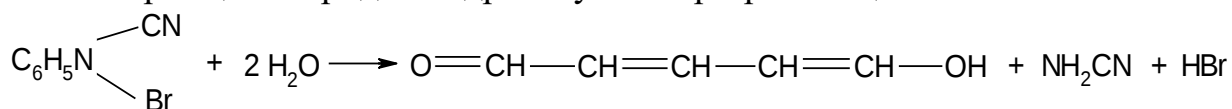
К качественной реакции пиррола можно отнести покраснение сосновой лучины, смоченной соляной кислотой, в присутствии его паров. Индол и карбазол в этих условиях окрашивают сосновую лучину в вишнево-красный цвет.

Пиридин и его производные

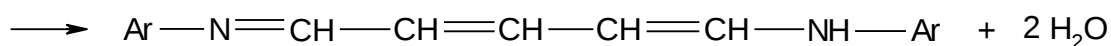
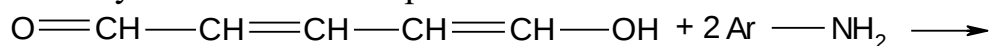
Пиридин и его производные реагируют с бромцианом и первичными ароматическими аминами с образованием окрашенного основания Шиффа глутаконового альдегида. Под влиянием бромциана происходит повышение степени окисления азота в пиридиновом кольце с трех до пяти:



Бромцианпиридин гидролизуется с разрывом цикла:



и получающийся глутаконовый альдегид реагирует с ароматическим амином, используемым в качестве реагента:



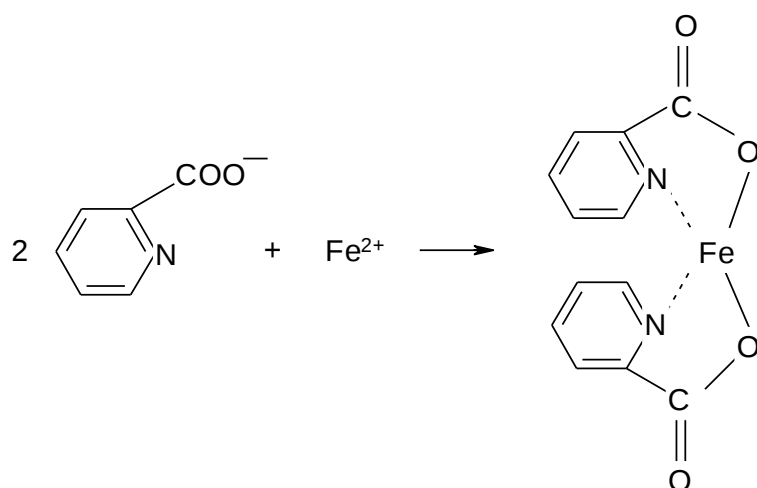
Все производные пиридина, не имеющие заместителей в α, α' -положениях, реагирует аналогичным образом. Они дают замещенный глутаконовый альдегид, а затем окрашенные основания Шиффа.

Экспериментальная часть.

На предметном стекле смешивают каплю раствора анализируемого вещества с каплей насыщенного раствора брома и каплей 2%-ного раствора цианида калия. Затем добавляют каплю суспензии бензидина (суспензию бензидина готовят добавлением к 100 мл водного раствора солянокислого бензидина 1 г ацетата натрия, который осаждает бензидин в виде тонкой суспензии; перед использованием суспензию взбалтывают). Красная окраска капли анализируемого вещества возникает сразу или через несколько минут в зависимости от количества вещества. Предел обнаружения пиридина составляет 0,2 мкг, β -метиламинопиридина 0,1 мкг, никотинамида и изоникотинового альдегида 1 мкг и β -николина и изоникотингидразида 2 мкг.

Производные пиридина дают окрашенные соединения с 2,4-динитрофторбензолом или цианурхлоридом. Заместители в пиридиновом кольце влияют на скорость реакции, окраску продукта и его индикаторные свойства.

α -Пиридинкарбоновые кислоты и их производные можно определить с помощью ионов железа (II) в водных или водно-спиртовых растворах. При этом появляется бледно-желтая окраска, устойчивая в разбавленных растворах кислот:



Экспериментальная часть.

Каплю раствора анализируемого вещества смешивают с каплей 1%-ного раствора сульфата железа (II) в уксусной кислоте. Возникает оранжевая, желтая или красная окраска. Определению мешают фенолы, так как дают фиолетовую окраску с ионами железа (III), которые всегда присутствуют в соединениях железа (II). Предел обнаружения составляет 5 мкг для пиколиновой кислоты и 10 мкг для хинальдиновой кислоты.

Занятие 3.

Тема занятия: Дизайн лекарственных веществ природного происхождения для моделирования их биологической активности. Алкалоиды.

Цель занятия: Изучить современные подходы к дизайну лекарственных веществ природного происхождения для моделирования их биологической активности.

Вопросы к занятию:

1. Формирование протоарсенала природных лекарственных средств. Лекарственные средства растительного происхождения.
2. Формирование протоарсенала природных лекарственных средств. Лекарственные средства бактериального происхождения.
3. Комбинаторная химия.
4. Ввод химической структуры в программе HyperChem
5. Оптимизация геометрии в программе HyperChem
6. Основные понятия, современная химическая классификация алкалоидов.
7. Химические особенности алкалоидов: хинин.
8. Химические особенности алкалоидов: папаверин
9. Химические особенности алкалоидов: морфин, кодеин
10. Химические особенности алкалоидов: атропин, кокаин

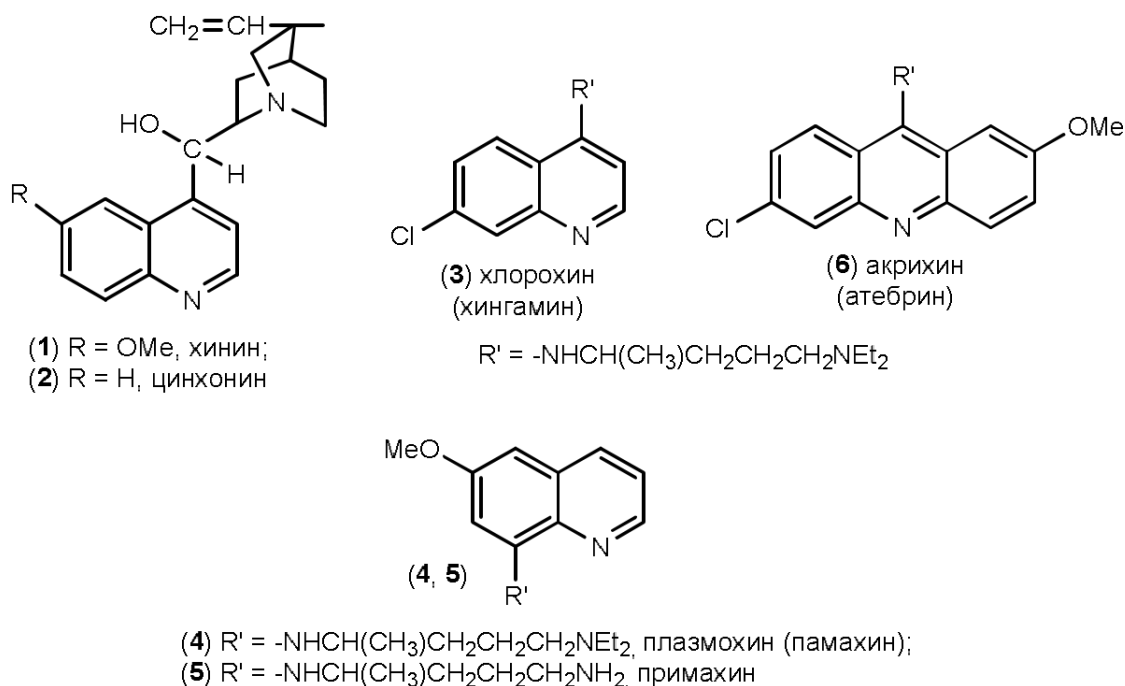
3.1 Формирование протоарсенала природных лекарственных средств. Лекарственные средства растительного происхождения.

Борьба с болезнями ведется человеком с давних пор. Первые лекарственные средства люди открывали случайно. Древние люди получали их из «природной аптеки»: растений (листьев, коры, цветов, плодов, корней, стеблей), животных и минералов. В течение тысячелетий в Индии и Китае применяют с успехом народные лечебные средства, приготовляемые из многих природных источников (ныне это направление лечения называют, в отличие от официальной медицины, этномедициной и этнофармакологией). Уже в древних текстах насчитывают более 3 тысяч лекарственных растений, употребляемых с 2800 года до новой эры. Одно из современных лекарств - эфедрин, введенный в официальную медицину в 1920-х годах для остановки кровотечений и как противокашлевое средство, использовался в Китае в течение почти 5 тыс. лет в виде неочищенного растительного лекарства «ма хуанг». В работах Плиния имеется ссылка на лекарственное растение «эфедрон», которое использовали в древности для тех же лечебных целей. В Индии насчитывают 7500 лекарственных растений, которые применяются в народной медицине, и, в частности, *Rauwolfia serpentina*, содержащая антигипертензивный агент - алкалоид резерпин. Еще в старину в России составлялись вертограды - рукописные травники с описанием способов приготовления лекарств из растений «для лечьбы занемогших». Народные лекари многих стран готовили лекарства из пчелиного прополиса, горного

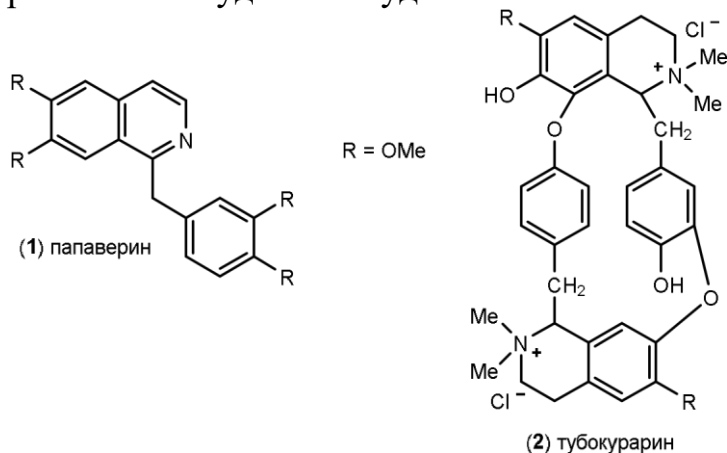
мумие, бобровой струи, ядов змей и скорпионов, мышинного помета, пантов пятнистого оленя и т. д. Вплоть до настоящего времени значение медикаментозных средств, получаемых в виде настоек, экстрактов и отваров (главным образом из растений) сохраняется на высоком уровне (в России подобные лекарственные средства составляют примерно 30% от общего числа лекарственных препаратов). Начиная с 17-го до начала 20-го века современный арсенал ЛВ пополнялся главным образом случайными открытиями растительных лекарственных средств. Первые индивидуальные природные соединения, обладающие лечебным действием (так называемое «активное начало»), начали выделять из растений лишь в 19 веке. Так, в 1803 году был впервые выделен алкалоид морфин. Затем было установлено, что чай, кофе, какао и орехи кола содержат один и тот же алкалоид кофеин. Этим путём осуществлялось эмпирическое формирование протоарсенала лекарственных средств растительного происхождения. Эти лекарства дали первые структуры-лидеры.

Рассмотрим несколько примеров широко известных природных структур-лидеров, которые были получены на основе растительных материалов. Их использовали в качестве ЛВ и на их основе затем были созданы кандидаты-аналоги и целые ряды (или серийные группы) лекарственных препаратов.

Алкалоид хинин. Наиболее известным и эффективным средством борьбы против всех видов малярийного плазмодия является хинин - алкалоид коры хинного дерева (*Cinchona*), культивируемого в Азии (Индонезия) и Южной Америке. Его кора (после случайного открытия её лечебных свойств) использовалась при лечении малярии еще в 17-м веке. В чистом виде лидерная молекула хинина была выделена в начале 19-го века, а её полный синтез осуществлен в 1945 году. Насчитывается более 20 алкалоидов, хинного дерева, из которых цинхонин применяют для лечения тропической лихорадки. На основе хинина позднее был создан ряд упрощённых структур, эффективных для борьбы с малярией



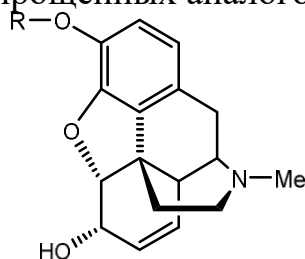
Алкалоиды папаверин и тубокурарин. К лидерному ЛВ изохинолинового ряда относится такой известный спазмолитик, как опиумный алкалоид папаверин (1). Папаверин был выделен в 1884 г. из млечного сока незрелых плодов мака (опия), где он содержится в количестве до 1%. Его назначают при стенокардии, спазмах желудка, кишечника, бронхов, периферических сосудов и сосудов головного мозга.



К этому же химическому классу соединений-лидеров принадлежит алкалоид яда кураре тубокурарин (2), который в медицине нашел безопасное применение в качестве миорелаксанта, вызывающего длительное расслабление скелетной мускулатуры при операциях под наркозом. Это четвертичное основание выделяют из *Chondrodendron tomentosum*.

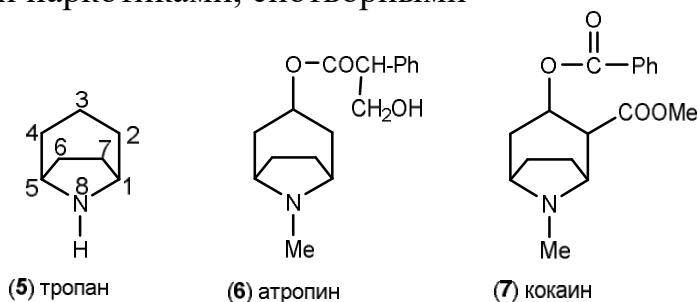
Алкалоиды морфин и кодеин. Еще в начале 19-го века работы по изучению растительных материалов привели к выделению из опиума (высушенного сока незрелых семян мака снотворного, *Papaver somniferum*) морфина (3), а затем и других опиумных алкалоидов - кодеина (4) и тебаина. Природный морфин (только левовращающий изомер) обладает мощным подавлением физического и психического ощущения сильной боли, а также седативной активностью и подавлением рефлекса кашля. Однако он вызывает привыкание и пристрастие. Кроме того, у него имеются побочные

эффекты, связанные со снижением двигательной способности кишечника (запоры). Полный синтез морфина осуществлен лишь в 1952 году, а сложность предлагаемых методов его синтеза до сих пор не позволяет реализовать их в коммерческих масштабах. Кодеин (4) - более слабый анальгетик и применяется только в качестве противокашлевого средства или как пролекарство для обезболивания. Морфин оказывает обезболивающее действие и стал благодаря этому основным лидером для формирования впоследствии группы его упрощённых аналогов.



(3) R = H, морфин;
(4) R = CH₃, кодеин

Алкалоиды атропин и кокаин. К группе природных соединений, имеющих в качестве базового гетероцикла 8-азабицикло октановое ядро (производное тропана 5) относятся алкалоиды атропин (6) и кокаин (7). Атропин (6) содержится в растениях семейства пасленовых (Solanaceae) и его выделяют в промышленных масштабах экстракцией из корней красавки, семян дурмана и других растений. Он обладает свойствами спазмолитика и его назначают при спазмах органов брюшной полости (язвенной и другой этиологии). Он сильно расширяет зрачок и применяется в глазной практике для диагностики и лечения. Атропин применяют также в качестве антидота при отравлении наркотиками, снотворными



(5) тропан

(6) атропин

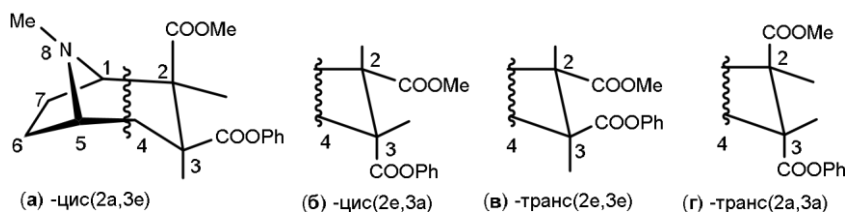
(7) кокаин

и такими ядами как мускарин и др. Атропин является антагонистом указанных веществ, вытесняя их с биорецепторов (например, с мускариновых холинорецепторов). Взаимодействуя с холинорецепторами, атропин блокирует доступ к ним молекул периферического нейромедиатора возбуждения - ацетилхолина, что приводит к расслаблению мышц и снятию спазма.

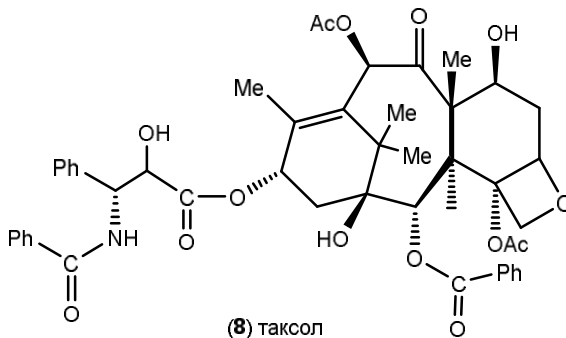
Алкалоид кокаин (7) содержится в листьях (0,5%) южноамериканского кустарника (Erythroxylon Coca), который культивируется также в Индии, Шри Ланке и Индонезии. Кокаин используют для поверхностной (местной) анестезии слизистых оболочек глаз, рта, носа и гортани. Он возбуждает нервные окончания и действует также на ЦНС,

вызывая эйфорию и снимая усталость. Однако возбужденное состояние сменяется на угнетенное состояние, а при длительном применении кокаина развивается привыкание и болезненное пристрастие к нему (кокаинизм). (Кокаин относится не только к наркотикам, но и к сильным токсинам). Кокаин был впервые выделен в индивидуальном виде в 1860-м году, а синтезирован в 1902м году. Он существует в виде четырех изомеров (7а-г), из которых *транс*(*e,e*)-изомер (7в) - наиболее устойчив, а наиболее активен (-)кокаин (7а) с *цис*(2а,3е)-конфигурацией.

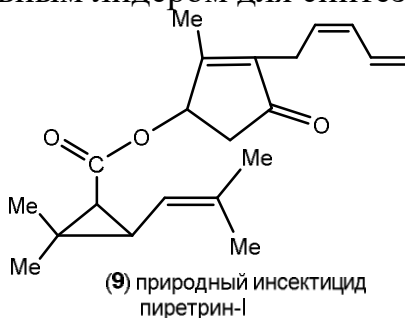
Стереизомерные кокаины (7а-г)



Таксол. Из относительно недавно открытых в растительных материалах структур-лидеров является таксол. В настоящее время его считают одним из наиболее перспективных веществ, обладающих противоопухолевой активностью. Этот терпеноид (8), выделенный из *Taxus brevifolia* (род можжевельника), представляет лидерную структуру для дизайна новых ЛВ.

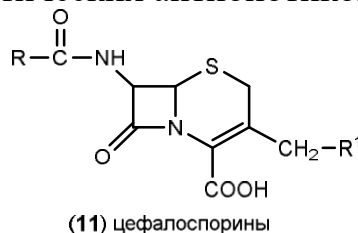
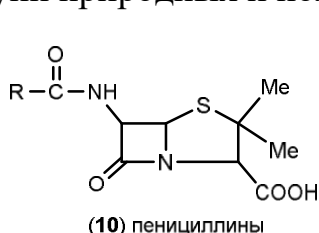


Пиретрины. Пиретрум (или «персидский порошок», приготовляемый из долматской ромашки) издавна применяли в санитарии, а также для борьбы с эктопаразитами животных, с вредителями продовольственных запасов, с насекомыми, портящими шерсть, кожу, ткани. Его основную часть составляет пиретрин-I (9). Он проявляет биодействие, блокируя нейрональные натриевые каналы у насекомых. В настоящее время его структура выбрана явным лидером для синтеза многочисленных аналогов.



3.2. Формирование протоарсенала природных лекарственных средств. Лекарственные средства бактериального происхождения.

Пенициллины (10) и цефалоспорины (11). История этих антибиотиков (на схеме приведены обобщённые структуры природных и модифицированных ЛП) начинается с первого наблюдения гибели стафилококковых бактерий при контакте с зеленой плесенью *Penicillium* (1929 г.) и последующего выделения из нее в 1940-м году "действующего начала" - пенициллина (**10**, R = CH₂Ph, G- или бензилпенициллин). Во время второй мировой войны пенициллин (**10**) использовался в больших масштабах. Его строение было установлено лишь в 1945 г. с помощью рентгеноструктурного анализа. Для ученых казалось невероятным, что этот антибиотик-метаболит содержал четырехчленный β-лактамный цикл, так как в то время считали, что азетидиновые циклы чрезвычайно неустойчивы. Оказалось, однако, что именно этот гетероцикл является ответственным за антибиотическое действие не только пенициллина, но и цефалоспорины (**11**, метаболит жизнедеятельности гриба) и целого ряда других, открытых много позднее групп природных и полусинтетических антибиотиков.



Эти структуры-лидеры оказались мощными антибиотиками для борьбы с различными заболеваниями - пневмонией, ангиной, дизентерией, раневыми и гнойными инфекциями, вызываемыми грамположительными и грамотрицательными бактериями. Напомним, что многие виды микроорганизмов выделяют вещества, которые ограничивают рост или убивают микроорганизмы других видов. Вещества с подобным биологическим действием называют антибиотиками. Они могут быть также и продуктами жизнедеятельности высших растений и животных, и, возможно являются как бы их химическими средствами защиты от паразитирующих на них макро- и микроорганизмов.

3.3. Комбинаторная химия.

Комбинаторная химия (сочетательная химия), методология химического (в первую очередь, органического) синтеза, имеющая своей целью синтез большого массива однотипных химических соединений (комбинаторных библиотек) наиболее быстрым и экономичным способом, используя специфические подходы и технологии. Необходимость синтеза обширных комбинаторных библиотек возникла в 1990-х гг. и была продиктована запросами тех областей промсти, где поиск веществ с полезными свойствами нередко эффективнее вести путём эмпирического перебора (тестирования) свойств на больших выборках однотипных соединений. Основой для разработки нового направления химического синтеза послужил предложенный в начале 1960-х гг. Р. Меррифилдом

твердофазный пептидный синтез (Нобелевская пр., 1984). Особенно интенсивно методы Комбинаторную химию применяются в фармацевтике (дизайн новых лекарственных средств), при поиске эффективных катализаторов (полимеризации и пр.), дизайне наноматериалов. Для тестирования комбинаторных библиотек разработаны автоматизир. системы работы, производительность которых достигает 100 тыс. образцов в день (т. н. высокопроизводительный скрининг; от англ. screening – просеивание).

На практике комбинаторную химию представляет собой совокупность приёмов и методов комбинирования многообразных исходных химических реагентов для получения как можно более разнообразных массивов химических продуктов путём проведения десятков, сотен, а иногда и тысяч параллельных химических превращений с образованием огромного числа конечных продуктов. Комбинаторная химия *решает задачи*, периодически возникавшие в классическом химическом синтезе, а именно – быстро синтезировать много веществ, как правило, сложных по структуре и достаточно чистых. Разработка новых экономичных и скоростных технологий параллельного синтеза и параллельной очистки веществ достигается разнообразными путями. Вместо стандартного жидкофазного синтеза (одно вещество в одном сосуде за один при-ём) ставится множество синтезов (например, в пластиковой плашке с множеством ячеек, куда вещества вносят многоканальными пипетками). Вместо кипячения с обратным холодильником используют нагревание множества герметичных капсул (в ячеистом термостате или СВЧпечи). Для фильтрования множества веществ используют «сосуды-фильтры» (например, плашки с пористым дном). Упаривание осуществляют вакуумным выораживанием растворителя из центрифугируемых (для предотвращения вспенивания) плашек. Для очистки используют методы параллельной хроматографии, объединяя в блоки множество хроматографических колонок. В методах жидкофазной комбинаторной химии стараются использовать лишь те реакции, которые протекают с высокими выходами и требуют минимум усилий по очистке веществ. Для достижения большего разнообразия продуктов обычные двухкомпонентные реакции заменяют на многокомпонентные.

Мощной технологией комбинаторной химии является твердофазный синтез – проведение реакций на модифицированной полимерной подложке. В этом случае сложная молекула (напр., полипептид требуемой последовательности или сложное гетероциклическое соединение) иммобилизуется («наращивается») на поверхность полимера в ходе последовательности реакций, а затем, на заключительном этапе, отщепляется с твёрдой подложки вследствие к.-л. химических превращений. Поэтому реакции можно проводить при большом избытке реагента, отмывая последний от полимера с целевым веществом и сводя синтез к принципу «чайного пакетика» (пористые пакеты с гранулами полимера последовательно помещают в стаканчики с реагентами). Новой технологией является замена твёрдых полимеров на перфторированные жидкости (не

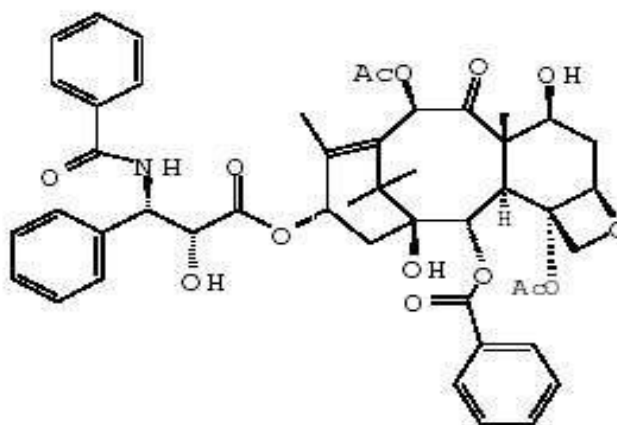
смешивающиеся с водой и стандартными растворителями). Для иммобилизации (перевода вещества в перфторированную фазу) к молекуле исходного реагента присоединяют протяжённый перфторалкильный фрагмент. Это позволяет проводить синтез в эмульсиях с последующим разделением жидких фаз.

Комбинированным методом комбинаторной химии является использование твердофазных реагентов (окислитель, кислота, основание иммобилизованы на полимере). Избыток твёрдого реагента вносят в растворы веществ, а затем отделяют фильтрованием. Другим приёмом является использование т. н. скавенджеров (от англ. scavenger – мусорщик) – в раствор вносят модифицированный полимер, который селективно удаляет из реакционной смеси ненужный реагент, взятый в избытке. Всё шире используются программируемые пром. роботы, выполняющие последовательность рутинных однообразных процедур по выделению и очистке веществ (автоматические синтезаторы).

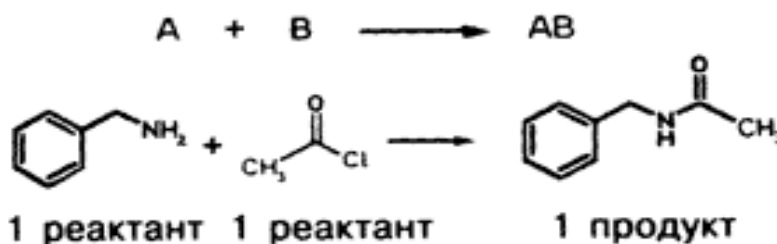
Эффективность использования комбинаторной химии доказана на примерах обнаружения новых лекарственных препаратов и катализаторов.

Источниками молекул для тестирования на биологические свойства могут быть как продукты химического синтеза, так и природные соединения, имеющие молекулы с очень необычной и сложной структурой.

Примером соединения-лидера, найденного с помощью систематического скрининга природных соединений, является таксол – эффективное противораковое средство



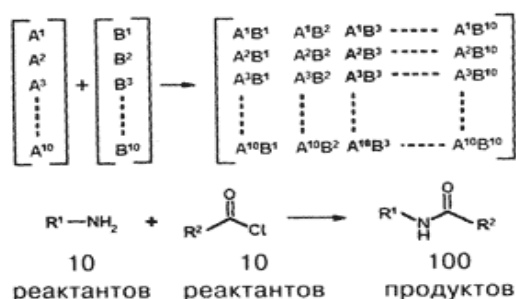
В отличие от классического подхода «одно соединение за другим», главный принцип комбинаторной химии — это одновременный синтез всей библиотеки («параллельный синтез»)



Классический органический синтез

Комбинаторная химия (сочетательная химия) – методология химического (в первую очередь, органического) синтеза, имеющая своей целью синтез большого массива однотипных химических соединений (комбинаторных библиотек) наиболее быстрым и экономичным способом, используя специфические подходы и технологии. Необходимость синтеза обширных комбинаторных библиотек возникла в 1990-х гг. и была продиктована запросами тех областей промышленности, где поиск веществ с полезными свойствами нередко эффективнее вести путём эмпирического перебора (тестирования) свойств на больших выборках однотипных соединений.

В принципе все реакции можно провести в одной колбе, после чего получится смесь из ста продуктов. Эта ситуация, немыслимая для классического синтеза и традиционных биологических испытаний, оказалась вполне обычной для комбинаторной химии. Ведь ещё одна революционная особенность HTS-технологии состоит в том, что можно тестировать не каждое соединение по отдельности, а смесь веществ.



Комбинаторный органический синтез

Существует и другой путь. Синтез библиотеки можно провести по отдельности в ста микропробирках. Их вставляют в специальный реакционный блок с большим количеством гнезд, и с помощью многопозиционных пипеток-дозаторов вносят растворы исходных веществ. Блок закрывают общей крышкой, и все реакции проходят одновременно в одинаковых условиях (если нужно, блок нагревают и встряхивают специальным механизмом). В результате получают сто индивидуальных соединений, которые будут использованы для испытаний или для последующего параллельного синтеза.

3.4. Ввод химической структуры в программе HyperChem

Существует более тридцати программ, предназначенных для ввода структурных формул и их конвертации в трехмерную структуру. Все они примерно одинаковы по устройству и возможностям, начиная от PCModel образца 1987 г. и заканчивая GaussView из состава Gaussian 03 (Gaussian, Inc.). За прошедшие 15 лет качественных изменений не произошло. В частности, это касается и автоматизации процедур перевода черновой модели молекул из эскиза в близкую к реальной конформацию. Поэтому основную работу по подготовке структуры к расчету дескрипторов по-прежнему нужно осуществлять в режиме диалога.

Наибольшей популярностью у пользователей персональных компьютеров в настоящее время является программа HyperChem. В качестве обоснования рассмотрим Интернет-рейтинг цитируемости наиболее известных компьютерных программ (на базе поисковой машины www.google.com). Таблица 3.

Таблица 3 Интернет-рейтинг цитируемости наиболее известных программ для компьютерной химии (на базе поисковой системы www.google.com).

<i>№ П/п</i>	<i>Программа/пакет</i>	<i>Ссылок в целом по Интернет</i>
1.	GAUSSIAN	128000
2.	MOPAC	71800
3.	ChemDraw (MDL)	57700
4.	ChemOffice (CSoft)	46400
5.	GAMESS	26700
6.	AMPAC	14800
7.	SYBYL	11700
8.	HyperChem	9630
9.	PCModel	3240
10.	Alchemy (Tripos)	1330

В рунете рейтинг программ выглядит несколько иначе:

Таблица 4 Интернет-рейтинг цитируемости наиболее известных программ для компьютерной химии (в рунете)

<i>№ П/п</i>	<i>Программа/пакет</i>	<i>Ссылок в целом по Интернет</i>
1.	GAMESS	369
2.	HyperChem	169
3.	GAMESS	158
4.	MOPAC	148
5.	ChemOffice (CSoft)	148
6.	ChemDraw (MDL)	89
7.	SYBYL	74
8.	AMPAC	35
9.	Alchemy (Tripos)	5
10.	PCModel	4

В свете вышеприведенных данных, выбор HyperChem в настоящем издании в качестве примера вполне очевиден. К настоящему времени уже увидела свет версия 7.0. Ознакомиться с программой можно на сайте <http://www.hyperchem.com/>.

В программе HyperChem ввод структуры возможен путем открытия файла, копированием через буфер, либо ручным редактированием. Программа поддерживает следующие типы химических файлов: *.hin (основной формат HyperChem); *.ent (формат базы данных Brookhaven Protein DataBase); *.skc (редактор химических формул Isis Draw); *.mol (MDL формат); *.zmt (формат программы MOPAC); *.ml2 (формат Tripos); *.chm (редактор химических формул Chem Draw).

Возможно также копирование структур через буфер обмена прямо из ChemDraw (MDL), однако при данном способе иногда могут возникать затруднения (вставка не происходит).

Программа HyperChem имеет широкие возможности редактирования трехмерных химических структур. Для выбора атома используется первая

кнопка на панели управления , при двойном щелчке по ней происходит вызов панели выбора элементов.

Нажатием левой кнопки мыши можно устанавливать атомы выбранного элемента в рабочей области, а также связывать их ковалентной связью протягиванием связи между атомами при помощи движения мыши с нажатой левой кнопкой от атома к атому.

Важно учитывать, что редактирование происходит в плоскости экрана. При этом возможно создание плоской молекулы. Например, выберите углерод в панели выбора элемента и постройте шестиатомный

цикл. Теперь при помощи клавиши  на панели управления перейдите в режим вращения. Теперь у вас есть возможность с помощью мыши (при нажатой левой кнопке) вращать структуру в пространстве. В HyperChem есть средство, позволяющее быстро построить приближенную модель молекулы исходя из плоской структуры без включенных в нее атомов водорода. Вызовите данную функцию через меню Build->Add H & Model Build. При этом к атомам углерода в соответствии с валентностями будут добавлены атомы водорода, а длины связей и валентные углы установлены в соответствии со строением молекулы метана

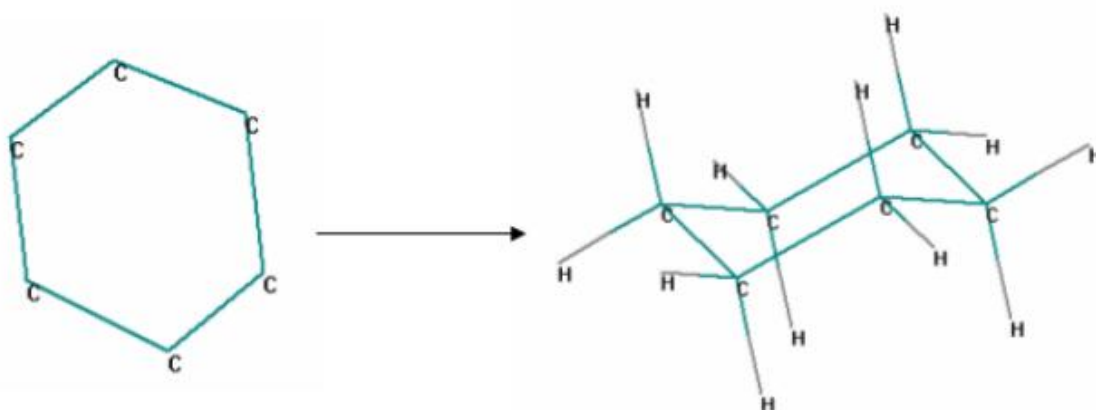


Рисунок 4 Создание трехмерной модели циклогексана.

Получившаяся структура является лишь грубым приближением. Для получения более точной геометрии молекулы требуется проведение оптимизации. *Использование процедуры Add H & Model Build не рекомендуется для крупных молекул.* Рекомендуется аккуратно пользоваться данной процедурой в случае наличия хиральных атомов в молекуле, т.к. при этом часто нарушается стереоизомерия. После ее проведения обязательно необходима внимательная проверка всех хиральных атомов в молекуле и всей геометрии в общем.

3.5. Оптимизация геометрии в программе HyperChem

Все расчеты проводятся через меню Compute. В меню Compute выберите Geometry Optimization. При этом появится форма смотри **Рисунок 5.**

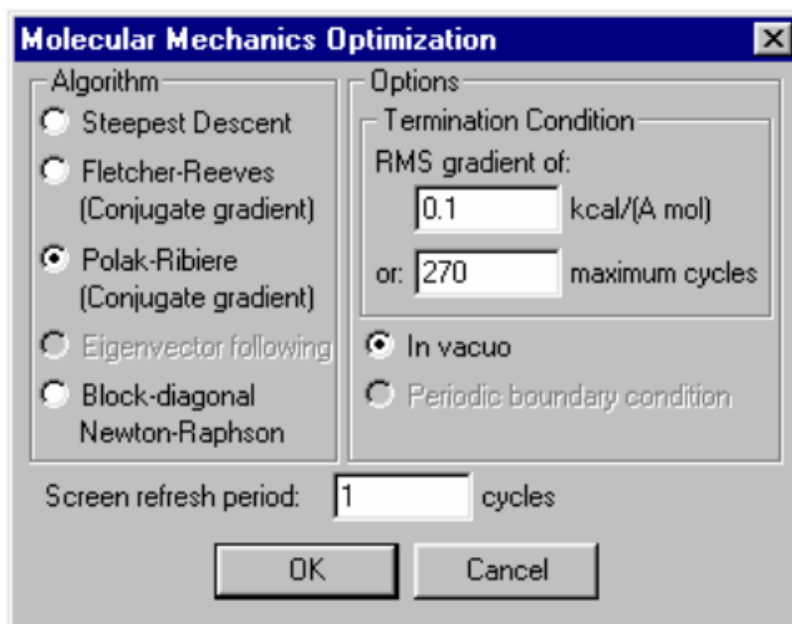


Рисунок 5. Параметры оптимизации геометрии.

В рамке Algorithm возможен выбор алгоритма оптимизации. От выбора алгоритма зависит скорость и успешное завершение оптимизации геометрии.

Steepest Descent (метод наискорейшего спуска) позволяет быстро оптимизировать структуры, находящиеся далеко от минимума на ППЭМ. Метод не пригоден для точной оптимизации.

Алгоритмы Fletcher-Reeves и Polak-Ribiere, являются более интеллектуальными с точки зрения поиска минимума на ППЭМ и позволяют значительно быстрее найти равновесную точку.

Block-diagonal Newton-Raphson (блок-диагональный метод НьютонаРэфсона) использует для оптимизации матрицу вторых производных, что позволяет достигать весьма высокой точности расчета, которая недостижима для остальных схем. Метод более длителен, и целесообразно переходить к нему после применения методов Fletcher-Reeves и Polak-Ribiere.

В поле RMS gradient задается порог градиента. В случае падения градиента ниже заданного порога, оптимизация завершается. Максимальный порог равен 1, оптимальный – 0,1.

Возможно задание максимального количества циклов оптимизации в поле maximum cycles, обычно этот параметр устанавливается автоматически исходя из размера молекулы.

Screen refresh period – период обновления изображения – количество циклов оптимизации, в течении которого обновляется изображение на экране. Параметр позволяет повысить скорость оптимизации в случае большого количества циклов, т.к. экономит машинное время, затрачиваемое на прорисовку структуры.

Ознакомившись с диалоговым окном оптимизации, выберите метод Steepest Descent, если он не установлен по умолчанию. Установите градиент 0.1 ккал/моль, и нажмите «ОК». Начнется процесс оптимизации, однако он

будет идти весьма медленно и неэффективно. Внизу экрана вы можете наблюдать, как меняется энергия системы и градиент. В меню нажмите «Cancel» и снова вызовите Compute->Geometry optimization... Выберите метод Polak-Ribiere. Снова пустите оптимизацию. Пороговый градиент будет достигнут быстро и процесс завершится. Значительно дольше происходит оптимизация с использованием метода Ньютона-Рафсона, однако в ряде случаев метод позволяет достигать величин градиента, недостижимых с использованием метода Polak-Ribiere.

3.6. Основные понятия, современная химическая классификация алкалоидов.

Алкалоиды - (от позднелатинского *alkali* – щелочь, и греческого *éidos* – вид) азотсодержащие органические основания природного (преимущественно растительного) происхождения.

Помимо С, Н и N молекулы алкалоидов могут содержать атомы О, S, реже – Cl или Br. В настоящее время известно несколько тысяч алкалоидов. В исследовании этого класса органических соединений выдающаяся роль принадлежит Барджер, Р.Робинсону, Виланду, Бартону, Вудворду, Орехову А.П. и его школе, Чичибабину А.Е. и его ученикам.

Классификация алкалоидов

1. В основе фармакологической классификации лежит характер фармакологического действия алкалоидов на организм:

- наркотические алкалоиды;
- местноанестезирующие алкалоиды;
- спазмолитические алкалоиды и т.д.

2. В основе ботанической классификации лежит систематическая принадлежность растений, из которых выделены алкалоиды, к определенному роду или семейству:

- алкалоиды табака;
- алкалоиды мака;
- алкалоиды спорыньи и т.д.

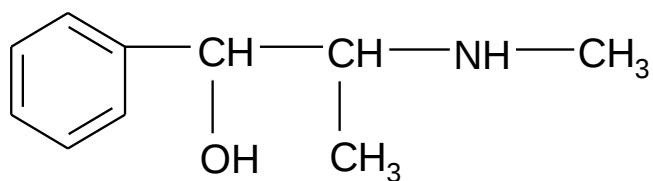
3. В основе биогенетической классификации, предложенной английским ученым Хегнауэром, лежит строение аминокислот, которые являются вероятными предшественниками алкалоидов в растениях:

алкалоиды триптофана;
алкалоиды фенилаланина и т.д.

4. Наиболее удобна и чаще всего используется классификация, предложенная А.П. Ореховым, в основе которой лежат особенности химического строения алкалоидов, в частности, структура азотсодержащего гетероцикла.

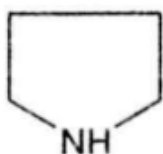
В зависимости от строения углеродноазотного цикла А.П. Орехов разделил все алкалоиды на 13 групп:

1. Алкалоиды с азотом в боковой цепи или ациклические алкалоиды (без гетероциклов): эфедрин из видов эфедры, капсаицин из плодов стручкового перца, колхицин и колхамин из клубнелуковиц видов безвременника.

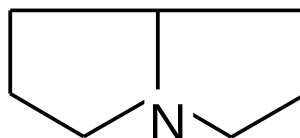


эфедрин

2. Алкалоиды, производные пирролидина и пирролизидина: платифиллин из крестовника плосколистного.

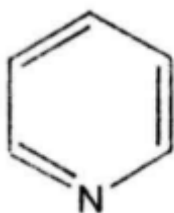


Пирролидин

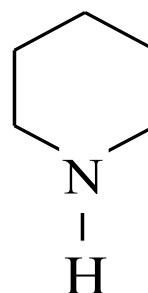


Пирролизидин

3. Алкалоиды, производные пиридина и пиперидина, делятся на несколько групп:

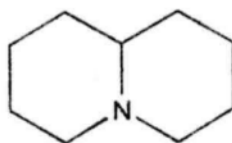


Пиридин



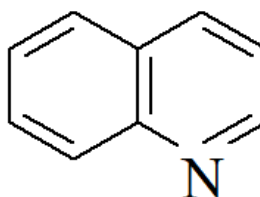
Пиперидин

4. Алкалоиды, производные хинолизидина: пахикарпин, термопсин, цитизин



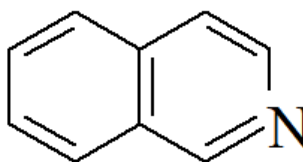
Хинолизидин

5. Алкалоиды, производные хинолина: хинин



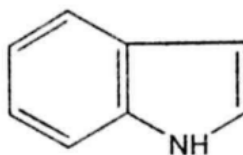
хинолин

6. Алкалоиды, производные изохинолина: морфин, кодеин



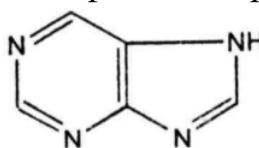
ИЗОХИНОЛИН

7. Алкалоиды, производные индола:



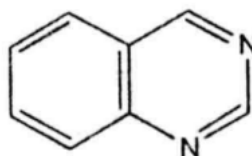
Индол

8. Алкалоиды, производные пурина: кофеин, теобромин



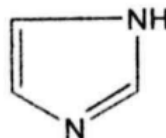
Пурин

9. Алкалоиды, производные хиназолина: пеганин



Хиназолин

10. Алкалоиды, производные имидазола: пилокарпин



Имидазол

11. Стероидные алкалоиды: соласонин.

12. Дитерпеновые алкалоиды: алкалоиды аконитов и

13. Алкалоиды неустановленного строения

Основные (щелочные) свойства алкалоидов выражены в различной степени. В природе чаще встречаются алкалоиды, которые относятся к третичным, реже - к вторичным либо к четвертичным аммонийным основаниям.

Благодаря основному характеру алкалоиды образуют соли с кислотами разной степени прочности.

Соли алкалоидов легко разлагаются под действием едких щелочей и аммиака. При этом выделяются свободные основания.

Благодаря основному характеру, алкалоиды при взаимодействии с кислотами образуют соли. Это свойство используется при выделении и

очистке алкалоидов, их количественном определении и получении препаратов.

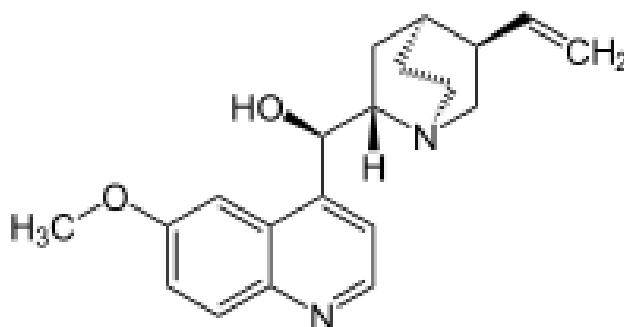
Алкалоиды вступают в реакции, зависящие от наличия в их молекулах различных функциональных групп.

Например, морфин содержит фенольный гидроксил, поэтому он со щелочами образует феноляты; дает реакции с FeCl_3 .

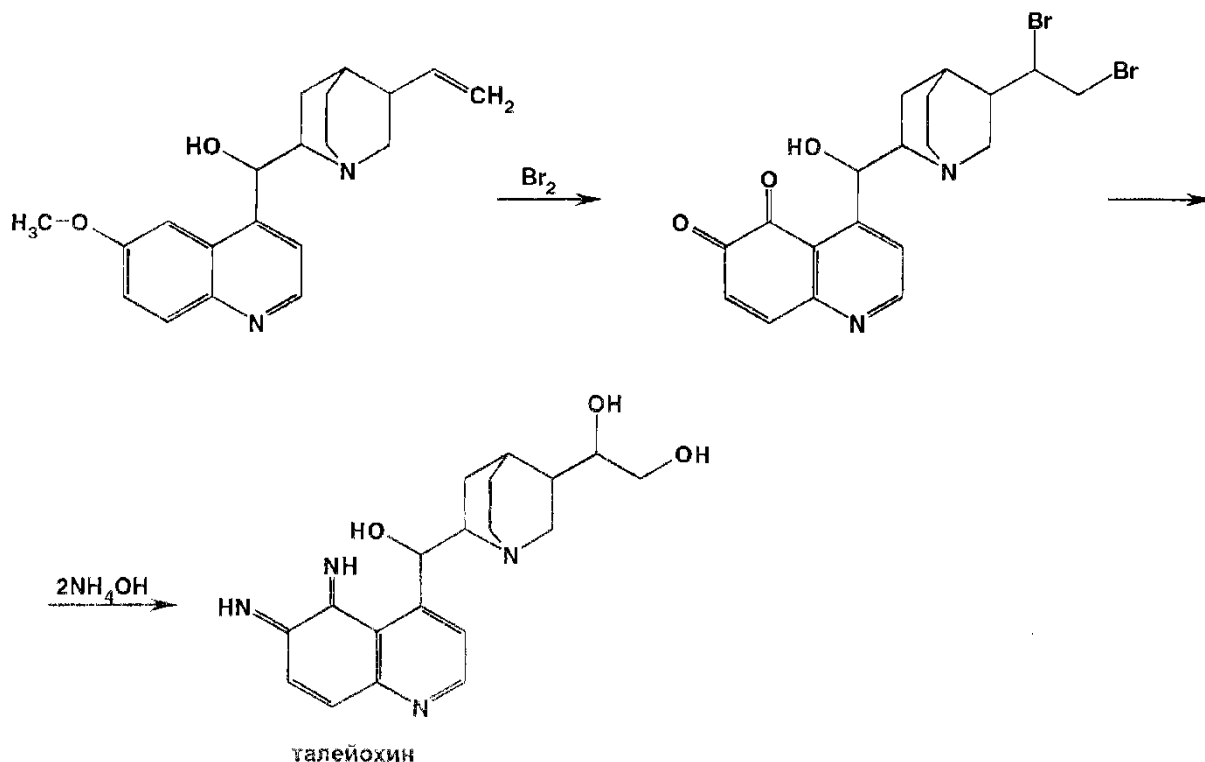
Некоторые алкалоиды представляют собой сложные эфиры, (атропин, скополамин) и подвергаются гидролизу кислотами и щелочами.

3.7. Химические особенности алкалоидов: хинина.

Хинин – алкалоид коры хинного дерева, обладает обезболивающим и жаропонижающим действием.

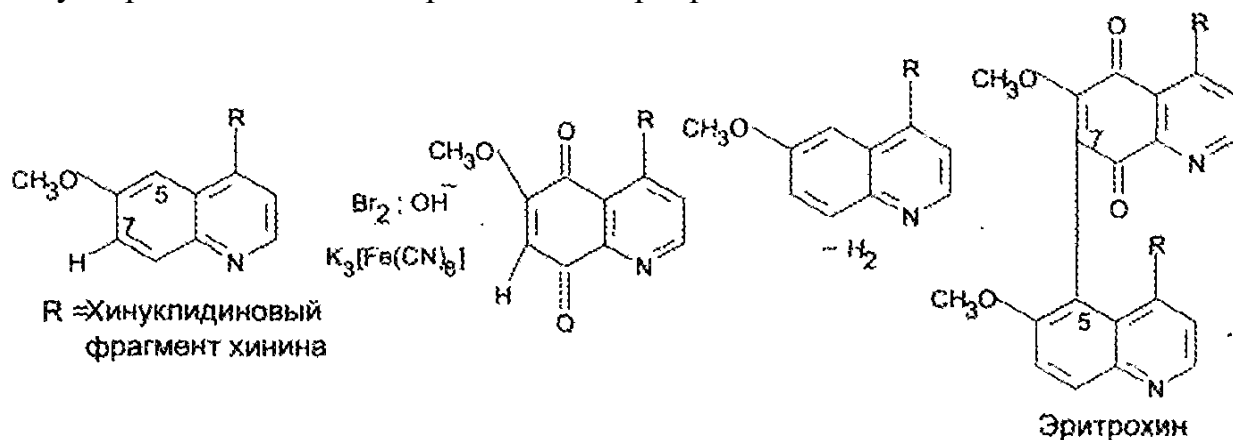


Талейохинная проба заключается в окислении хинина бромной водой до образования бесцветного раствора *орто*-хинона. Последующее действие раствором аммиака приводит к образованию дииминопроизводных орто-хиноидной структуры, окрашенных в изумрудно-зеленый цвет:

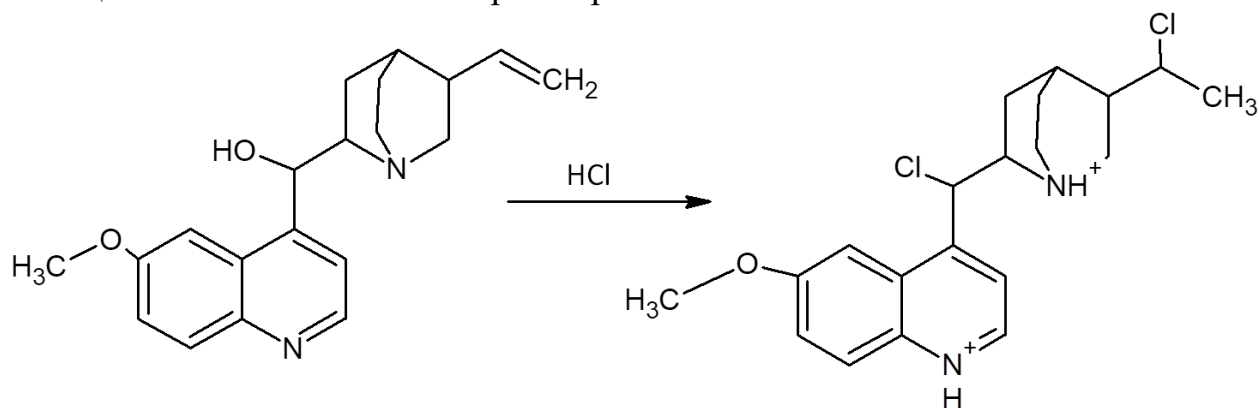


Эритрохинная реакция протекает под действием бромной воды и калия гексацианоферрата (III) в щелочной среде на раствор хинина;

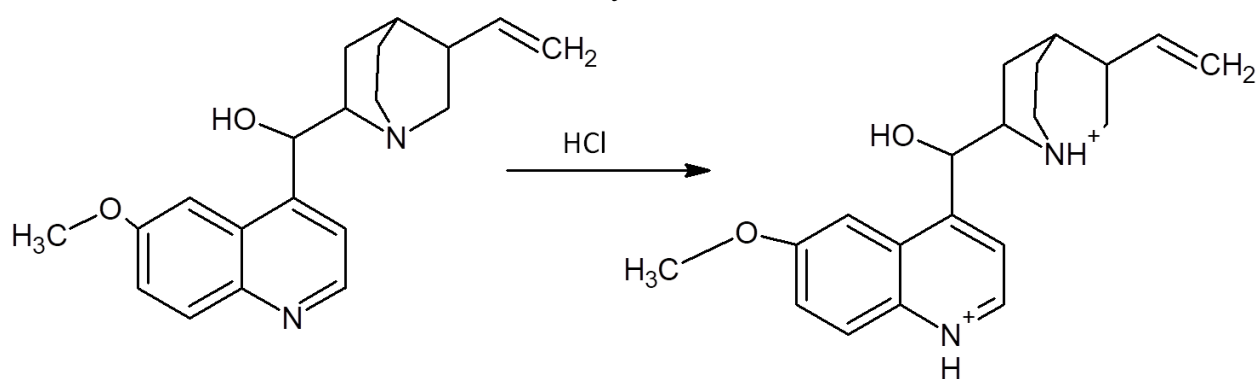
появляется красное окрашивание. Эта реакция в 10 раз чувствительнее талейохинной, но окрашивание сохраняется короткое время. Механизм реакции связан с окислением хинина до производного 5,8-хинолинхинона, который далее взаимодействует с непрореагировавшим хинином через 5-й и 7-й углеродные атомы с образованием эритрохина:



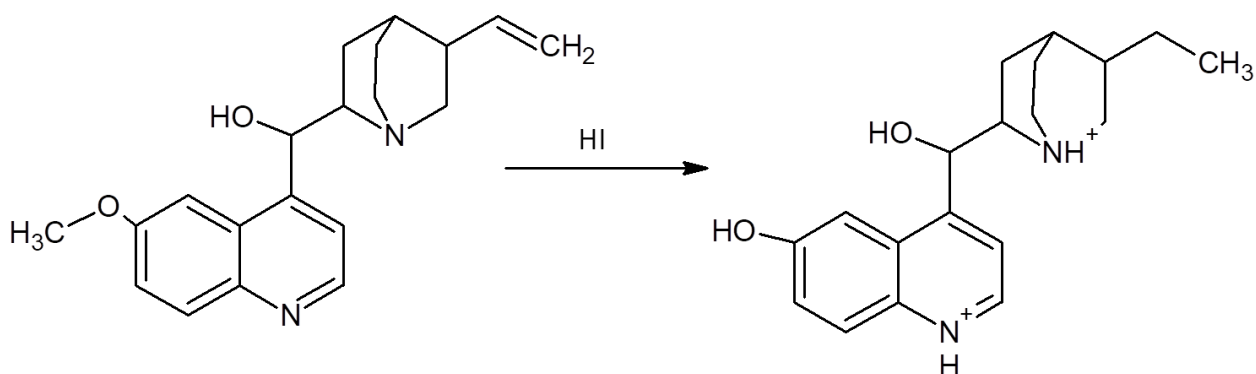
Реакция с соляной кислотой при нагревании



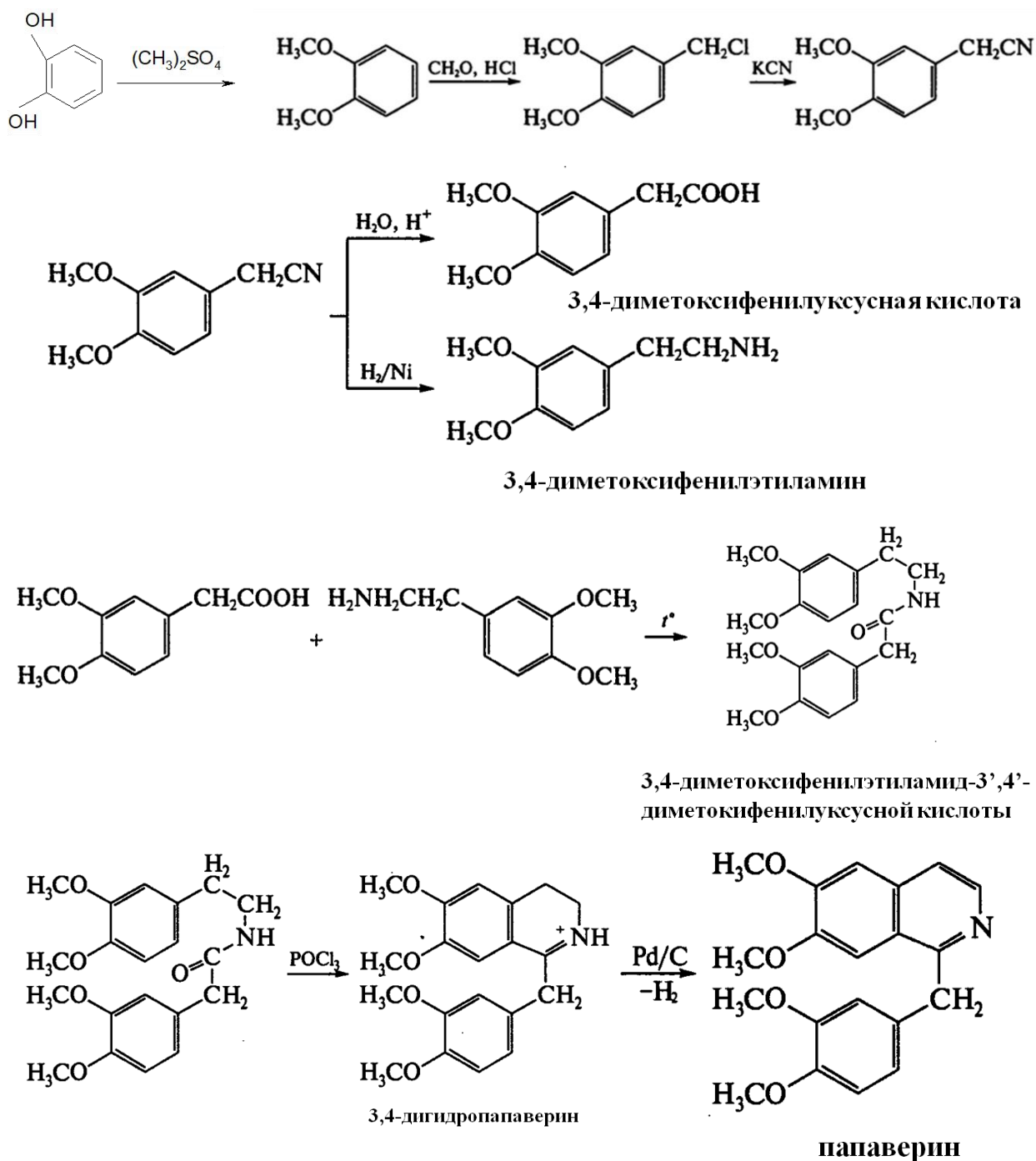
Реакция с соляной кислотой на холоду



Реакция избытком концентрированного HI

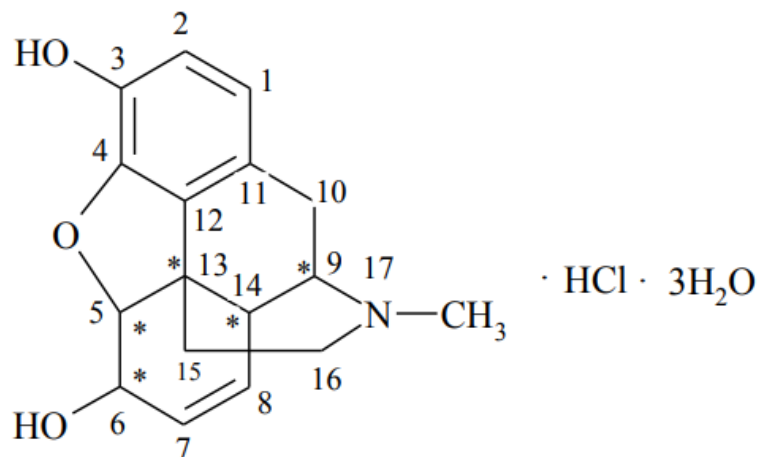


3.8. Химические особенности синтеза алкалоидов: папаверин



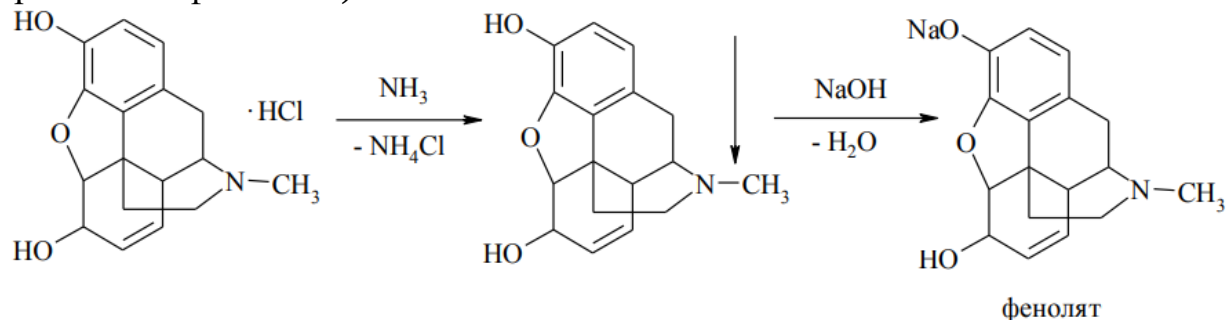
3.9. Химические особенности алкалоидов: морфин, кодеин

Морфина гидрохлорид – белые игольчатые кристаллы или белый кристаллический порошок, который слегка желтеет при хранении; медленно растворимый в воде, мало растворимый в этаноле. Морфин – амфотерное соединение: за счёт третичного атома азота проявляет основные свойства, наличие фенольного гидроксила обеспечивает кислотные.

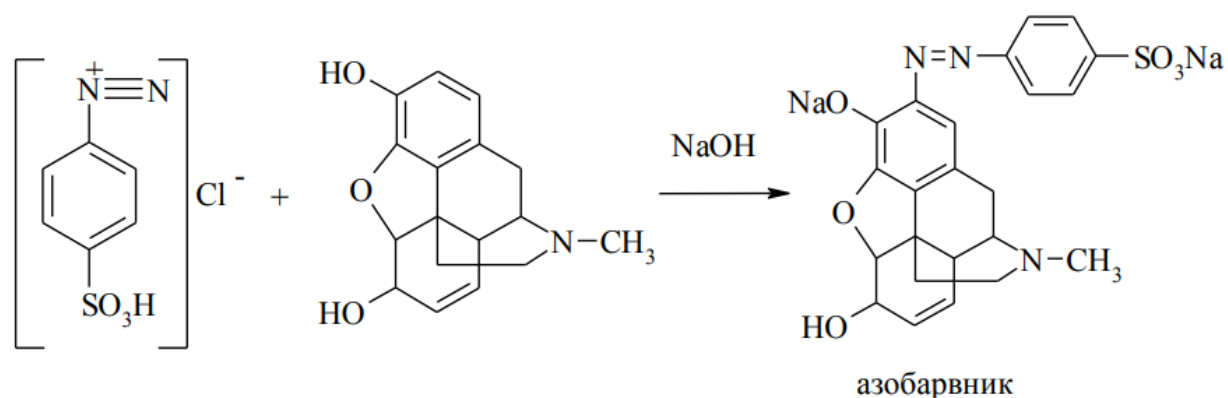


7,8-Дидегидро-4,5α-эпокси-17-метилморфинан-3,6α-диол гидрохлорид тригидрат

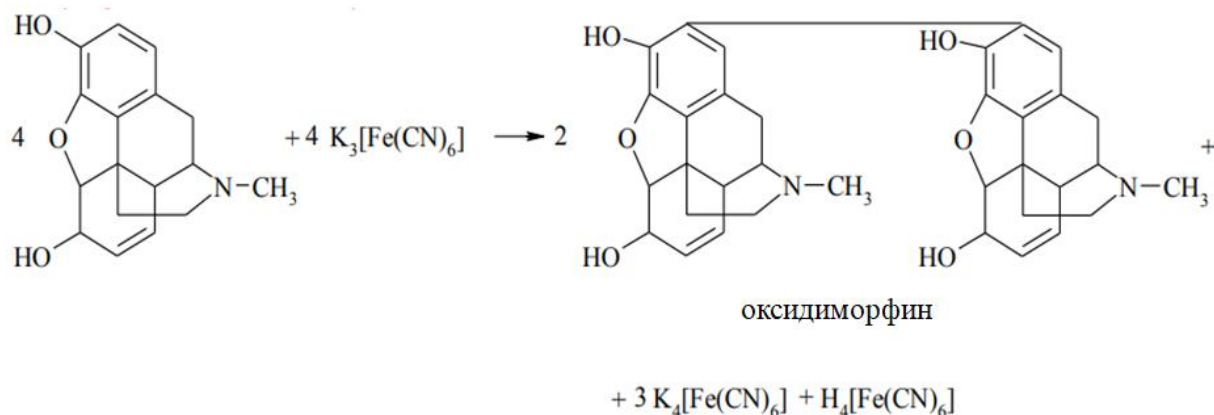
При прибавлении к раствору субстанции раствора аммиака выделяется белый кристаллический осадок, который растворяется в растворе NaOH (образование фенолята):



С солями диазония морфин образует азокрасители; например, с диазотированной кислотой сульфаниловой – азокраситель красного цвета:



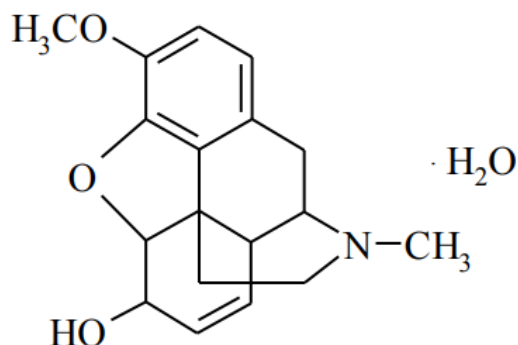
Калия(III)гексацианоферрат окисляет морфин в кислой среде с образованием оксидиморфина. Последующее прибавление к реакционной смеси FeCl_3 приводит к появлению синего окрашивания (берлинская синь):



С реактивом Фреде (раствор молибдата аммония в конц. H_2SO_4) наблюдается фиолетовое окрашивание, которое переходит в синее, а со временем – в зелёное.

С реактивом Марки (р-р формальдегида в конц. H_2SO_4) образуется пурпурное окрашивание, которое быстро переходит в синефиолетовое (отличие от кодеина).

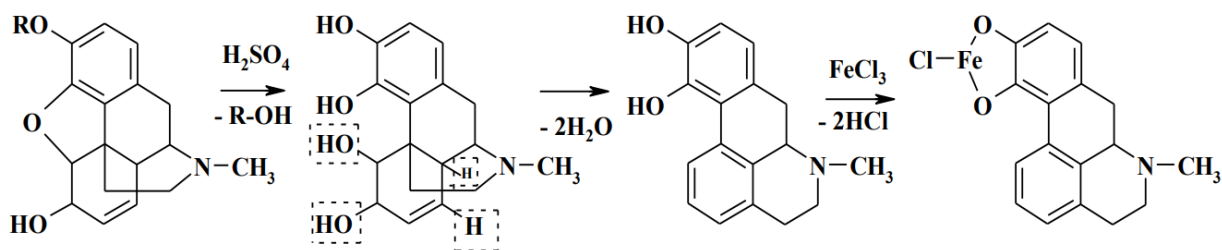
Кодеин – Codeinum - кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Растворим в кипящей воде, легко растворим в 96% спирте, растворим в эфире.



7,8-Дидегидро-4,5 α -эпокси-3- метокси-17-метилморфинан-6 α -ол или 6-гидрокси-3-метокси-17-метил4,5-эпоксиморфинен-7 Монометиловый эфир морфина.

Кодеин химически не совместим с дубильными веществами, йодидами, солями тяжёлых металлов, калия перманганатом, ихтиолом вследствие образования токсичных осадков.

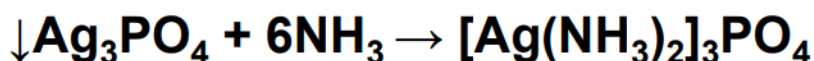
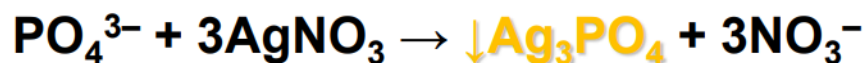
При слабом нагревании на водяной бане + H_2SO_4 (конц) + $\text{FeCl}_3 \rightarrow$ синее окрашивание, переходящее в красное при прибавлении одной капли HNO_3)



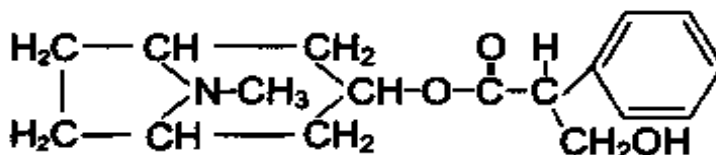
Общая реакция на алкалоиды: несколько миллиграммов субстанции растворяют в 5 мл воды, прибавляют кислоту хлороводородную разведенную до кислой реакции раствора, потом - 1 мл раствора калия йодвисмутата; сразу же образуется оранжево-красный осадок.



Реакция на фосфаты с р-ром серебра нитрата, образуется жовтий осадок, цвет которого не изменяется при кипячении и который растворяется при прибавлении раствора аммиака:



3.10. Химические особенности алкалоидов: атропин, кокаин

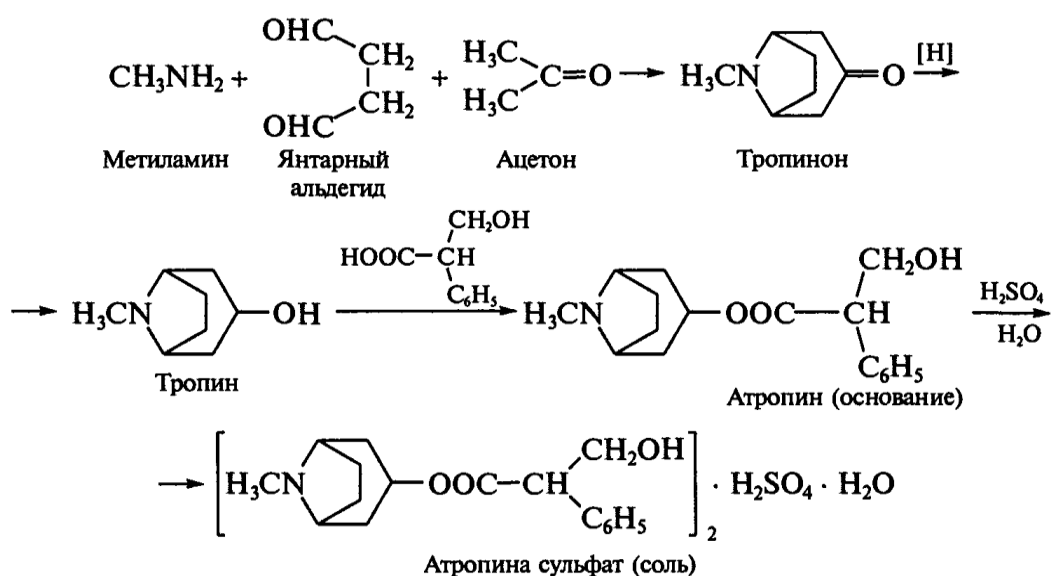


Атропин

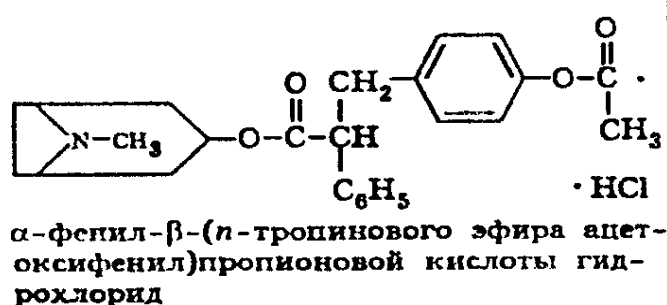
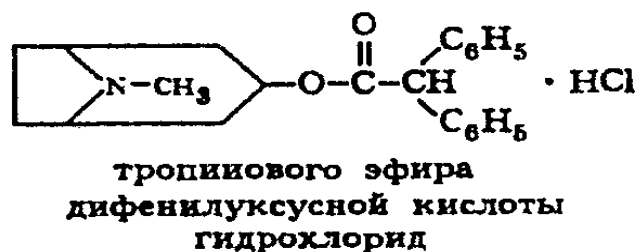
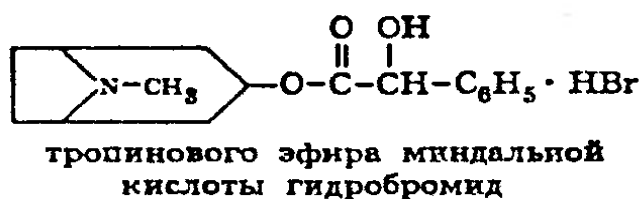
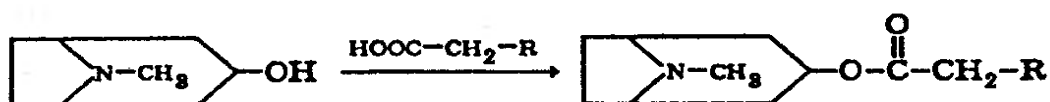
Атропин - алкалоид, который содержится в некоторых растениях семейства пасленовые: красавка, белена, дурман.

В медицинской практике широкое применение нашел атропина сульфат.

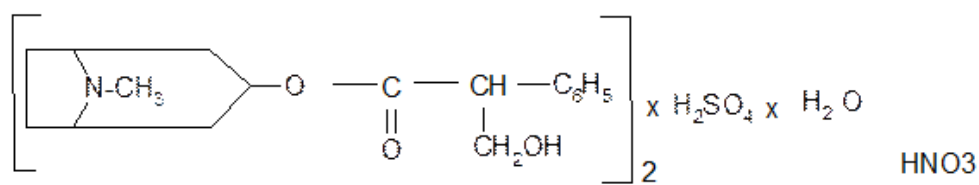
Данный препарат способен вызывать большое количество побочных эффектов, способных привести к тяжелой интоксикации.



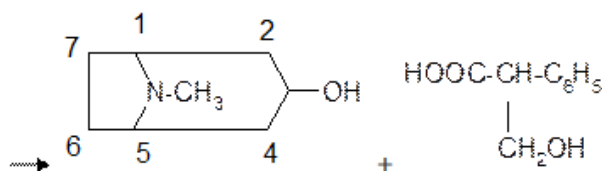
Получение синтетических аналогов



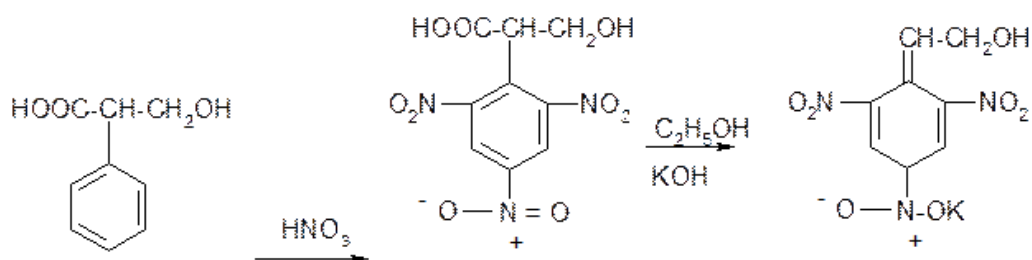
Атропина сульфат (лекарственное средство) подвергается гидролизу с образованием тропанола и троповой кислоты, троповая кислота вступает в реакцию нитрования при нагревании с кислотой азотной (реакция Витали-Морена).



атропина сульфат



тропанол троповая кислота

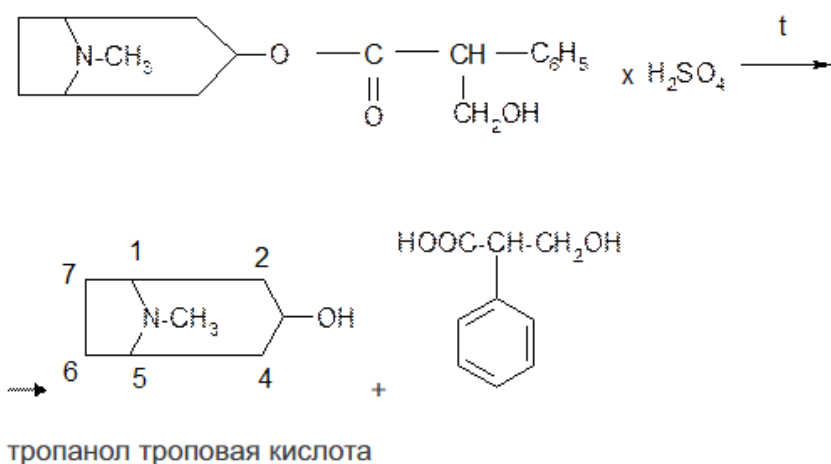


троповая кислота желтое окрашивание фиолетовое
окрашивание

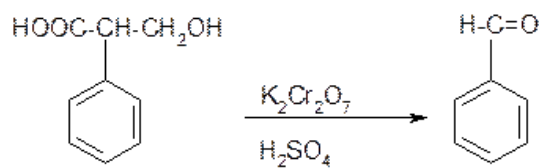
Реакция Витали-Морена доказывает присутствие троповой кислоты в структуре молекулы атропина сульфата: атропин сульфат (субстанцию, препарат) нагревают с концентрированной азотной кислотой, раствор выпаривают;

Вследствие образования полинитросоединения появляется желтое окрашивание, при добавлении спиртового раствора щелочи переходящее в фиолетовое.

При нагревании основания атропина с раствором серной кислоты в присутствии кристаллика бихромата калия ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) ощущается запах горького миндаля.



Происходит гидролиз атропина до тропанола и троповой кислоты, а затем окисление троповой кислоты до бензальдегида.



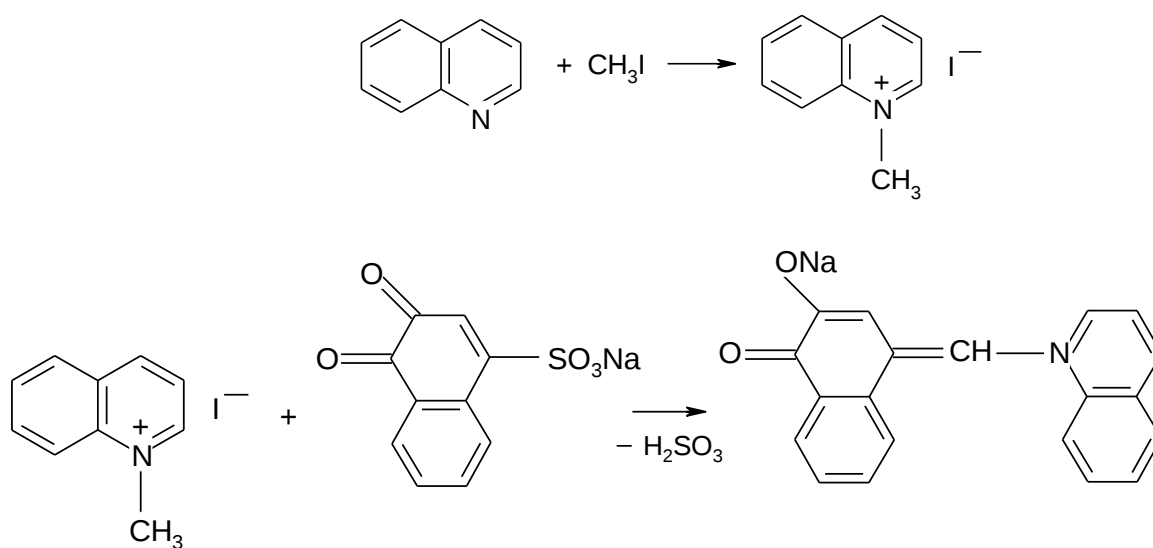
троповая кислота бензальдегид

(запах горького миндаля)

3.11. Лабораторный практикум

Хинолин и его производные

Хинолин и его производные (например, 3- и 8-оксихинолин) можно определить с помощью реакции на третичные амины, т. е. с лимонной кислотой, растворенной в уксусной кислоте. Хинолин и хинальдин определяют так же, как третичные, циклические амины, используя в качестве реагентов метилиодид, диметилсульфат и 1,2-нафтохинон-4-сульфонат натрия. Предлагается следующий механизм реакции:



Экспериментальная часть.

В фарфоровом микротигле смешивают 1-2 мг анализируемого вещества, 5-6 капель метилиодида и такое же количество диметилсульфата. Содержимое тигля медленно доводят до кипения. После охлаждения к раствору, который предварительно подщелачивают 0,5н раствором гидроксида натрия, добавляют 2-3 капли насыщенного раствора нафтохинонсульфоната натрия. С хинолином возникает темная зеленовато-коричневая окраска, переходящая в зеленовато-черную, которая при подкислении уксусной кислотой становится красной. Предел обнаружения составляет 25 мкг. С хинальдином сначала возникает синевато-фиолетовая окраска, которая затем переходит в синевато-

зеленую. При добавлении уксусной кислоты появляется зеленовато-желтая окраска. Предел обнаружения составляет 12 мкг.

Эту же реакцию можно использовать для определения пиридина, α -пиколина, 2,6-диоксипиридин-4-карбоновой кислоты и хинон-2,6-дикарбоновой кислоты [$C_6H_2O_2-2,6-(COOH)_2$].

Обнаружение хинина и цинхонина

При нагревании с уксусной кислотой хинин и цинхонин изомеризуются с образованием хинотоксина и цинхотоксина соответственно (происходит так называемое гидраминное расщепление). Образующиеся продукты являются вторичными алифатическими основаниями, которые с ионами меди и сероуглеродом образуют желтовато-коричневые растворимые в бензоле дитиокарбаматы меди.

Экспериментальная часть.

Несколько кристалликов анализируемого вещества смешивают в микропробирке с каплей ледяной уксусной кислоты и выдерживают в течение 20 мин на кипящей водяной бане. После охлаждения к реакционной смеси добавляют каплю 5%-ного раствора сульфата меди и каплю концентрированного раствора аммиака. Затем добавляют раствор сероуглерода в бензоле (25 об.%) и смесь энергично встряхивают. В присутствии хинина и цинхонина бензольный слой окрашивается в желтовато-коричневый цвет. Предел обнаружения гидрохлорида хинина составляет 50 мкг, а цинхонина – 20 мкг.

Занятие 4.

Тема занятия: Дизайн лекарственных веществ природного происхождения для моделирования их биологической активности. Гликозиды.

Цель занятия: Изучить современные подходы к дизайну лекарственных веществ природного происхождения для моделирования их биологической активности.

Вопросы к занятию:

1. Пролекарства. Эмпирические основы их дизайна. Фармакокинетические свойства лидерных молекул (показатели АРМЭТ)
2. Принцип антиметаболитов в умозрительном дизайне ЛП
3. Конформационный анализ в программе HyperChem
4. Особенности конформационного поиска
5. Определение активной группы в семействах биологически активных веществ. Принцип фармакофора. Умозрительный и эмпирический дизайн опиоидных анальгетиков на основе лидера-морфина
6. Химические особенности гликозидов.

4.1 Пролекарства. Эмпирические основы их дизайна. Фармакокинетические свойства лидерных молекул (показатели АРМЭТ)

Термин «пролекарство» введён в 1958 г. для обозначения биопредшественника истинного ЛВ или же ЛВ, имеющего защитные группы, легко удаляющиеся в организме пациента. Позднее возникла концепция пролекарств (по аналогии с концепцией защитных групп в органическом синтезе) как приём активации истинного ЛВ (ИЛВ). Дизайн пролекарственного вещества (проЛВ) заключается в превращении ИЛВ в биологически не активное вещество благодаря введению в ИЛВ легко биотрансформируемых группировок. Последние должны придавать проЛВ нужные физико-химические и фармакокинетические показатели-свойства (АРМЭТ):

- 1) необходимый уровень абсорбции жировыми тканями (для преодоления защитных барьеров, например, липофильных клеточных мембран).
- 2) хорошее распределение ЛВ в организме, транспорт и адресную доставку к биомишени.
- 3) достаточную устойчивость к метаболизму ЛВ защитными ферментными системами организма (иначе ЛВ слишком быстро выводится в виде метаболитов из организма пациента), и в то же время нужную пролонгированность метаболического снятия введённых фармакокинетических групп атомов после достижения пролекарством мишени. Определённая замедленность превращения проЛВ в ИЛВ в районе биомишени необходима для длительного создания терапевтических концентраций ИЛВ, что приводит к уменьшению доз вводимого ЛВ и к снижению токсических эффектов.

4) Хорошую выводимость из организма (экскрецию, элиминирование) без его аккумуляции после проявления лечебного эффекта.

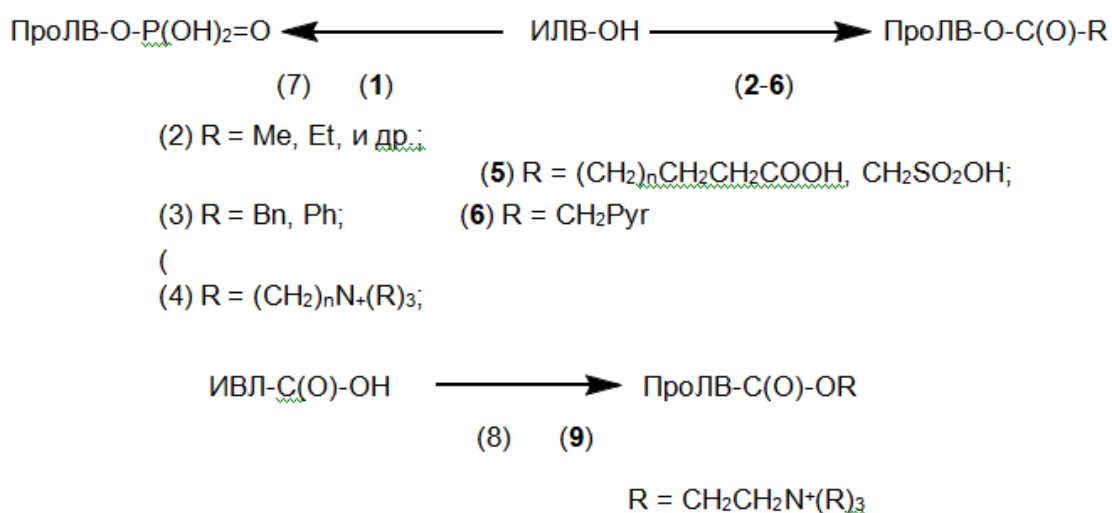
5) в целом незначительную токсичность (в случае выраженной токсичности ИЛВ оно на пути к целевой мишени может оказать отравляющее действие или другие нежелательные эффекты при контакте с другими органами-мишенями – раздражение ЖКТ, болезненные ощущения, горький вкус, тошноту, рвоту и т.п.).

6) хорошую растворимость в воде (что особенно важно для перорального введения ЛВ).

В дизайне пролекарств с целью улучшения показателей АРМЭТ широко пользуются методами, основанными на зависимости активности от строения (ЗАС или SAR). Так, для достижения в молекуле пролекарства нужного баланса между её гидрофильной и липофильной областями можно применить химическую модификацию исходной структуры истинного лекарства. При этом вводят такие группировки атомов, которые улучшают прохождение пролекарства через защитные барьеры организма (кожу, слизистые оболочки, ГЭБ, клеточные мембраны), повышают его абсорбцию и распределение в организме пациента.

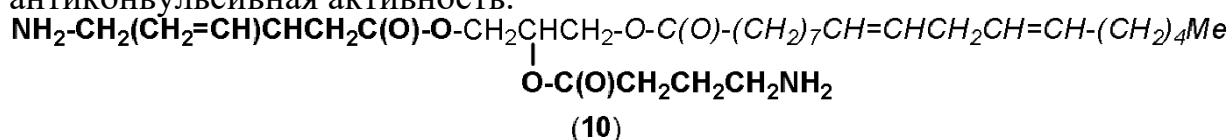
Ознакомимся с некоторыми примерами создания пролекарств изменением методами химических модификаций структуры истинного ЛВ его гидрофильно-липофильного баланса с целью лучшего прохождения ЛВ через защитные барьеры организма больного.

В случае истинных ЛВ (1), содержащих спиртовые или карбоксильные группы (ЛВ 8), наиболее подходящим приёмом для изменения указанного баланса является химическое превращение этих групп действием соответствующими реагентами в легко гидролизуемые сложноэфирные группы (проЛВ 2-7, 9):



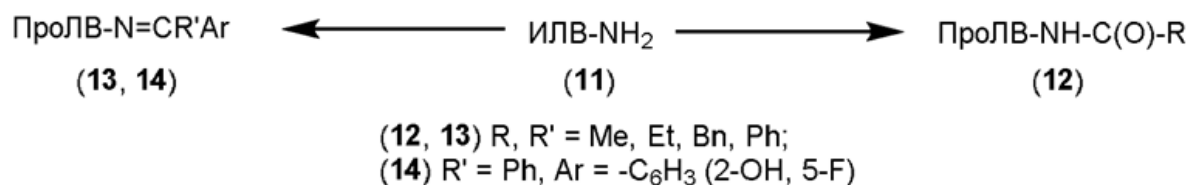
Синтез эфиров (2 и 3) приводит к уменьшению водорастворимости при переходе от ИЛВ (1). Наличие катионных центров у эфиров (4 и 9) и отрицательных зарядов, возникающих при диссоциации кислотных групп у эфиров (5 и 7) повышает их водорастворимость. Конкретным интересным

примером эффективности применения концепции синтеза проЛВ для придания сразу двум истинным ЛВ – гамма-аминомасляной кислоте (ГАМК) и её β- винилпроизводному (вигабатрину) высоких липофильных свойств, – служит синтез триглицерида (**10**; остатки этих двух ИЛВ выделены жирным шрифтом). Подобный тройной сложный эфир был предназначен для его хорошего прохождения через ГЭБ, который защищает нейронные клетки от случайного воздействия гидрофильных ксенобиотиков. Известно, что представители семейства лидера-ГАМК трудно проникают через липидоподобный барьер ГЭБ к ГАМКрецепторам из-за своего цвиттер-ионного строения. Поэтому сильная липофилизация пролекарственной структуры, содержащей остатки сразу двух активных нейротропных молекул, которые присоединены в виде эфиров к монолинолоилглицериду (остаток линолевой кислоты выделен курсивом), привела к резкому улучшению проникновения данных нейротропных средств в мозговую ткань. В результате резко повысилась адресность их доставки к биомишени и антиконвульсивная активность.



Следует ещё раз отметить, что ПроЛВ (с введёнными в исходные ИЛВ сложноэфирными группами) затем легко гидролизуются в организме пациента ферментами: эстеразами, сульфатазами и фосфатазами, с генерацией ИЛВ. Однако, этот метаболический эффект не всегда достигает приемлемого уровня. Так, в случае аспирина его кислотность, вызывающую раздражение и кровоточивость желудка и ЖКТ, понижают превращением карбоксильной группы в сложноэфирную группу. Тем не менее, химическая и метаболическая деэтерификация получаемых при этом производных всё ещё не достаточно велика.

Эмпирический дизайн проЛВ (**12**, **13**) на основе ИЛВ, имеющих аминные функциональные группы (**11**), проводится обычно для снижения токсичности, основности ЛВ и увеличения их липофильности. Чаще всего при этом аминогруппы превращают в амидные, карбаматные и иминные, которые затем достаточно легко метаболизируются (гидролизуются) с высвобождением ИЛВ:

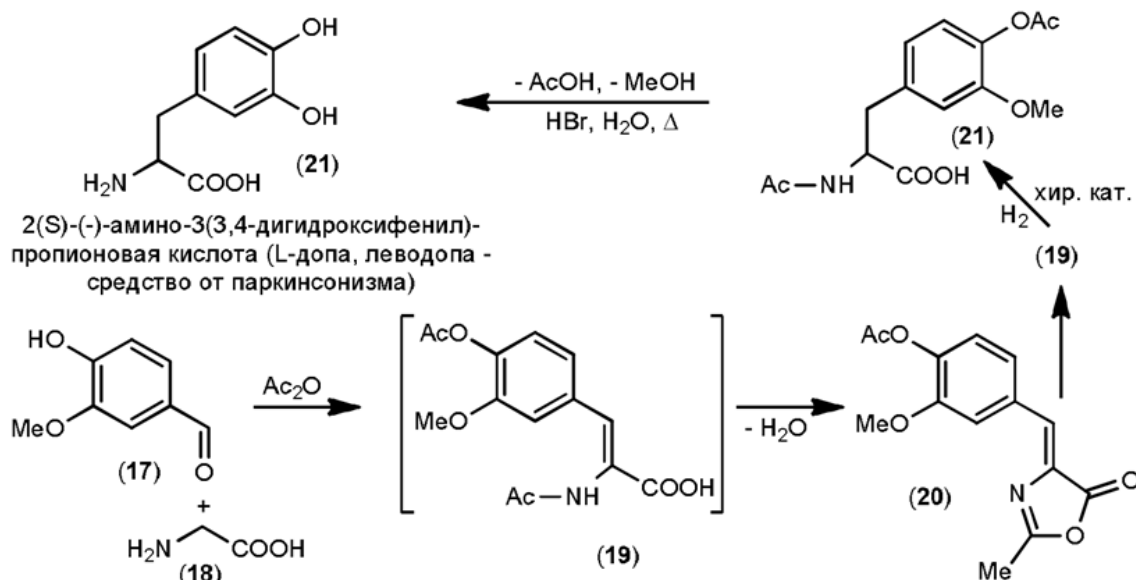


Так, иминопроизводное ГАМК (проЛВ прогабид **14**) – приобретает липофильность, достаточную для транспорта в мозг через ГЭБ, где в близости от биомишени (ГАМК-рецептора) биохимически гидролизуетсся с образованием свободной ГАМК, которая благодаря этому приёму оказывает более мощное антиконвульсантное действие. Структуру (2-НО,5-F)C₆H₃-

$\text{C(Ph)=N(CH}_2)_3\text{C(O)NH}_2$ (**14**) получают конденсацией ГАМК (ИЛВ- NH_2 **11**) с диарилкетонем (2-НО,5- F) $\text{C}_6\text{H}_3\text{C(Ph)=O}$ (**15**).

ИЛВ, имеющие карбонильную (кетонную или альдегидную) группу, превращают в такие проЛВ, снабжённые оксимными, иминными, кетальными, ацетальными, оксазолидиновыми или другими легко гидролизуемыми группировками, конструируя таким образом лидерные структуры с нужными фармакокинетическими характеристиками. Простейший альдегид – метаналь – используют только наружно как антисептик в виде слабых водных растворов для дезинфекции рук, кожи и инструментов, т. к. он весьма токсичен для энтерального приёма. Чтобы избежать токсичности формальдегида в больших концентрациях и острого запаха у этого дезинфектантаантисептика мочеполовых путей, его используют при приёме внутрь через рот в виде проЛВ уротропина (метиленамина, гексаметилентетрамина, тетраазаадамантана). Антисептическое действие такого проЛВ основано, по-видимому, на его постепенном разложении до формальдегида и иона аммония, ускоряемом при кислых значениях рН. Этот проантисептик легко получают конденсацией водных растворов метанала и аммиака через образование промежуточного гексагидро-1,3,5-триазина.

Остановимся ещё на одном примере экспериментального дизайна современного проЛВ – (S)-3,4-дигидроксифенилаланина (**16**, L-допа или леводопа). Его используют в лечении паркинсонизма – нейродегенеративного заболевания старческого возраста. Для этой болезни характерно дрожание мышц («дрожательный паралич»), потеря их эластичности, согбенная поза, маленькие шаги. Как правило, она заканчивается параличом из-за недостатка выделения мозгом нейромедиатора допамина. Леводопу принимают через рот в виде таблетки, которая растворяется в пищевом тракте. Поступая затем в кровь, это проЛВ постепенно проникает через ГЭБ в нейронные клетки, где ароматическая L-аминокислотная декарбоксилаза метаболически отщепляет от неё диоксид углерода, превращая её в нейромедиатор 1-амино-2-(3,4-дигидроксифенил)этан (допамин, дофамин). Синтез леводопы (**16**) осуществляют конденсацией ароматического альдегида (**17**) с глицином (**18**):



Основной стадией является асимметрическое гидрирование стирола (19) с помощью хирального катализатора на основе дифосфина родия $\text{HRh}[\text{CH}_2\text{PPhC}_6\text{H}_4\text{OMe-4}]_2$. При этом образуется L-изомер кислоты (21) с выходом 90% и энантиомерной селективностью до 95%. На заключительной стадии проводят снятие защитных ацильных групп гидролизом в присутствии HBr .

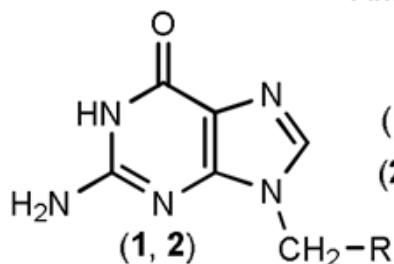
4.2 Принцип антиметаболитов в умозрительном дизайне ЛП

Концепция антиметаболитов базируется на создании синтетического ЛВ структурно близкого к какому-либо естественному (эндогенному) метаболиту организма человека. Задача такого ЛВ, называемого антиметаболитом (ксенометаболитом или псевдометаболитом), состоит в подмене природного метаболита в биохимических реакциях (прием «троянский конь»). Антиметаболиты должны быть способны лишь частично выполнять в организме функции метаболитов. Являясь химическими имитаторами истинных метаболитов, ЛВ такого рода "обманывают" контролирующие ферментные системы, встраиваются в метаболическую схему и заменяют собой настоящий метаболит, например, в растущей цепочке ДНК или РНК. Включение псевдометаболита в НК приводит к прекращению их роста, развития и репликации, что заканчивается гибелью микроорганизма. Важной характеристикой синтетических антиметаболитов, является то, что они обладают малой токсичностью и не оказывают нежелательных побочных эффектов, благодаря высокой степени их узнаваемости системами организма, для которых эти лекарственные вещества структурно «выглядят» эндогенными, почти не чужеродными.

На основе концепции антиметаболитов нуклеиновых оснований в последней четверти 20-го века была создана важная группа противовирусных препаратов – производных пурина, в частности, ИЛВ

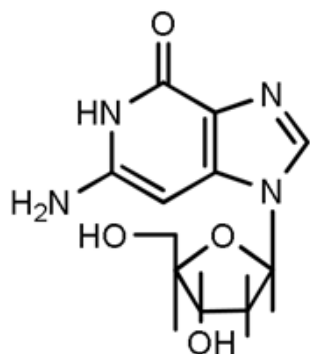
ацикловир (зовиракс 1) и его проЛВ валацикловир (2, производное Лвалина, которое в пять раз более биодоступно орально, чем ацикловир):

Антивирусные средства



(1) R = $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, ацикловир (зовиракс);

(2) R = $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CHMe}_2$, валацикловир

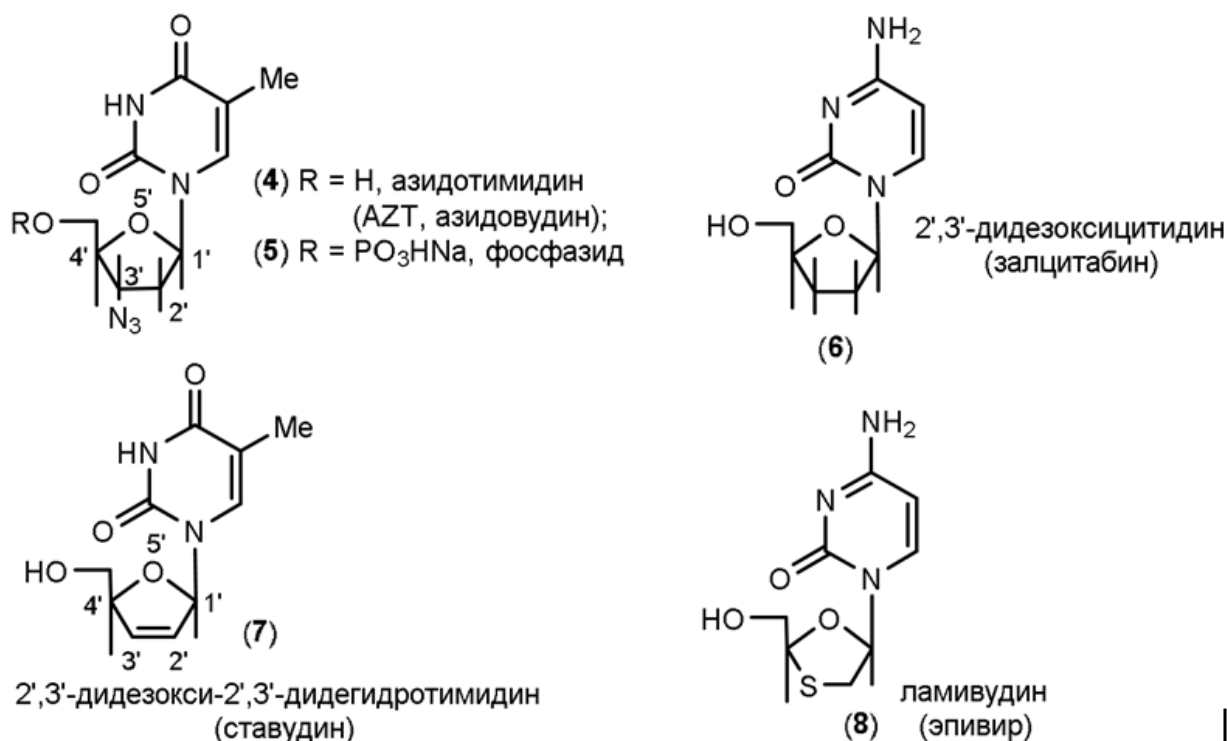


Ацикловир (1) синтезировали в качестве имитатора-аналога нуклеозида – дезоксигуанозина (3), участвующего в биосинтезе нуклеиновых кислот. Идея заключалась в том, чтобы ксенобиотик – антиметаболит (1), попадая в зараженную вирусом клетку, имитировал собою эндогенный нуклеозид (3). Но поскольку в структуре лекарственного вещества отсутствует рибозильный фрагмент с 5'-ОН- группой, при введении имитатора в структуру растущей ДНК ее дальнейший рост должен прекратиться. Так оно и оказалось, причем выяснилось, что ацикловир имеет самое мощное антивирусное действие в отношении вируса герпеса. Герпесные инфекции – очень распространенное явление. Достаточно сказать, что только в США ими заражены десятки миллионов человек. При герпесном энцефалите от воспаления мозга гибнут три четверти пациентов, а в случае химиотерапии ацикловиром выживаемость возрастает в три раза. Поэтому появление ацикловира в клинике быстро привело к его широкому использованию во всем мире, а авторы этого ЛВ удостоились в 1988 г. Нобелевской премии.

Принцип антиметаболитов сыграл важную роль в создании семейства ЛП в борьбе против СПИДа – открытой в США в начале 1980-х годов болезни, названной синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД; по-английски AIDS – acquired immunodeficiency syndrom). В 2006 году число инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) во всем мире по разным данным достигло от 30 до 50 млн человек. Любой вирус (вирион) состоит из нуклеиновой кислоты (НК), защищаемой капсидом (цилиндрической или сферической оболочкой белкового типа, иногда с включением липидов и сахаров). Капсида выполняет также функцию взаимодействия с клетками чужого организма, способствуя проникновению

вирусной НК внутрь клетки-хозяина и запуску там синтеза новых вирусных молекул. В случае ВИЧ сложность заключается в том, что в чужом организме он встраивается в клетки самой иммунной системы (в лейкоциты, фагоциты, лимфоциты), призванной бороться с патогенными микроорганизмами. И как только зараженный организм включает в действие защитную иммунную систему, то вместе с размножением собственных иммунных клеток начинается бурный рост числа ВИЧ и клетка-хозяин теряет генетический контроль над биопроцессами. Иммунные силы организма (его сопротивляемость) таким образом слабеют и у больных СПИДом возрастает возможность заражения другими инфекциями - туберкулезом, пневмонией, лейкозами и т.д. Точками воздействия (биомишенями) лекарственных веществ на ВИЧ могут быть: капсида (ее разрушение), нуклеиновая кислота – НК (ее мутация, ингибирование или разрыв) и, наконец, ферменты, которые участвуют в репликации НК. Некоторые синтетические лекарственные вещества (например, группа нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы 4-8), используемые против СПИДа, имеют нуклеозидную или близкую к ней природу. Они считаются антиметаболитами, которые могут «спутать карты» вирусной НК, встраиваясь в неё. Подобная модификация останавливает дальнейший рост НК, т. к. в рибозильном цикле (или аналогичном ему гетероцикле) отсутствует группа ОН, которая необходима для фосфорилирования.

Препараты против СПИДа (4-8)



Установлено, что эти препараты в организме фосфорилируются клеточными ферментами до 5'-трифосфатов и в этой форме являются конкурентными ингибиторами обратной транскриптазы ВИЧ (ОТ ВИЧ), которая катализирует транскрипцию одноцепочечной вирусной РНК в

двухцепочечную ДНК. Являясь пролекарствами, нуклеозидные антиспидные препараты воздействуют на ферментную биомишень и оказываются терминаторами роста цепи вирусной ДНК, что приводит, таким образом, к остановке размножения ВИЧ. Замечено также, что указанные 5'-трифосфаты могут ингибировать ДНК-полимеразы клетки-хозяина и давать значительные токсические эффекты. При длительном использовании препаратов появляются резистентные к ним штаммы ВИЧ, в которых репликация на уровне НК уже не нарушается. Длительное использование AZT (4) вызывает мутации в активном центре ОТ ВИЧ в кодонах Asp. 67 (он переходит в кодон Asn), Lys 70 (мутирует в Arg) и Thr 215 (дает кодон Tug). Таким образом, модифицированная ОТ ВИЧ уже не подвержена ингибированием азидовудином (4), который нашёл наиболее широкое применение. Интересно, что это вещество впервые было синтезировано еще в 1964 году в рамках поиска противораковых средств. До 1991 г. AZT оставался единственным препаратом против СПИДа на фармацевтическом рынке.

Существует несколько стратегий снижения уровня токсичности у известных препаратов, используемых против СПИДа. Одна из них базируется на резком улучшении плохой проходимости AZT и ему подобных нуклеозидных препаратов через липидные мембраны. С этой целью синтезируют их фосфатные производные (типа проЛВ фосфазида 5) и вводят подобные пролекарства в искусственные носители-липосомы. Приготовленная в таком виде система "препарат + матрица" хорошо преодолевает мембранный барьер лейкоцитов. Фосфатидилпроизводное (5) лучше проникает через фосфолипидные оболочки макрофагов (клетки иммунной системы) и накапливается там же, где обычно концентрируются и вирусы иммунодефицита человека (ВИЧ). Это пролекарство, гидролизуясь в макрофаге до довольно токсичного для организма человека истинного ЛВ азидотимицина, действует, таким образом, адресно – как «магическая пуля», – только на зараженные иммунные клетки и оказывает в несколько раз меньшую токсичность.

4.3 Конформационный анализ в программе HyperChem

Результат оптимизации зависит от стартовой геометрии молекулы и гарантированно приводит к ближайшему локальному минимуму на ППЭМ, однако, если молекула имеет большое количество конформаций, процесс поиска глобального минимума на ППЭМ значительно усложняется.

В случае простых молекул возможен прямой перебор всех конформаций. Пример: постройте две модели молекулы бутана – анти- и гош- конформеры; установите силовое поле mm+; введите одну из конформаций (например анти-) и проведите оптимизацию геометрии; произведите расчет энергии молекулы в одной точке (Compute->Single Point) и запишите ее значение; затем, перейдите в режим выделения, нажав на кнопку панели управления . Выделите четыре связи, которыми образован

двугранный угол (C-C-C-C) и измените его значение на 0 (Edit->Set Bond Torsion) – при этом получится стартовая геометрия для гош-конформации, затем (это важно!), снимите выделение, нажав правую кнопку мыши на темном фоне графического окна. Проведите оптимизацию геометрии. В случае использования силового поля mm+ энергии составляют: 3.04 для гош-конформации; 2.17 для анти-конформации. Следовательно, можно сделать вывод, что анти-конформер стабильнее чем гош-конформер.

Для решения сложных конформационных задач существует наглядный способ визуализации зависимости потенциальной энергии от величины двугранного угла – построение потенциальной кривой. Выделите двугранный угол C-C-C-C и запустите построение потенциальной кривой (Compute->Potential...), при этом возникнет меню выбора параметров построения потенциальной кривой (**Рисунок 6**).

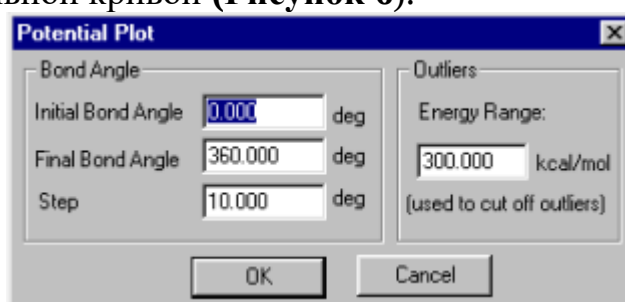


Рисунок 6 Параметры построения потенциальной кривой.

Установите параметры Initial Bond Angle (начальное значение угла) и Final Bond Angle (конечное значение угла) 0 и 360 градусов соответственно, а Step (шаг) 10 градусов. Запустите процедуру. При этом по окончании вращения будет построена потенциальная кривая (), на которой виден минимум потенциальной энергии для вращения вокруг данного двугранного угла. Сравните полученный угол минимальной энергии с ранее полученным результатом.

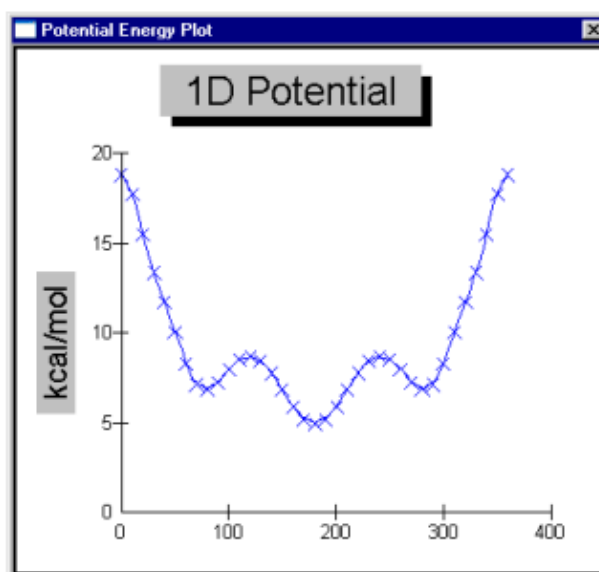


Рисунок 7. Потенциальная кривая.

В ряде случаев использование потенциальной кривой для оценки оптимального угла не рекомендуется. Например, когда при повороте

возникают значительные стерические напряжения или возникает перекрывание фрагментов химической структуры. В этом случае следует использовать автоматический конформационный анализ. Для этого в HyperChem предусмотрены специальные процедуры.

Рассмотрим конформационный анализ на примере L-глутаминовой кислоты (**Рисунок 8**).

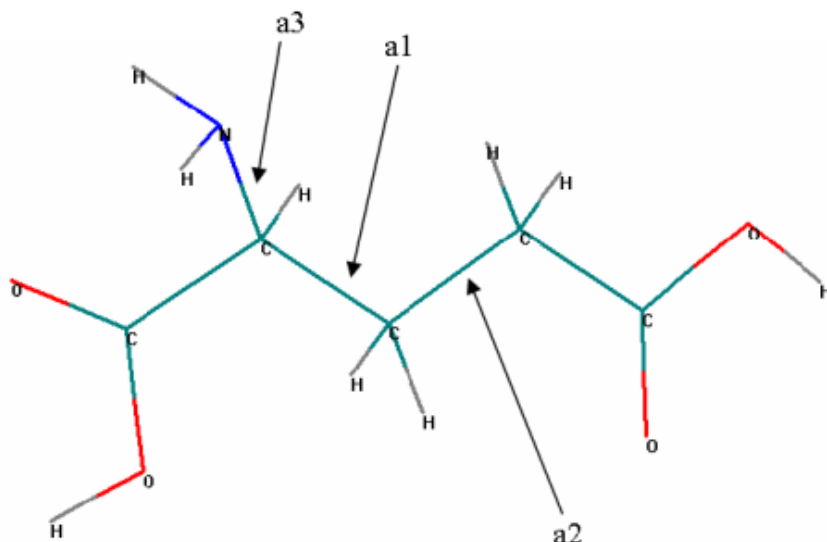


Рисунок 8. Трехмерная структура L-глутаминовой кислоты (a1, a2, a3 – торсионные углы для конформационного поиска).

Прежде всего, необходимо указать, какие валентные углы будут варьироваться в процессе конформационного анализа. Данный этап реализован в HyperChem не очень удобно. Прежде чем приступить к анализу, необходимо выделить и присвоить каждому из углов имя. Выделите три связи, соответствующие валентному углу a1 (для вращения вокруг связи C-C), путем выделения двух прилежащих связей и связи указанной на рисунке стрелкой a1. Затем выберите пункт меню Select->Name Selection... Укажите имя угла a1. Аналогично присвойте имена двум оставшимся углам (сначала выделяя, а затем присваивая имя). Теперь запустите конформационный анализ Compute->Conformational Search... :

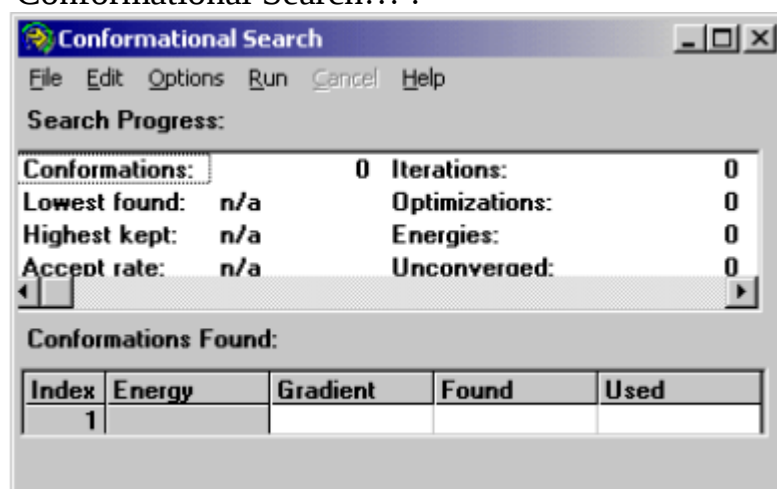


Рисунок 9. Окно конформационного анализа.

В меню конформационного анализа выберите Options->Choose torsions. В левой колонке (Named Torsion Angles) должен быть список выбранных углов (a1,a2,a3). Выделите их все и нажмите кнопку Add. Углы будут добавлены в колонку Torsions to Vary (углы, которые будут варьироваться):

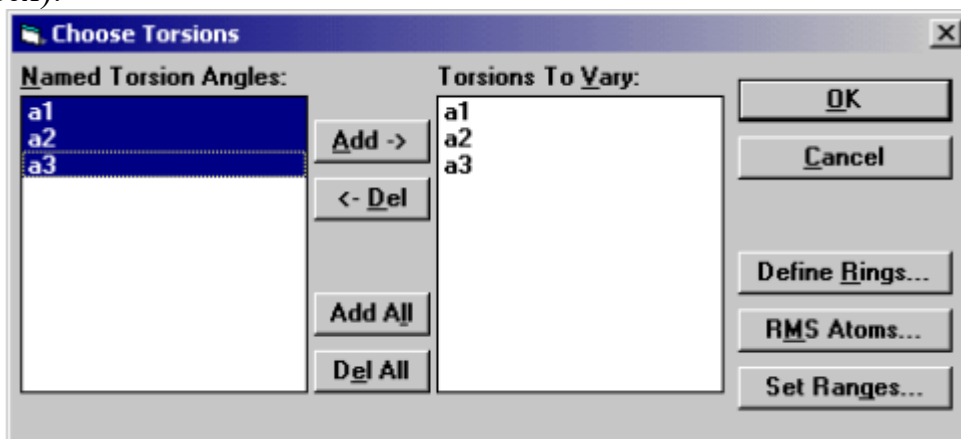


Рисунок 10. Выбор торсионных углов.

Варьирование углов используется для получения различных стартовых точек для оптимизации. Углы могут варьироваться с некоторым шагом и в определенном диапазоне, который задается в Options->Setup Ranges....:

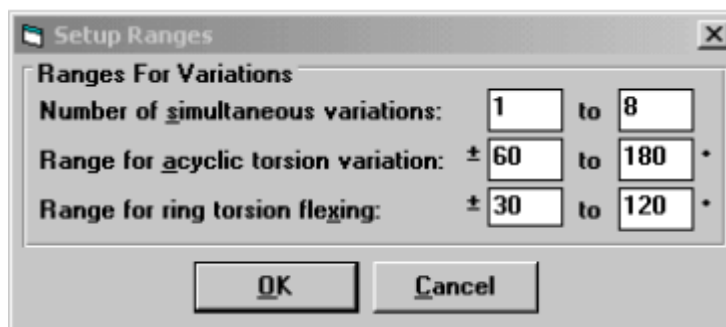


Рисунок 11. Задание параметров варьирования углов.

Для выбора метода конформационного поиска выберите пункт меню Options->Search Method....:

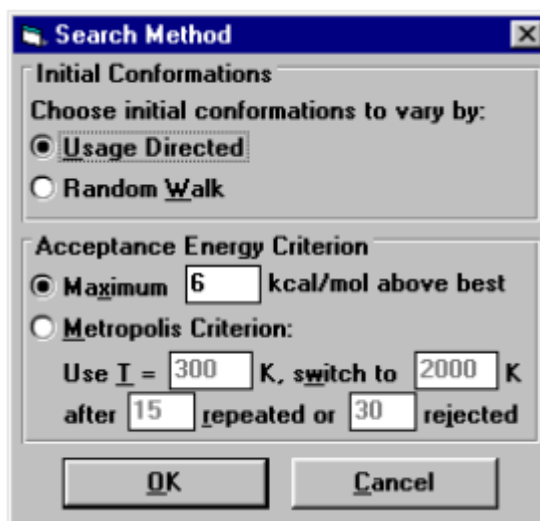


Рисунок 12. Параметры конформационного поиска.

В рамке Initial Conformations – выбор начальных конформаций:

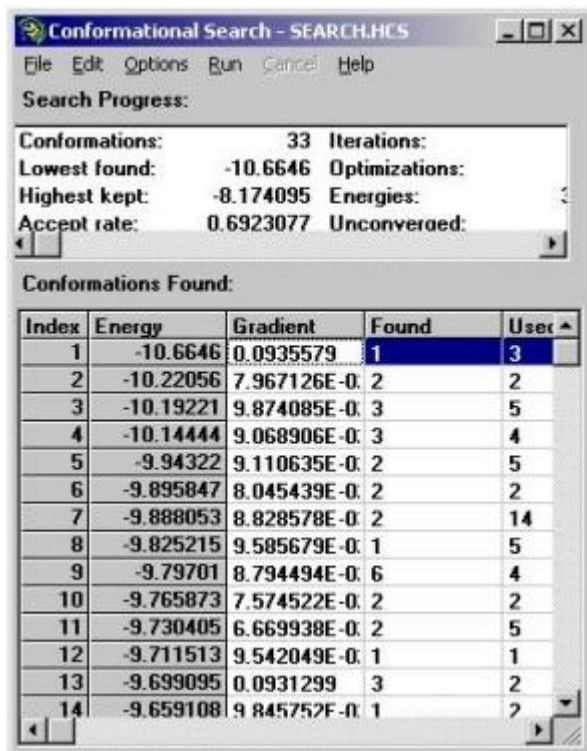
Usage Direction – по мере использования; Random Walk – случайный выбор (повышает вероятность полного охвата всего конформационного пространства).

В рамке Acceptance Energy Criterion – критерий выбора конформации в соответствии с ее энергией: Maximum – максимальное отклонение энергии от энергии конформации с низшей энергией, в случае превышения конформация не используется; Metropolis criterion – вероятностный выбор конформации в соответствии с распределением Больцмана (задается температура).

Перед запуском поиска в меню File активизируйте опцию Autosave. При этом вся информация в процессе поиска будет записываться в файл. Запустите процесс конформационного поиска Run->Start. Создайте файл конформационного анализа, в котором будет сохраняться вся информация о ходе анализа, в том числе и структуры различных конформеров, которые можно в дальнейшем вызывать.

В процессе анализа таблица со свойствами конформаций будет расширяться по мере нахождения новых конформеров. При этом ее строки сортируются по энергии. Таблица имеет следующие колонки: Energy – энергия конформера; Gradient – градиент в конце оптимизации; Found – сколько раз данная конформация была найдена; Used – сколько раз данная конформация была использована для генерации новых конформаций.

Далее следуют колонки со значениями валентных углов, подлежащих варьированию.



The screenshot shows a window titled "Conformational Search - SEARCH.HCS" with a menu bar (File, Edit, Options, Run, Cancel, Help). Below the menu is a "Search Progress:" section with the following data:

- Conformations: 33
- Iterations: 3
- Lowest found: -10.6646
- Optimizations: 1
- Highest kept: -8.174095
- Energies: 1
- Accept rate: 0.6923077
- Unconverged: 1

Below this is a "Conformations Found:" section containing a table with 5 columns: Index, Energy, Gradient, Found, and Used.

Index	Energy	Gradient	Found	Used
1	-10.6646	0.0935579	1	3
2	-10.22056	7.967126E-0	2	2
3	-10.19221	9.874085E-0	3	5
4	-10.14444	9.068906E-0	3	4
5	-9.94322	9.110635E-0	2	5
6	-9.895847	8.045439E-0	2	2
7	-9.888053	8.828578E-0	2	14
8	-9.825215	9.585679E-0	1	5
9	-9.79701	8.794494E-0	6	4
10	-9.765873	7.574522E-0	2	2
11	-9.730405	6.669938E-0	2	5
12	-9.711513	9.542049E-0	1	1
13	-9.699095	0.0931299	3	2
14	-9.659108	9.845752E-0	1	2

Рисунок 13. Результаты конформационного поиска.

Основные параметры, приведенные в поле Search Progress: Conformations – количество конформаций; Lowest found – конформация с наименьшей энергией; Highest kept – конформация с наибольшей энергией.

4.4 Особенности конформационного поиска

1. Обычно конформации с наименьшей энергией занимают наибольший объем, т.е. выглядят «развернутыми». Важно исключить сильное пространственное сближение заместителей (пример – фолиевая кислота):

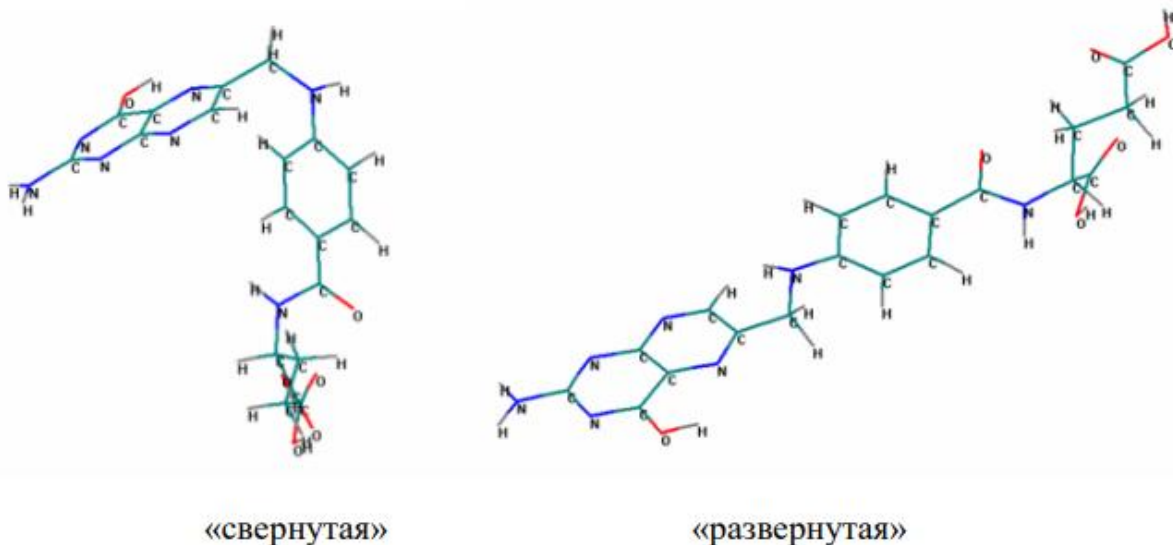


Рисунок 14. Конформации молекулы фолиевой кислоты.

2. Двугранные углы в углеродном скелете линейных органических молекул в большинстве случаев составляют около 180° :

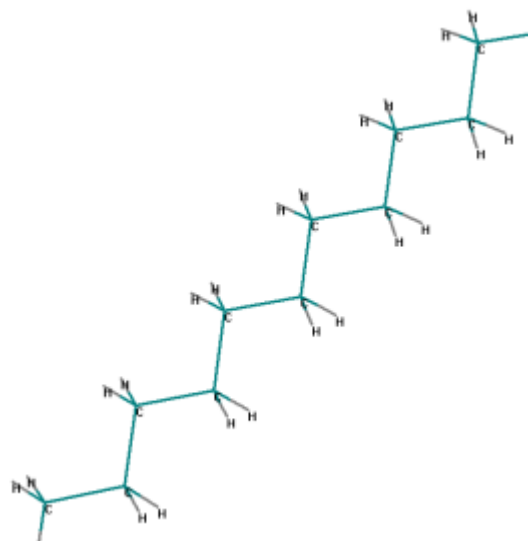


Рисунок 15. Фрагмент молекулы углеводорода.

3. Обычно пептидная связь имеет транс-конфигурацию:

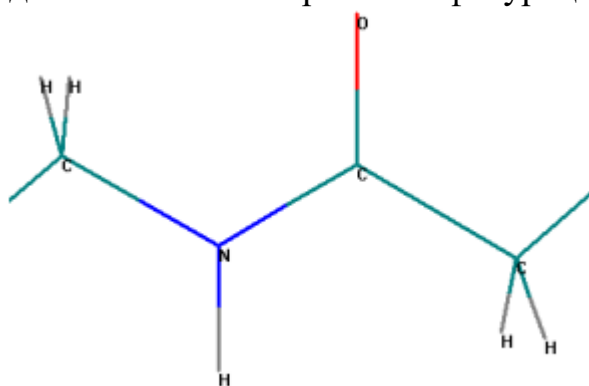


Рисунок 16. Пептидная связь.

4. В циклических молекулах обычно меньше энергия конформаций с экваториальным расположением заместителей. Однако, при этом важно соблюдать стереоизмерию молекулы. Чтобы изменить положение заместителя с аксиального на экваториальное, просто удалите атом водорода у его основания, поместите его на противоположную сторону и вновь запустите оптимизацию геометрии:

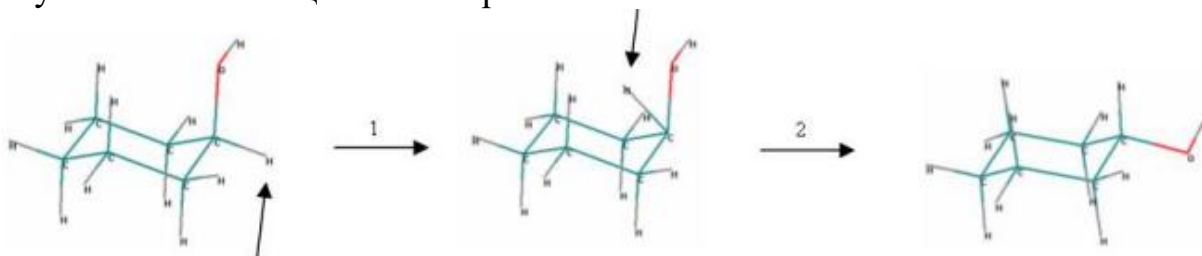


Рисунок 17. Изменение положения заместителя.

5. Для циклических молекул конформация «кресла» обычно стабильнее. Для быстрого перевода циклогексана из конформации «ванна» в конформацию «кресло» можно воспользоваться следующим приемом:

а. Добавьте в молекулу атом тяжелого элемента (у него достаточно большая длина связи), как показано на рисунке ниже;

б. Проведите оптимизацию геометрии (полного завершения дожидаться необязательно);

в. Сотрите атом тяжелого элемента и добавьте атомы водорода Build- >Add Hydrogens. Запустите оптимизацию геометрии.

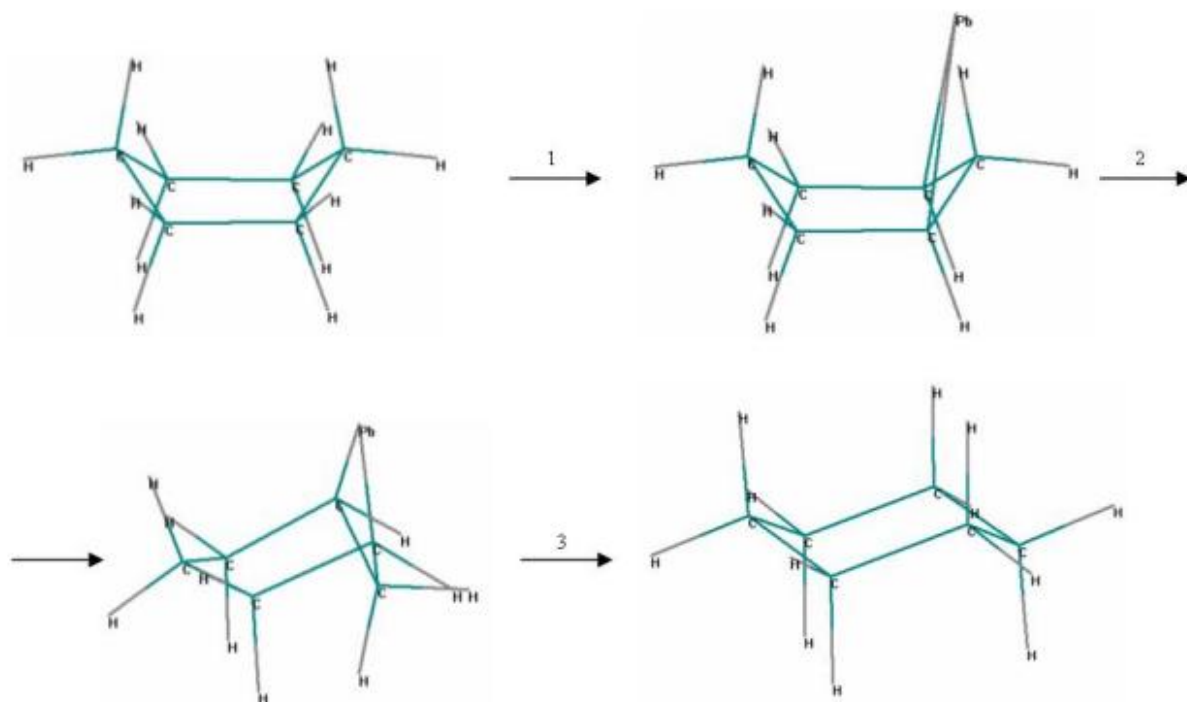
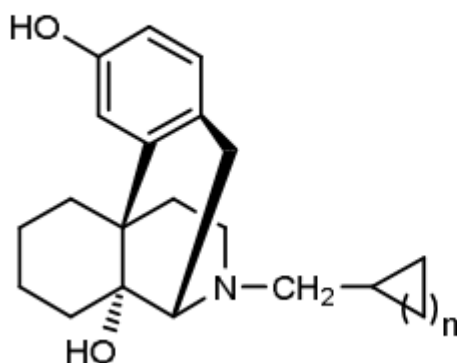


Рисунок 18. Изменение конформации.

4.5 Определение активной группы в семействах биологически активных веществ. Принцип фармакофора. Умозрительный и эмпирический дизайн опиоидных анальгетиков на основе лидера-морфина

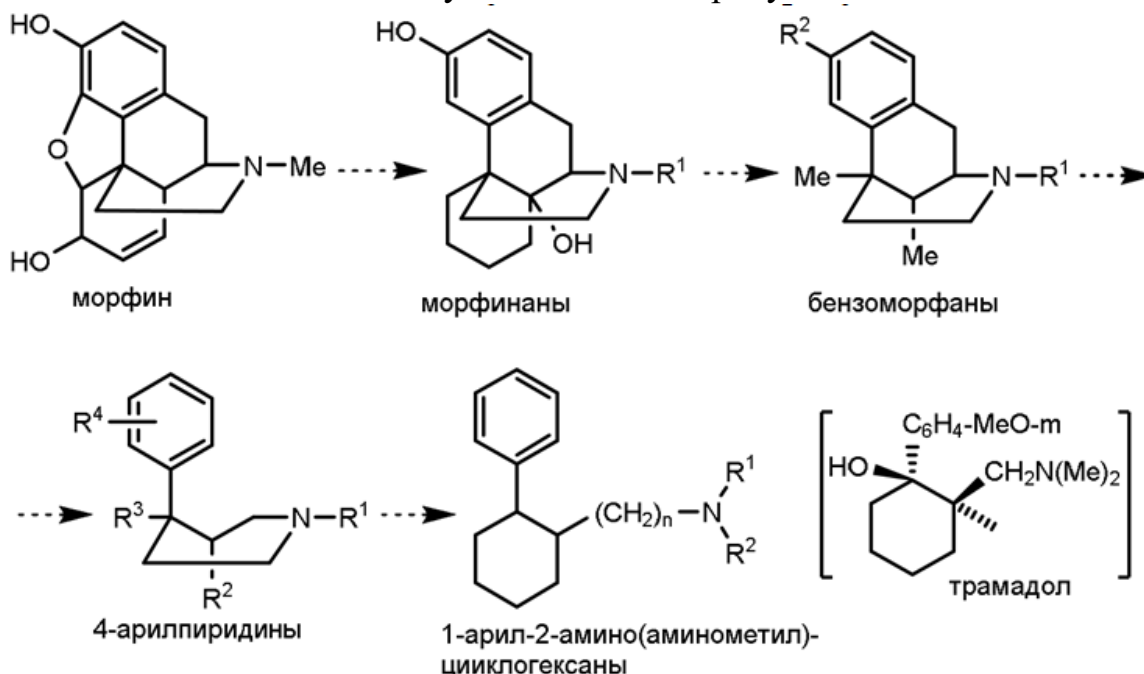
Многие годы ведутся работы по модификации-упрощению структуры лидерной молекулы морфина с целью установления фармакофорного фрагмента и получения на его основе новых синтетических кандидатов и ЛВ обезболивающего действия и при этом не оказывающих наркотического эффекта. Так, было установлено, что кислород, формирующий фурановый фрагмент в морфине, не столь существен для проявления им и его аналогов обезболивающей активности. Например, его дезоксианалоги (морфинаны) оксилорфан (1) и буторфанол (2) обладают сильно выраженными смешанными свойствами агонистов-антагонистов морфина, возможно, благодаря лучшей конформационной подстройке циклогексанового кольца к рецептору:

Анальгетики (1, 2)



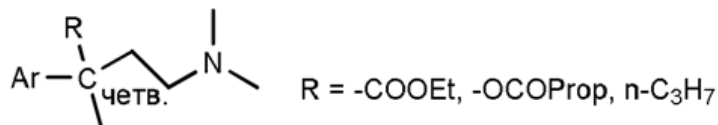
(1) $n = 1$, оксилорфан;
(2) $n = 2$, буторфанол

Дальнейшее постепенное упрощение пентациклического строения морфина (удаление групп атомов, малоактивных к связыванию с биорецептором) позволило сохранить определенную топографию потенциального анальгетика в указанном ниже ряду:



В результате удаления циклогексанового кольца были синтезированы вещества группы бензоморфанов (пентазоцин и др.), которые обладают меньшими анальгетическими и наркотическими эффектами по сравнению с морфином. Затем в результате следующего этапа умозрительного и экспериментального дизайна – «вырезания» бензильной CH_2 -группы (расщепление второго циклогексанового фрагмента), был осуществлён переход к большому семейству мощных анальгетиков 4-арилпиперидинового ряда, обладающих выраженным наркотическим действием. Обнаружение анальгетической активности у серии производных 4-фенилпиперидина привело к выводу правила Бекетта-Кейзи, оказавшегося, несмотря на свою упрощенность, полезным на определенном этапе создания фармакологического блока морфиноподобных анальгетиков, особенно в 1960-1970-х годах. В соответствии с этим правилом при "конструировании"

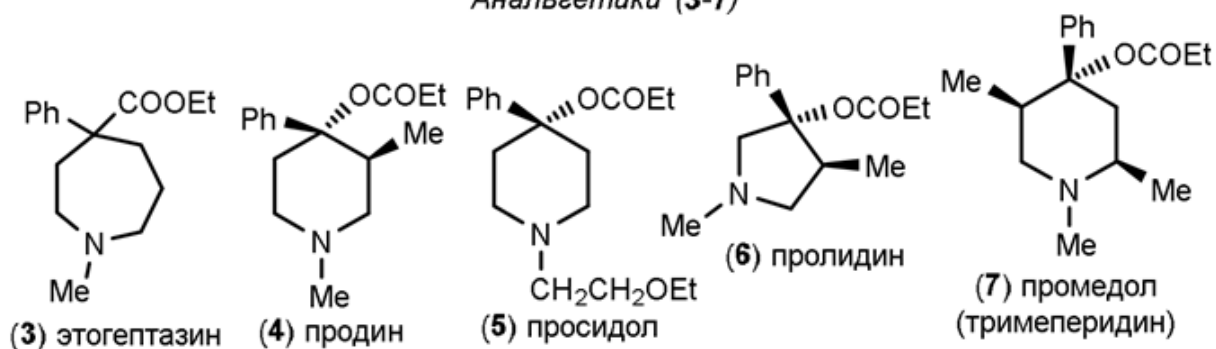
потенциального фармакофора – биоизостеричного морфину анальгетика, взаимодействующего с морфиновым рецептором μ -опиоидного типа, необходимо, чтобы его структура включала: **1)** четвертичный атом углерода; **2)** ароматическое кольцо при этом атоме; **3)** третичный атом азота на расстоянии, эквивалентном двум атомам углерода sp^3 конфигурации, считая от указанного четвертичного атома углерода:



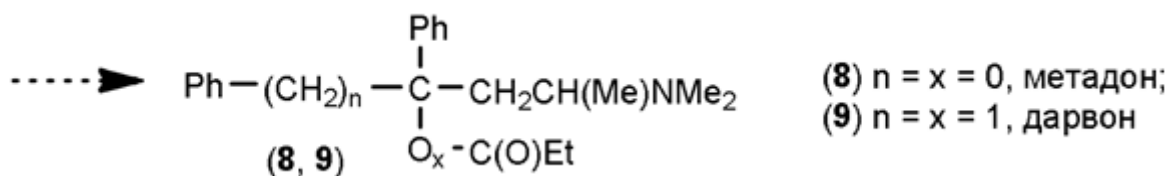
фармакофорный фрагмент по Беккету-Кейзи для пиперидиновых опиоидных анальгетиков

Расширение шестичленного пиперидинового кольца до семичленного (этогептазин **3**) или сужение гетероцикла до пирролидинового (пролидин **6**) не снижает анальгетическую эффективность. Это правило фармакофора работает не только в случае алкоксикарбонильного заместителя при С-4 гетероцикла, но и при его замене на такие группы, как гидроксильная, ацилоксильная, амидная и алкильная (хотя есть и значительное число примеров несоответствия данному правилу). Так, продин (**4**), просидол (**5**), пролидин (**6**) и промедол (тримеперидин, **7**) являются эффективными анальгетиками:

Анальгетики (3-7)



Были сконструированы новые анальгетики опиоидного типа, не содержащие циклического атома азота, которые можно отнести к группе 1-арил-2-амино(аминометил)циклогексанов. Таковым является трамадол (структура приведена выше), обладающий свойствами агониста-антагониста опиатных рецепторов. Он дает быстрый и длительный эффект обезболивания, лишь немного уступающий по уровню активности морфину. Наконец, расщепление азациклоалканового кольца с переходом от анальгетиков типа (3-7) к полизамещённым диметиламиноизоалканам дало возможность сконструировать ещё две лидерные структуры (**8** и **9**), которые обладают обезболивающим действием:



Метадон (8) имеет такую же активность как морфин. Его (-)-изомер нашёл применение в лечении синдрома героиновой абстиненции. Дарвон (декстропропоксифен – правовращающий диастереомер, 9) проявляет в два раза меньшую анальгетическую активность кодеина.

4.6 Химические особенности гликозидов.

Гликозиды — органические соединения, молекулы которых состоят из двух частей: углеводного (пиранозидного или фуранозидного) остатка и неуглеводного фрагмента (т. н. аглика). В качестве гликозидов в более общем смысле могут рассматриваться и углеводы, состоящие из двух или более моносахаридных остатков. Преимущественно кристаллические, реже аморфные вещества, хорошо растворимые в воде и спирте.

Гликозиды представляют собой обширную группу органических веществ, встречающихся в растительном (реже в животном) мире и/или получаемых синтетическим путём. При кислотном, щелочном, ферментативном гидролизе они расщепляются на два или несколько компонентов — агликон и углевод (или несколько углеводов). Многие из гликозидов токсичны или обладают сильным физиологическим действием, например, гликозиды наперстянки, строфанта и другие.

В молекулах гликозидов остатки сахаров связаны с агликоном через атом O, N или S.

В зависимости от природы этих связывающих атомов различают:

- O- гликозиды – $\text{O}-\text{NH}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5$
- C- гликозиды – $\text{C}-\text{NH}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5$
- N- гликозиды – $\text{N}-\text{NH}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5$
- S- гликозиды – $\text{S}-\text{NH}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5$

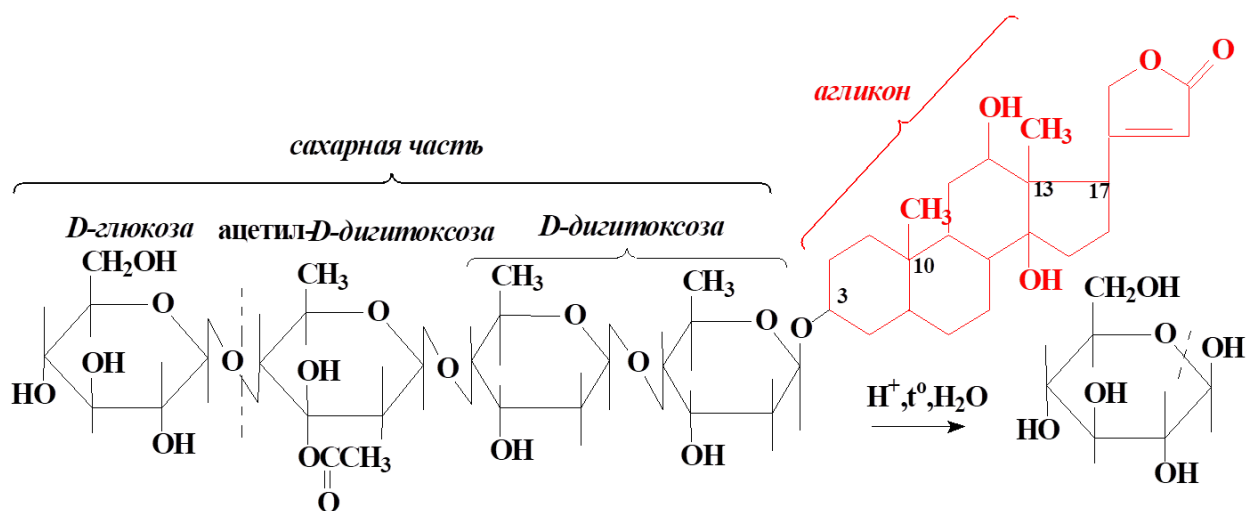
Наибольшее распространение в природе имеют O-гликозиды.

В зависимости от химической природы аглика лекарственные O-гликозиды делятся на группы:

- Цианогенные гликозиды (синильная кислота)
- Сердечные гликозиды
- Сапонины (тритерпеновые и стероидные соединения)
- Антрагликозиды (антрацен)
- Гликозиды-горечи

Сердечные гликозиды - это биологически активные вещества, содержащиеся в некоторых видах растений и обладающие способностью в весьма малых дозах оказывать специфическое действие на сердечную мышцу.

По химической структуре сердечные гликозиды (как и другие) представляют собой эфиры, в молекулах которых гликозидной связью связаны между собой агликон и остатки моно-, ди-, три- или тетрасахарида.



Сердечные гликозиды как правило нейтральные соединения.

Они чувствительны к действию кислот и щелочей. Под действием кислот происходит отщепление легко гидролизуемых 2-дезоксахаров

Под действием щелочи происходит необратимая изомеризация карденолидов или расщепление лактонного цикла с образованием фармакологически неактивных соединений. Под влиянием щелочи в лактонном цикле может происходить перемещение двойной связи из α - β в β - γ положение.

Взаимосвязь между химической структурой и фармакологическим действием на организм:

1. Агликон является носителем биологической активности;
2. Сахарный компонент влияет на скорость всасывания и продолжительность действия;
3. Специфическое действие гликозида на сердце (замедление частоты и усиление сердечных сокращений) обусловлено наличием в молекуле агликона пяти- или шестичленного лактонного цикла в положении 17;
4. На кардиотоническое действие оказывают заместители в положении 10.

Современные исследования в области сердечных гликозидов

1. Поиск новых природных гликозидов и источников их получения;
2. Химические и биохимические трансформации природных карденолидов и буфадиенолидов с целью улучшения их фармакотерапевтических свойств;
3. Повышение содержания сердечных гликозидов в культивируемых видах растений с помощью агротехнических приемов и выведения новых видов.
4. Разработка новых, более совершенных способов выделения из сырья гликозидов, применяемых в медицинской практике.

4.7 Лабораторный практикум по квантово-химическому расчету физико-химических свойств молекул в программе «HyperChem»

Полуэмпирический квантово-химический расчет молекул.

Цель работы: Проведение молекулярно-механического (методом MM+) и полуэмпирического квантово-химического расчета методом MNDO основного состояния молекул и химической интерпретации полученных результатов.

Порядок работы

1. Запустить программу HyperChem.

Осуществляется щелчком по иконке программы на рабочем столе Windows или по файлу Chem.exe в рабочей папке программы (C:\Hyper8\Program\).

2. Построить предложенную многоатомную молекулу.

Для этого разместите на рабочем поле программы атомы предложенной преподавателем гетероциклической молекулы, соблюдая следующие правила: сначала выставляются атомы углерода (ароматические кольца, алифатические цепи), затем остальные группы атомов по очереди (все кроме атомов водорода!), придерживаясь направления вывода атомов по часовой стрелки. Нумерация атомов пройдет автоматически. Для облегчения строения сначала повторите схему молекулы на бумаге.

3. Добавление атомов водорода и оптимизация начальной геометрии молекулы с помощью построителя модели.

Построенную модель автоматически достраивают добавлением атомов водорода в соответствии с представлениями о стандартной валентности элементов и установленной кратностью связей между атомами. Для устранения неточностей выполненного рисунка и построения схемы с более правильной геометрией и коррекцией межатомных расстояний и валентных углов в меню Build выберите **Add H & Model build**. При этом двухмерная схема может преобразоваться в трехмерную. Если атомы водорода не отображаются, то в меню Display необходимо отметить опцию **Show hydrogens**.

Сохраните результаты в **hin**-файле программы HyperChem в вашу рабочую папку под отдельным именем (например, Нитробензол.hin).

4. Запуск log-файла протокола расчета.

В меню **File** выбирают **Start Log**. Файлу дают название и устанавливают степень полноты записи протоколов молекулярномеханического расчета **Mechanics print level = 9**.

5. Расчет молекулы.

Первый метод: Оптимизация геометрии молекулы методом молекулярной механики. В меню **Setup** выбирают метод молекулярной механики (MM+) (**Molecular Mechanics**); в раскрывшемся окошечке устанавливают MM+.

Запускают процесс оптимизации геометрии в меню Compute > Geometry Optimization. После окончания процесса оптимизации в нижней строке окна появляется надпись **Converged=YES** и исчезнет блокировка верхнего меню.

После каждого расчета одним из выбранных методов перед новым расчетом выполняют физико-химическую интерпретацию полученных результатов.

6. Интерпретация результатов расчета методом молекулярной механики

6.1. Анализ строения молекулы. Расчет молекулярных координат (длин связей, произвольных расстояния между любыми атомами, валентных и торсионных углов).

Прежде чем запустить процесс оптимизации геометрии молекулы полуэмпирическим квантово-химическим методом **MNDO**, целесообразно определить геометрические характеристики (длины связей и валентные углы) молекулы, полученные в ходе оптимизации методом молекулярной механики **MM+**.

Измерения геометрии молекулы в **HyperChem** описано в п. 4 первой главы. Выберите для вашего соединения 5 разных характеристических межатомных расстояния и 3 валентных угла (рекомендуется выбирать параметры симметрично независимой части молекулы). Занесите все значения длины связи (в Å) и валентного угла (град) из строки состояния в общую таблицу для сравнения.

Сравните геометрию молекулы, полученную с помощью методов **MM+**, **MNDO** с экспериментом (используйте химические справочники в Интернет). Сделать вывод о точности проведенного расчета.

Как видно точность метода **MNDO** составляет ≈ 0.04 Å для длин связей и $\approx 3-4^\circ$ для валентных углов.

Полученную картинку с видом молекулы необходимо скопировать, используя меню **Edit > Copy image (F9)**. При этом изображение помещается в буфер обмена, откуда может быть вставлено в любой текстовый или графический редактор. Полученное изображение сохраните под соответствующим именем в своей рабочей папке.

Включить отображение номеров или символов атомов можно, выбрав в меню **Display > Labels**, и далее параметр **Number** или **Symbol**. Для 3-х мерных форм отображения молекулы выберите в меню **Display > Rendering**.

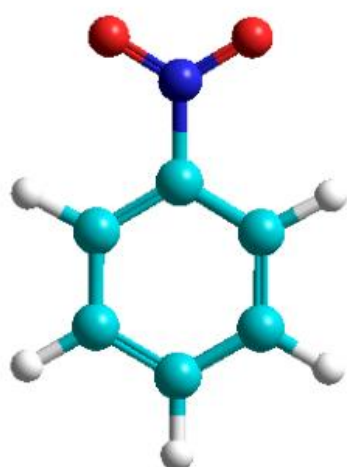
7. Заккрытие log-файла.

Выберите в меню **File > Stop Log**.

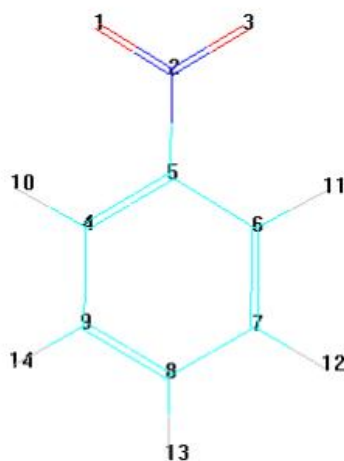
Для метода **MM+** интерпретация заканчивается и можно переходить к методу **MNDO** в следующем пункте. Сохраните результаты в **hin**-файле программы **HyperChem** в вашу рабочую папку под отдельным именем (например, Нитробензол_MM+.hin).

8. Запуск log-файла протокола расчета.

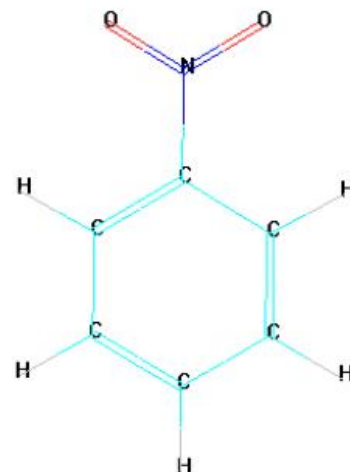
В меню **File** и выбирают **Start Log**. Файлу дают название и устанавливают степень полноты записи протоколов квантовохимического расчета **Quantum print level = 9**



Общий вид молекулы Rendering – Balls and Cylinders



Общий вид молекулы с нумерацией атомов



Общий вид молекулы с подписями атомов

Рисунок 19. Вид молекулы на примере нитробензола

9. Расчет молекулы.

Второй метод: Оптимизация геометрии молекулы и расчет электронной структуры полуэмпирическим методом MNDO.

В меню **Setup** выбирают **Semi-empirical**; в окне устанавливают **MNDO** (для молекул с элементами из III периода и старше - **MNDO/d**). При необходимости при помощи кнопки **Options** устанавливают соответствующий заряд, мультиплетность, основное (**Lowest**) или первое возбужденное (**Next Lowest**) состояние. Запускают процесс расчета с оптимизацией геометрии в меню **Compute > Geometry Optimization**. Расчет заканчивается, когда в низу окна появляется надпись **Conv=YES** и исчезнет блокировка верхнего меню.

10. Интерпретация результатов полуэмпирического расчета

10.1. Анализ строения молекулы. Расчет молекулярных координат (длин связей, произвольных расстояния между любыми атомами, валентных и торсионных углов). Продолжите заполнять таблицу с геометрическими параметрами молекулы. Дальнейшая интерпретация (пункты 10.2-10.10) выполняются только для **MNDO**, так как это касается электронной структуры.

10.2. Расчет дипольного момента и отображение направления его вектора

Включить отображение вектора дипольного момента можно, выбрав в меню **Display > Show dipole moment**. Если данная команда будет недоступна (серый цвет), то потребуются повторный запуск расчета молекулы (меню **Compute > Single Point**). Значения модуля дипольного момента приводятся в **log-файле**.

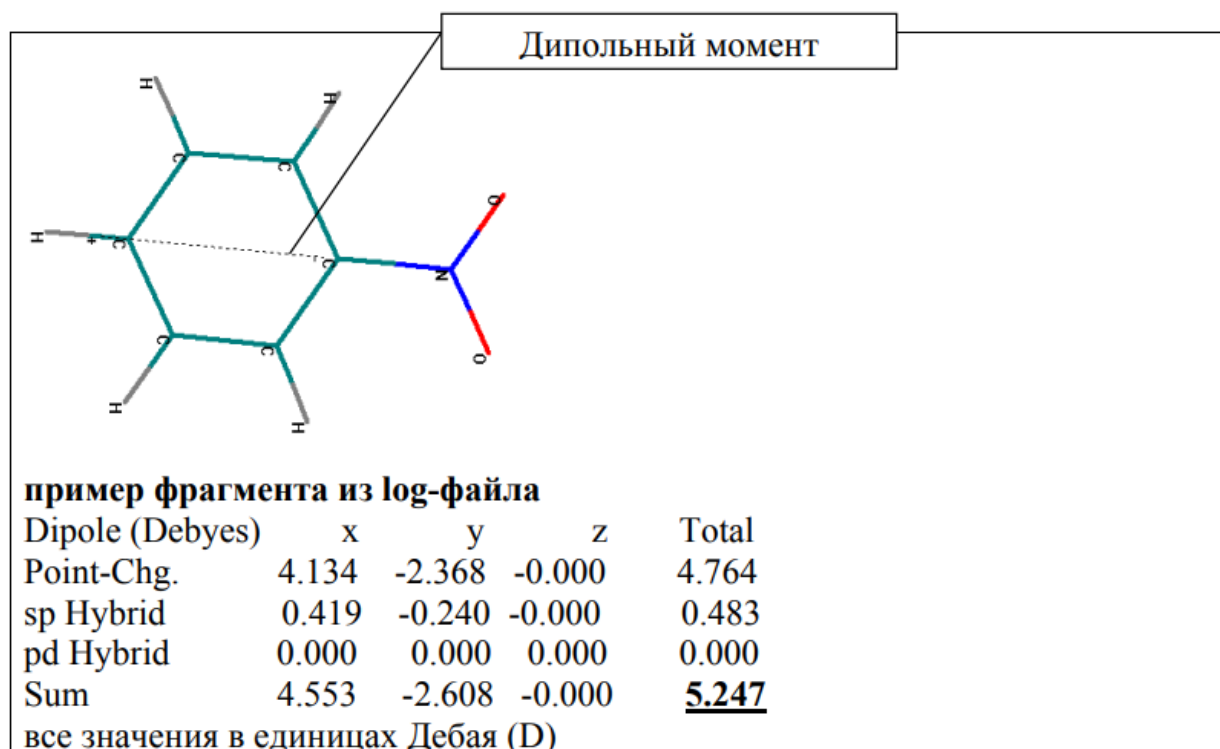


Рисунок 20. Пример демонстрации дипольного момента НБ

Для лучшего просмотра направления дипольного момента поверните молекулу при помощи инструментов вращения или увеличьте масштаб просмотра.

Для выполнения последующих заданий копируйте, используя **Edit > Copy image (F9)**, графическое изображение свойств или параметров молекулы для сохранения под соответствующим именем в своей рабочей папке.

10.3. Оценка растворимости Оценка растворимости производится сравнением электрического дипольного момента молекулы с дипольными моментами известных растворителей, например: $\mu(\text{H}_2\text{O}) = 1,83 \text{ D}$, $\mu(\text{CH}_3\text{OH}) = 1,69 \text{ D}$ (полярные растворители).

На основании близости дипольных моментов делается вывод о преимущественной растворимости в полярном или в неполярном растворителе.

Пример оценки растворимости НБ

Величина дипольного момента нитробензола 5,25 D, т.ч. данное вещество растворяется в сильных полярных растворителях или само является растворителем, т.к. обладает большим дипольным моментом.

Другой пример. Электрический дипольный момент молекулы CClF_3 имеет небольшую величину 0,27 D, следовательно, молекула CClF_3 растворима преимущественно в слабо полярных растворителях.

10.4. Расчет эффективных зарядов атомов, карт электростатического потенциала и полной зарядовой плотности Включить отображение эффективных зарядов атомов можно, выбрав в меню **Display > Labels**, и далее параметр **Charge**.

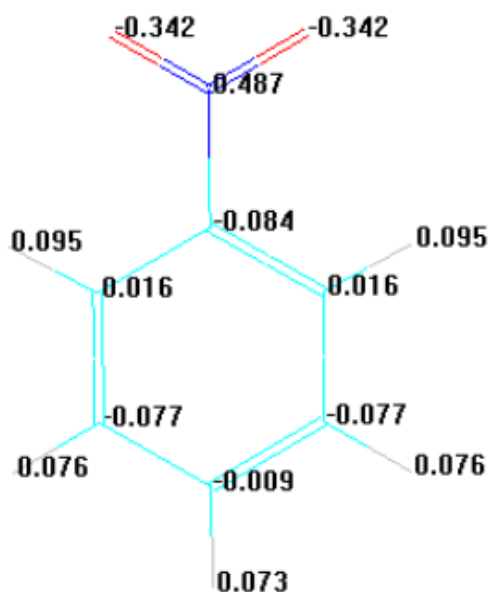


Рисунок 21. Пример оформления эффективных зарядов на атомах НБ

Наблюдаемое распределение зарядов на атомах демонстрирует влияние замещение в бензоле водорода акцепторным заместителем.

Построение распределения электростатического потенциала

В меню **Compute** выберите **Plot Molecular graphs**. В окне выбирают **Electrostatic potential** и устанавливают **3D** или **2D** способ отображения. Данный рисунок показывает области положительного и отрицательного распределения электростатического потенциала. Положительный знак электростатического потенциала отображается зеленым цветом. В области неподеленных электронных парна атомах кислорода электростатический потенциал отрицательный, что отображается сиреневым цветом.

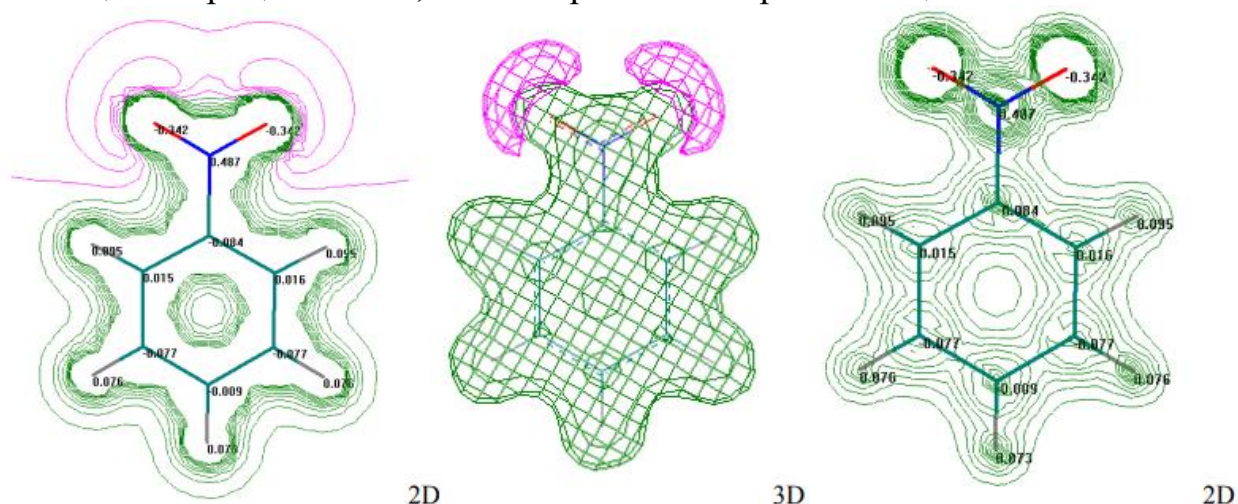


Рисунок 22. Пример оформления электростатического потенциала (2 и 3 D) и полной плотности заряда (2 D) НБ

Это позволяет, например, сделать предположение о взаимодействии молекулы с растворителем. Очевидно, что катионы стремятся подойти к области отрицательного потенциала, анионы к положительной области.

Например, при сравнении анилина $(\text{NH}_2)(\text{C}_6\text{H}_5)$ и нитроанилина $(\text{NH}_2)(\text{C}_6\text{H}_5)(\text{NO}_2)$, в первом случае, на азоте видна неподеленная пара

электронов, в то время как в случае нитроанилина она в большей степени втянута внутрь кольца.

Далее в меню **Compute** выберите еще раз **Plot Molecular graphs**. В диалоговом окне установите **Total charge density** и **3D** или **2D** способ отображения.

Для «выключения» распределения молекулярных потенциалов после того как Вы их скопировали, просто щелкните инструментом **Выбор** правой кнопкой мыши на свободном месте.

10.5. Построение диаграммы энергетических уровней, графическое изображение молекулярных орбиталей верхней занятой (ВЗМО) и нижней вакантной (НВМО)

Для получения энергетической диаграммы выберите в меню **Compute > Orbitals**.

В отличие от неэмпирических расчетов (ab-initio), где учитываются все электроны системы, полуэмпирические методы (например, MNDO) используют валентное приближение. Например, для описания атома F учитывают только 7 электронов из 9. Для атомов N, O и C нитробензола также пренебрегают в MNDO всеми остовными 1s электронами.

Заполненные орбитали выделяются не только цветом (заполненные зеленые, а вакантные сиреневые), но и при помощи галочки **Labels**.

Для получения графического изображения МО в окне Orbitals выбирают номер нужной МО (**Number**), при этом уровень энергии приобретает красный цвет. Далее устанавливают **3D** или **2D** опции отображения, нажимают **Plot** и **Ok**.

Энергия ВЗМО (№23) = -10,312 эВ

Энергия НВМО (№24) = -1,221 эВ.

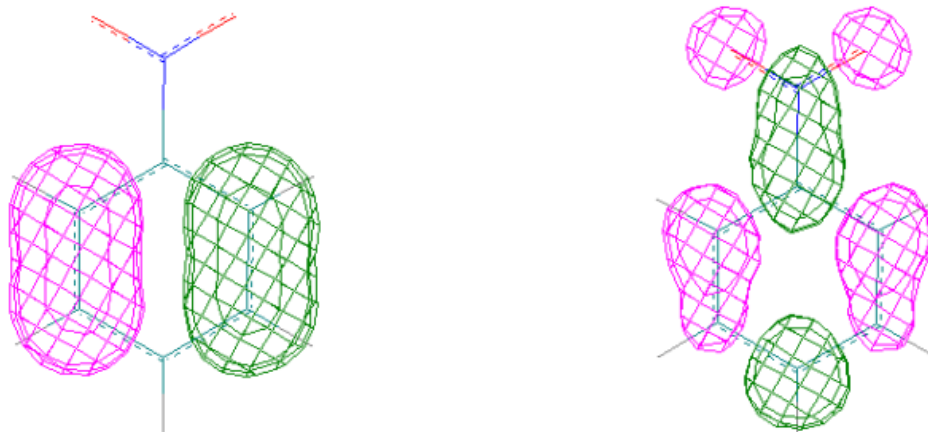


Рисунок 23. Характеристики и 2D формы граничных МО нитробензола

Вклады АО в ВЗМО и НВМО (фрагмент секции Eigenvalues (eV) and Eigenvectors для нитробензола)

Mol. Orbital			23 ВЗМО	24 НВМО
Eigenvalue			-10.312	-1.221
Тип орбитали	Атом	Номер		
Pz	N	2	-0.00000	-0.30188
Pz	O	1	-0.00134	0.21777
Pz	O	3	0.00128	0.21781
Pz	C	4	0.49900	0.36765
Pz	C	5	0.00010	-0.46746
Pz	C	6	-0.49892	0.36775
Pz	C	7	-0.50111	0.18258
Pz	C	8	-0.00013	-0.50831
Pz	C	9	0.50097	0.18267

Представлены только не нулевые значения, действительный размер таблицы будет гораздо больше. Положительные значения коэффициентов при атомных орбиталях дают связывающие вклады в МО, отрицательные значения - разрыхляющие вклады.

10.7. Определение нуклеофильных и электрофильных (донорноакцепторных) свойств молекулы

Данный выбор осуществляется по знаку энергии **НВМО** (нижней вакантной МО) молекулы: если знак «+» – молекула **нуклеофил**; знак «-» - **электрофил**. Объясним почему.

Пример определение нуклеофильных и электрофильных свойств молекулы нитробензола Энергия НВМО (№24) = -1,221 эВ. Энергия НВМО отрицательна, следовательно, нитробензол – электрофил.

В химических реакциях нуклеофил охотнее отдает электрон, а **электрофил**, наоборот, охотнее захватывает его. Если энергия электрона на НВМО положительна, это означает, что пребывание электрона на ней энергетически невыгодно, т.е., попав на нее при возбуждении, электрон может покинуть молекулу. Таким образом, при $E_{\text{НВМО}} > 0$ молекула является акцептором электронов. Наоборот, если $E_{\text{НВМО}} < 0$, «чужой» электрон, попав на наинизшую незанятую орбиталь молекулы, остается на ней, поскольку это энергетически выгодно, т.е. молекула будет донором электронов.

10.8. Определение жесткости и мягкости молекулы.

Определить **потенциал возбуждения** молекулы по формуле: $\Delta E = E_{\text{НВМО}} - E_{\text{ВЗМО}}$.

Жесткость молекулы рассчитывается по формуле: $\eta = (E_{\text{НВМО}} - E_{\text{ВЗМО}})/2$.

Мягкость молекулы связана с жесткостью соотношением: $S = 1/(2\eta)$, т.е. $S = 1/(E_{\text{НВМО}} - E_{\text{ВЗМО}})$.

Реагент считается жестким, если энергетическая щель между **ВЗМО** и **НВМО** превышает 1 эВ; реагент считается мягким, если энергетическая щель между **ВЗМО** и **НВМО** менее 1 эВ.

Пример определение жесткости или мягкости молекулы НБ У молекулы нитробензола разница между положениями НВМО и ВЗМО > 1 эВ.

Вывод: Молекула НБ является жестким электрофилом.

Жесткость молекулы: $\eta = (E_{\text{НВМО}} - E_{\text{ВЗМО}})/2 = (-1,221 + 10,312)/2 = 4,545$ эВ.

10.9. Расчет положения реакционных центров молекулы

Положение главных реакционных центров в жестких реагентах приближенно определяется зарядами на атомах. Нужно привести распределение зарядов на атомах исследуемой молекулы по Малликену и на основании их величин и знаков сделать вывод о наиболее вероятных направлениях атак в химических реакциях.

Положение реакционных центров в мягких реагентах определяется граничной плотностью электронов на атомах. Граничная плотность электронов на атоме А рассчитывается по формуле:

$$f_a = 2 \sum_{\mu=A} c_{i\mu}^2$$

где $c_{i\mu}$ - коэффициенты разложения граничной МО (**ВЗМО** нуклеофила или **НВМО** электрофила) по АО, центрированным на атоме А. Можно рассчитать величины f_A и на их основании сделать вывод о наиболее вероятных направлениях атак.

Пример определение положения реакционных центров.

Реакционная способность молекулы нитробензола как жесткого реагента определяется зарядами на атомах. Распределение максимальных зарядов на атомах следующее:

O ₃	-0,342
O ₂	-0,342
N ₁	0,487

Максимальный отрицательный заряд на атомах О.

Вывод: Атомы О – наиболее вероятные центры электрофильной атаки.

Для оценки направления атаки реагента на один из альтернативных реакционных центров также используют величины зарядов на них (зарядовый контроль), величины и знаки коэффициентов АО ВЗМО или НВМО (орбитальный контроль).

Для сравнения реакционной способности в ряду соединений важно знать и величины и знак энергии граничных орбиталей $E_{\text{ВЗМО}}$ и $E_{\text{НВМО}}$. В реакциях электрофильного и нуклеофильного замещения в ряду ароматических и гетероароматических соединений используется зарядовый контроль.

10.10. Моделирование вибрационного (колебательного) спектра молекулы и определение характеристик наиболее интенсивных мод колебаний.

Колебания атомов исследуемых молекул рассчитываются с использованием координат атомов, полученных после оптимизации пространственных структур методами MM+, MNDO. Расчет колебательного спектра запускается путем выбора пункта меню **Compute > Vibration, Rotation Analysis**. Расчет заканчивается, когда в нижней строке окна появляется надпись **Calculating Vibrational Spectrum...** или **100%** и становится доступным верхнее меню. Время расчета вибрационного спектра, как и в случае определения электронной структуры и равновесной геометрии, пропорционально сложности молекулы.

Просмотр результатов моделирования вибрационного спектра осуществляется в меню **Compute > Vibrational Spectrum**. Далее в окне **Vibrational Spectrum** выберите 3-4 самые интенсивные моды нормальных колебаний и зафиксируйте в отчете: номера, частоты и интенсивности активных полос. Значения частот (в cm^{-1}) также приводятся в финальной части log-файла (см. пример).

пример модельного ИК-спектра для нитробензола (фрагмент log-файла)

===== IR Spectrum =====

31 Normal Mode Frequency **1827.60 cm^{-1}** Intensity **285.13387**

...

28 Normal Mode Frequency **1605.93** Intensity **221.70650**

...

11 Normal Mode Frequency **726.64 cm^{-1}** Intensity **102.257**

...

Первые две частоты относятся к валентным колебаниям NO и CN связей, а третья к групповым деформационным колебаниям молекулы.

Для просмотра колебаний выставите флажок **Animate Vibrations** и нажмите кнопку **Apply**. Остановить колебания можно командой **Cancel** в меню. Сравните модельный ИК-спектр с экспериментом. Все ли частоты положительны? Проанализируйте мнимое колебание с отрицательными частотами.

10.11. Дополнительно приведите из log-файла энергетические характеристики молекулы (перевод в приложении 1).

пример для нитробензола

ENERGIES AND GRADIENT

Total Energy = -35381.2387025 (kcal/mol)

Binding Energy = -1503.6380795 (kcal/mol)

Isolated Atomic Energy = -33877.6006230 (kcal/mol)

Electronic Energy = -150210.5977513 (kcal/mol)

Core-Core Interaction = 114829.3590488 (kcal/mol)

Heat of Formation = 14.3299205 (kcal/mol)

Gradient = 0.0952986 (kcal/mol/Ang)

11. Заккрытие log-файла.

Выберите в меню **File > Stop Log**. Сохраните результаты в hin-файле программы HyperChem в вашу рабочую папку под отдельным именем (например, Нитробензол_MNDO.hin).

12. Подготовьте отчет в редакторе Word или OpenOffice.

Задание на лабораторную работу

Согласно приведенного выше примера рассчитайте методами MM+ и MNDO геометрическую структуру, электронные, спектральные характеристики и опишите химические свойства и реакционную способность одной из предложенных молекул.

Отчет по работе должен состоять из 3-х частей, содержащих следующий материал:

1. Предварительный расчет соединения молекулярномеханическим методом **MM+**.

2. Оптимизация полуэмпирическим методом **MNDO**.

3. Интерпретация результатов расчета. Включите данные по молекулярной геометрии, вставьте все изображения и подпишите их, проведите обсуждение результатов.

Занятие 5.

Тема занятия: Эмпирические основы дизайна пролекарств для моделирования их биологической активности. Аминокислоты, пептиды, белки.

Цель занятия: Изучить эмпирические основы дизайна пролекарств для моделирования их биологической активности.

Вопросы к занятию:

1. Распознавание белковыми мишенями лекарственного вещества
2. Дизайн активного центра белка известной структуры
3. Дизайн активного центра белка неизвестной структуры по методу гомологии
4. Дизайн модели всего белка
5. Природные белокобразующие α -аминокислоты
6. Функциональная протеомика.
7. Строение, функции и активные центры ферментов
8. Белковые рецепторы-мишени. Строение и функции

5.1 Распознавание белковыми мишенями лекарственного вещества

Кроме кластерного статистического анализа-прогноза свойств потенциальных лекарств применяют также метод компьютерного предсказания биологической активности ПЛВ, основанный на моделировании фармакодинамического межмолекулярного взаимодействия ПЛВ с биомишенью белкового типа. Напомним, что в человеческом геноме закодировано до десяти тысяч потенциальных биомишеней. Основным типом биомишеней для известных ЛВ являются ферменты и рецепторы (до 80% от всех мишеней). Биомишень и ЛВ должны распознать друг друга на «дальнем» расстоянии перед тем, как начать «тесно» взаимодействовать между собой. В акте дальнего узнавания мишени и ЛВ решающее значение имеют трёхмерные электростатические поля, которые окружают каждого партнёра-участника. В молекулярном моделировании имеются методы расчёта молекулярных электростатических потенциалов (МЭП), которые являются основным параметром для изучения подобных взаимодействий. Рецепторный белок (РБ) и взаимодействующий с ним агент-ПЛВ обладают на молекулярном уровне информацией, которую они считывают при приближении друг к другу, тем самым распознавая друг друга. В процессе ближнего распознавания включается энергия их координационного взаимодействия (по активным точкам, фрагментам и молекулам в целом) и начинает таким образом формироваться их комплекс РБ×ПЛВ. При сближении участников вступают в межмолекулярное взаимодействие их заряды и диполи. Очевидно, что для возникновения близких контактов между партнёрами они должны иметь химическую, структурную и стереоспецифичную комплементарность соответствующих друг с другом фрагментов. Вызывающее биоэффект взаимодействие между ЛВ и его биомишенью происходит через единый комплекс, в образовании которого

могут участвовать слабые силы донорно-акцепторной природы разного типа. В основном это силы электростатического или ион-ионного взаимодействия, ион-дипольного и постоянного диполь-дипольного взаимодействия, индуцированного диполь-дипольного взаимодействия (временных ван-дер-ваальсовых или дисперсионных сил), силы водородных связей и силы гидрофобного взаимодействия. Очевидно, что все указанные силы могут действовать между ЛВ и рецептором одновременно (кооперативно) и сообщать образуемому комплексу стабильность, достаточную для проявления биологической активности. Таким образом, рецепторный белок (РБ) и взаимодействующий с ним агент-ПЛВ должны обладать на молекулярном уровне информацией, необходимой для распознавания друг друга, последующего координационного взаимодействия (по активным точкам и комплементарным с точки зрения геометрического и энергетического соответствия фрагментам).

Рецепторный белок (как и фермент), имеет активную зону, которая может быть представлена некоторой кодированной информацией. Эта молекулярная информация содержит данные о размере, форме и структурном графе (вершинах и рёбрах активных групп и центров) каждого сегмента макромолекулы. К другим важным закодированным сведениям относятся данные о конформационной динамике молекулярных фрагментов (эти данные необходимы для наведения гибкого структурного соответствия между РБ и ПЛВ), об их хиральности, наличии зарядах, полярности и поляризуемости, о вандер-ваальсовых объёмах атомов, о гидрофобном притяжении (или отталкивании), о реакционной способности различных заместителей и групп атомов. В структуре ПЛВ содержится аналогичная информация. Создаваемая модель активного участка рецепторного белка должна обеспечивать наибольшую суммарную кооперативность его взаимодействий с конструируемым ПЛВ.

5.2 Дизайн активного центра белка известной структуры

Для дизайна активного центра известной белковой мишени определяют её первичную структуру, как экспрессируется этот белок и какова его метаболическая судьба. Для установления правильной последовательности АКО в цепи белка и выявления его АЦ надёжнее всего получить данные РСА самого белка и конформацию ЛВ в его комплексе с этим АЦ. Это не всегда удаётся сделать с высокой точностью из-за трудностей с точной локализацией атомов. Точность значений индикатора теплового движения атома (В-фактор) не всегда достаточно высока, и хорошее разрешение достигается лишь при значениях менее одного ангстрема (при значениях от 1 до 2 Å можно получить только форму функциональной группы, а при разрешении в 3 Å структура слишком размыта). Если по РСА может быть разрешена вся структура белка, то при использовании 2D ЯМР последовательность АКО устанавливают только в локальных участках белка. Применение ядерного эффекта Оверхаузера

(NOE) позволяет рассчитать межъядерные расстояния (границы геометрии АЦ белковой молекулы) с последующей оптимизацией положения атомов по силовому полю.

5.3 Дизайн активного центра белка неизвестной структуры по методу гомологии

При отсутствии данных РСА и моделей по данным 2D ЯМР прибегают к построению модели АЦ неизвестного белка по методу гомологии. На первом и втором этапах проводят отнесение неизвестной белковой мишени к семейству родственных белков, что осуществляется по базам данных различных программ (алгоритм для построения активной зоны в случае рецептора неизвестной структуры по гомологии можно найти в интернете по адресу: <http://www.umass.edu/molvis/workshop/homolmod/html>). После поиска и идентификации шаблонного или темплатного белка (ШБ или ТБ) с известными данными РСА определённых фрагментов-участков (α -спиралей, β -листов), эти идентичные для обоих белков (доля идентичности последовательностей АКО в обоих белках не должна быть ниже 40%), собирают, проверяют и оптимизируют полученную модель АЦ. При этом учитывается, что гидрофильные АКО белка должны предпочтительно «смотреть» («торчать») наружу, а гидрофобные АКО – внутрь. Полярные группы АКО могут находиться также и внутри белковой глобулы, где они участвуют в формировании АЦ фермента или рецептора, а также связывают простетические группы, кофакторы и ионы металлов в металлоферментах. Для шаблона структура должна быть разрешена по РСА не более 2Å, а R-фактор (мера между 3D-структурой и реальной структурой) должен быть не более 20% ($R = 0.1-0.2$). При этом установлены эмпирические правила, которые упрощают решение проблем гомологии. Например, два белка считаются гомологичными (родственными с вероятностью более 50%), если каждый из них содержит аминокислотные последовательности (из 100 и более аминокислотных остатков) с идентичностью отдельных участков АКО в этих последовательностях, превышающей 25%. Если подобная идентичность составляет 15-25%, то эти два белка родственны с вероятностью менее 50%. Если же идентичность менее 15%, то белки неродственны и их глобулярные трёхмерные структуры будут иметь большие различия. В прогнозе модели белка учитывают также стереохимические и статистические правила. Например, по статистике во всех белках 90% остатков таких аминокислот, как Ala, Arg, Gln, Glu, Met, Leu и Lys участвуют предпочтительно в образовании α -спиралей, а 90% Cys, Ile, Phe, Thr, Trp, Tyr и Val образуют β -листы и шпильки. Окончательное пространственное распределение тысяч атомов устанавливается расчётами по методам молекулярной механики или молекулярной динамики.

На третьем этапе проводят попарное и множественное выравнивание последовательностей (соответствий) АКО в консервативных сегментах шаблона и изучаемой неизвестной мишени. На этом шаге алгоритма

заменяют в моделируемом АЦ белка боковые цепи в неидентичных АКО шаблона, оптимизируя конформацию АКО в новых цепях в режиме 3D. Четвёртый этап – итерационный дизайн консервативных областей моделируемой неизвестной мишени с использованием координат шаблона, переносимых на модель наложением структур. Далее (5-7-й этапы) следует дизайн переменных сегментов конструируемой модели, и проводится оптимизация модели РБ в целом по температуре, по конформации, по силовым полям и по растворителю. При этом оптимизируют трехмерную (вторичную) структуру модельной мишени на основе минимизации энергии и молекулярной динамики локальных конформационных пространств. У окончательной модели должны быть сняты стерические напряжения и учтена возможность «плохих» (близких) ван-дер-ваальсовых контактов между АКО и/или Н-атомов. Иногда прибегают к ручной подгонке конформаций. Конечной операцией является валидация сконструированной модели АЦ белка неизвестной структуры. Она заключается в её проверке (по соответствующим программам) на правильность в сравнении с данными РСА по длинам и углам связей, боковым ветвям, по взаимодействию несвязанных атомов, силовым потенциалам, рассчитанным объёмам и контактам атомов, по распределению гидрофобных и гидрофильных областей и дозированной упаковке АКО. При обнаружении ошибок на шаге валидации проводят итерацию «назад» к пп.1-6, проверяя скелетный остов по другому шаблонному белку, или задаются другими ротамерами АКО. Таким образом, гомологическими методами – на основе знаний структуры белкешаблона, – прогнозируется модель АЦ вторичной структуры биомишени у ферментного, рецепторного белка или белкового антитела.

5.4 Дизайн модели всего белка

В межмолекулярном распознавании, взаимодействии, связывании и образовании комплексов ПЛВ с АЦ ферментов определяющую роль играют их электростатические потенциалы, энергии сольватации, энергии их межмолекулярного взаимодействия и энергии гидрофобных полей. Для построения конечной модели белка в целом, для прогноза и картирования его взаимодействий с ПЛВ созданы программы, по которым рассчитывают указанные выше энергетические характеристики. При этом, как уже указывалось выше, в прогнозе модели всего белка учитывают как статистические, так и стереохимические методы, а окончательное распределение всех атомов устанавливается методами молекулярной механики (МММ) или молекулярной динамики. По МММ (эмпирическому, в отличие от квантовомеханического, расчёту энергии атом-атомных взаимодействий для создания приближённых моделей) определяют силовые поля белка и электростатические взаимодействия. Обычно при этом используют эмпирические приёмы, в которых заряды описывают как точечные в центрах атомов. Причём заряды считают не по всему белку, а по малым фрагментам – по конкретным АКО, особенно расположенным в АЦ.

Эти данные собраны в современных библиотеках АКО. Алгоритмом МММ (пример программы находится по адресу <http://www.gromacs.org>) решают классические уравнения движения механики Ньютона, которые связывают конформационную подвижность макромолекулы белка с массой каждого атома, его радиусом-вектором и с классическим полем, которое определяется координатами всего ансамбля задействованных атомов. При моделировании траектории движения в системе поддерживаются определённые условия по давлению и температуре. Использование методов «отжига» при температурах 300-400 К или ниже избегают геометрических обращений амидной связи. На выходе получают координаты атомов системы, их скорости в зависимости от времени и энергию взаимодействия молекул (потенциальное поле). Полученные данные проверяются на: планарность пептидной связи, ароматических и гетероароматических заместителей; предпочтительность её трансконфигурации (допустимо лишь 5% цис-формы); хиральность атомов и цепи (только L-конфигурация АКО в белке и α -спираль правой конформации); длины и углы связей в цепи (торсионный угол $C\alpha-N-C1C\beta$ каждого АКО лежит между 230 и 450).

Качество и достоверность полученной модели белка (её валидация) подвергаются затем сверке по программам на соответствие требуемым свойствам («индексам качества»). Проверяется правильность упаковки модельного белка, которая должна быть очень компактна, упорядочена, без зазоров между спиралями и листами. При этом должны отсутствовать слишком плотные ван-дер-ваальсовы контакты. Поверхность глобулы белка должна быть, как правило, гидрофильна и может содержать до 27% гидрофильных заряженных и полярных АКО (например, Asp, Glu, Lys, Arg). Внутренняя часть глобулы преимущественно должна быть гидрофобна, и в ней преобладают АКО с неполярными боковыми заместителями (например, Val, Leu, Ile, Phe, Ala, Gly – до 63%). В области АЦ возможны его различные формы в виде щелей, карманов, канавок и других полостей, в том числе индуцируемые связыванием с ПЛВ. Имеются программы по компьютерному автоматизированному поиску в моделируемом белке щелей, карманов, канавок и других полостей в сравнении с компьютерными данными по АЦ уже известных белков. При этом предполагается, что найденная у моделируемого белка полость будет для него АЦ. В самом моделируемом АЦ путём сравнения с известными белками определяют все ключевые АКО. Последующее симулирование молекулярной динамикой позволяет контролировать изменение конформаций ПЛВ и АЦ при их взаимодействии.

5.5 Природные белокобразующие α -аминокислоты

Свободные природные α -аминокислоты и особенно их полимерные полиамидные производные – олигопептиды, полипептиды и протеины (белки), – имеют важнейшее биологическое значение и играют неоценимую роль в поддержании жизнеспособности и здоровья человека. Для реализации подобных биологически важных функций природа выбрала двадцать

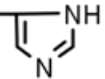
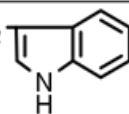
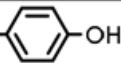
основных α -аминокислот (АК), которые при их соконденсации образуют указанные выше олигомерные и полимерные молекулы. В их состав могут входить от нескольких аминокислотных остатков (АКО) до нескольких сотен и даже тысяч таких остатков (олигопротеиды и, собственно, белки).

К настоящему времени установлено строение и физиологические функции многих аминокислот, олигопептидов и протеинов. Важно иметь в виду, что их свойства в большой мере определяются природой боковых заместителей в АКО – полярных и неполярных, кислотных и основных, гидрофобных и гидрофильных, алкильных, ароматических и гетероароматических.

В Таблица 5 представлено названия, структуру, некоторые свойства и области применения двадцати белковых (т.е., входящих в состав белков) α -аминокислот (1-20).

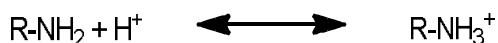
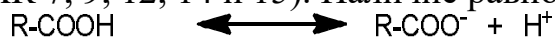
Таблица 5. Двадцать белковых α -L-аминокислот

№	символ	Название*	Трёх-буквенный символ		Структура (значение изоэлектрической точки pH_i)	Применение
			4	5	6	
1	А	Аланин	Ala	Ала	$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{Me}$ (6,0)	а
2	С	Цистеин	Cys	Цис	$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{SH}$ (5,0)	г; лечение бронхита; добавка в производ- стве хлеба
3	Д	Аспараги- новая кислота	Asp	Асп	$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{COOH}$ (5,5)	а,б
4	Е	Глута- миновая кислота	Glu	Глу	$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ (3,2)	а
5	Ф	Фенил- аланин*	Phe	Фен	$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ (5,5)	б

6	G	Глицин	Gly	Гли	$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{H}$ (6,0)	б
7	H	Гистидин	His	Гис	$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{NH}$ (7,6) 	г; противояз- венное средство
8	I	Изолейцин*	Ile	Иле	$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\underset{\text{Et}}{\overset{\text{Me}}{\text{CH}}}$ (6,1)	в
9	K	Лизин*	Lys	Лиз	$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ (9,8)	Пищевая и кормовая добавка
10	L	Лейцин*	Leu	Лей	$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{CHMe}_2$ (6,0)	в
11	M	Метионин*	Met	Мет	$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S-Me}$ (5,7)	Кормовая добавка
12	N	Аспарагин	Asn	Асн	$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$ (6,3)	Диуретик
13	P	Пролин	Pro	Про	$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}}{\text{CH}}_2$ (6,3) 	в
14	Q	Глутамин	Gln	Глн	$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$ (5,7)	В лечении язв
15	R	Аргинин	Arg	Арг	$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(\text{NH}_2)=\text{NH}$ (10,8)	Лечение печени
16	S	Серин	Ser	Сер	$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{OH}$ (5,7)	Космет. добавка
17	T	Треонин*	Thr	Тре	$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\underset{\text{OH}}{\overset{\text{Me}}{\text{CH}}}$ (5,6)	Кормовая добавка
18	V	Валин*	Val	Вал	$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}(\text{Me})_2$ (6,0)	в
19	W	Триптофан*	Trp	Три	$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2-$ (5,9) 	в, г
20	Y	Тирозин	Tyr	Тир	$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2-$ (5,7) 	в

Примечания: * Незаменимые аминокислоты; а – усилитель вкуса и аромата; б – синтез подсластителей; в – медицинское питание в виде растворов для внутривенных инъекций; г – антиоксидант.

Аминокислоты (АК) подразделяют, в зависимости от свойств заместителей, на три группы: кислотные (имеющие две карбоксильные группы), нейтральные (у которых нет заместителя, как у глицина, или в качестве заместителя имеется алкильная, арильная или другая слабоосновная или слабокислая группа) и основные (имеющие в качестве заместителя группировку в виде азотистого основания – аминогруппу, имидазольный радикал, гуанидильную группу). В зависимости от свойств заместителей АК имеют разные значения изоэлектрических точек (рН_i). Последние характеризуют величины рН среды, при котором АК или иной амфолит (т.е. вещество, которое может служить как акцептором, так и донором протона) находится в водном растворе только в свободной молекулярной неионизированной форме. рН среды вне и внутри клетки влияет на ионизацию ЛВ, АК и аминокислотные остатки (АКО) в белковых молекулах и, тем самым, на их липофильность и сродство ЛВ и АК к АКО в активном центре фермента или рецептора. Остатки аминокислот в активном центре (АЦ) белков могут иметь анионные формы, например, дикарбоновые АКО 3 и 4, или у АКО 2, 16, 17, 20, которые содержат тиольные и гидроксильные группы. Другие АКО могут быть протонированы и содержать катионные N⁺-формы (в случае АК 7, 9, 12, 14 и 15). Наличие равновесия в реакциях:



способствует прохождению неионизированных форм через клеточную мембрану с последующей ионизацией и взаимодействием с ферментами и рецепторами. Так, у некоторых ЛВ фармакокинетика оптимальна для нейтральных форм, а фармакодинамика лучше для анионных форм. Поэтому при дизайне ПЛВ важно получать модели при различных рН, чтобы найти оптимальную активность транспорта ЛВ и его взаимодействия с АЦ белка.

Все белковые АК – за исключением глицина (6),- обладают L-конфигурацией α-углеродного тетраэдрического атома, которая возникает при замене в глицине одного из двух протонов метиленовой группы на RCH₂-или R₁R₂CH-группу. Все АК, приведенные в таблице 6.1, можно представить не только как производные глицина, но и как производные α-аланина (1), в структуре которого один или два атома водорода метильной группы замещены на группу атомов (SH, OH, Ph, COOH, CONH₂ и т.п.). Основную группу АК, как видно из табличных данных, составляют производные алифатического ряда, но некоторые АК имеют ароматический заместитель (фенилаланин 5 и тирозин 20) или гетероцикл (гистидин 7 и триптофан 19). Несколько особняком стоят производные пирролидина – пролин (13) и 4-гидроксипролин; в них аминогруппа включена непосредственно в цикл и является вторичной.

Целый ряд АК и, прежде всего не синтезируемых в организме человека, так называемых незаменимых α -L-аминокислот (5, 8-11, 17,19), должны поступать в достаточном количестве с пищей или в виде пищевых добавок. Производство синтетических и микробиологических аминокислот, как диетических, так и кормовых, начатое с 1960-х годов, стало в настоящее время крупнотоннажным. Они в настоящее время нашли широкое применение в медицине в качестве лекарственных веществ и лечебного питания, в сельском хозяйстве в качестве ростстимулирующих и кормосберегающих добавок и в пищевой промышленности в качестве вкусовых, консервирующих веществ и биологически активных добавок. Добавки природных α -аминокислот в косметику как в свободном виде, так и в виде олигомерных гидролизатов, приводит к нормализации белкового и водного баланса кожи, биостимуляции обменных процессов и в целом к оздоровлению кожного покрова. О важном практическом значении некоторых индивидуальных АК говорят следующие цифры. Ныне простейшую α -аминоуксусную кислоту – глицин, получают в количестве более 10 тысяч тонн в год; мировое производство лизина превысило 150 тысяч тонн, глутаминовой кислоты – полмиллиона тонн!

5.6. Функциональная протеомика.

Протеомика – наука, изучающая весь набор эндогенных белков организма, их структуры, их биосинтез и метаболизм, называется протеомикой. Установлением функций, которые они выполняют в организме, занимается функциональная протеомика. Протеом человека содержит около полумиллиона белков. В то же время методом РСА установлена молекулярная и кристаллическая структура лишь более десяти тысяч из них. Точное строение остальных белков и особенно их функций пока не известно, что подчёркивает огромную сложность дизайна ПЛВ, которые должны взаимодействовать с ними. Протеомика решает следующие задачи. Это прежде всего идентификация всех белков данного организма и установление их строения. Затем определяются пути биосинтеза и метаболизма каждого эндогенного белка и изучаются место его экспрессии. Наконец, выясняются функции эндогенных белков. На сайтах <http://www.hupo.org> и <http://en.wikipedia.org/wiki/Proteomics> представлены данные о белках и протеомах отдельных органов в норме и при заболеваниях мозга, печени, плазмы крови, сердца и стволовых клеток. В них же имеются данные о выделении и идентификации белков, об установлении последовательности АКО в белках и изучении их вторичных, третичных и четвертичных структур.

Белковые биомишени по их биологическим функциям подразделяют на три группы: 1) ферменты; 2) рецепторы; 3) антитела. Белковые биомишени по семействам классифицируют на четыре группы: А) имеющие аналогичные участки в первичной организации белка (близкие последовательности АКО); Б) имеющие специфические мотивы –

непрерывные фрагменты в последовательности АКО, характерные для уже известных семейств; В) имеющие аналогичные участки во вторичной структурной организации белка (α -спирали, β -листы, шпильки, неупорядоченные фрагменты; Г) имеющие аналогичную аффинность (сродство) к данному набору и характеру структур ПЛВ. В последнем случае вместо аффинности, которую прогнозировать затруднено по свободной энергии связывания с лигандами, используют описание сродства на основе дескрипторов межмолекулярного взаимодействия – электростатических, диполь-дипольных, Н-связей, дисперсионных сил и гидрофобных контактов.

5.7. Строение, функции и активные центры ферментов

Важнейшими представителями протеома любого организма являются ферменты, функции которых заключаются в катализе специфических биохимических реакций, происходящих в каждом живом организме для поддержания его нормальной жизнедеятельности. Они помогают организму своевременно метаболизировать пищевые молекулы, синтезировать нужные структурные белки (например, мышечные), получать энергию для поддержания нормальной температуры тела, для движения, для осуществления мыслительных процессов. Нарушение функциональной активности этих жизненно важных макромолекул обычно приводит к возникновению разнообразных заболеваний у человека, что говорит о необходимости знать структуру и функции ферментов. Напомним, что из известных типов биомишений для лекарственных веществ ферменты составляют около 50% (главным образом это протеазы и киназы – около 30%).

Каждое мгновение в живой клетке протекает множество различных химических реакций, в которых образуются и разрушаются миллионы сложных органических молекул. Впечатляют не только масштабы работы этой биохимической машины, но и согласованность работы всех ее частей, высокие скорости, стереоселективность и мягкие условия химических превращений (нормальное давление, обычно нейтральная среда и невысокая температура от 36 до 40°C). Отработанная природой технология давно служит для химиков идеалом, к которому они постоянно приближаются. Центральным звеном этой технологии являются специфические биокатализаторы, называемые ферментами (от лат. ферментаре – вызывать брожение, сварение) или энзимами (от греч. эн – внутри и зима – закваска).

Функционируют ферменты подобно молекулярным роботам или природным наноразмерным манипуляторам. Они распознают и захватывают реагирующие молекулы (субстраты), сближают и строго ориентируют их в пространстве, активируют и ускоряют процесс их превращений, а затем быстро удаляют образовавшиеся продукты (метаболиты) из реакционной зоны, освобождая место для следующих молекул субстрата. По сравнению с катализом в химии биокатализаторы способны в миллионы раз ускорять аналогичные реакции.

Запуск ферментативных реакций находится под гормональным контролем и для этого организм синтезирует около 50 гормонов, сигнализируя клеткам о необходимости выработки энергии или синтеза определенных веществ.

Ферменты представляют собой белки с молекулярной массой обычно от 10 тысяч до нескольких миллионов дальтон. В их состав может входить одна или несколько полипептидных цепей с различными элементами вторичной структуры – α -спиралями (до 40 АКО в спиральном участке цепи), линейными β -тяжами (в виде листов, объединяющих несколько тяжей между собой с помощью Н-связей), петлеобразными фрагментами, которые обеспечивают конформационную подвижность ферменту. Сцепление и переплетение огромной макромолекулы фермента за счет внутримолекулярных невалентных взаимодействий приводит к третичной надмолекулярной организации. Молекула фермента в этом случае приобретает объемную форму, на поверхности которой имеются всевозможные неровности: полости, углубления, канавки, ниши, карманы, щели. В этих небольших пространствах-полостях пептидного клубка расположена активная зона (или активный центр – АЦ) фермента, которую составляют от 3 до 12 АКО. В эту зону, как ключ в замок входит реагирующая молекула субстрата. Как и каждый хороший замок, фермент откликается только на свой «ключ», т.е. на молекулы строго определенного вещества (субстрата), с которыми при взаимном химическом и конформационном узнавании происходит их многоточечное взаимодействие в АЦ и образование активного каталитического комплекса. Таким образом, каждый тип превращения в организме требует участия своего специфического фермента и понятно, почему существует так много ферментов (несколько тысяч).

Все ферменты разделяют на шесть общих классов, исходя из обобщающего названия химических реакций, которые они катализируют: 1. Гидролазы (протеазы, эстеразы) – осуществляют гидролиз эфирных и амидных связей; 2. Изомеразы – ускоряют изомеризацию молекул (перенос группировок атомов внутри молекул); 3. Лиазы – присоединяют группы к двойным связям; 4. Лигазы – контролируют образование новых межмолекулярных С-С, С-N, С-O и С-S связей; 5. Оксидоредуктазы – катализируют окислительновосстановительные процессы, связанные с переносом электронов, гидрид-ионов и атомов водорода; 6. Трансферазы – переносят отдельные атомы или группы атомов между разными молекулами.

Коферменты и кофакторы. Наряду с чисто белковыми ферментами существует множество ферментов, в состав которых кроме белка (апофермента) входит и небелковая часть, называемая коферментом (в случае нуклеотидов или витаминов) или кофактором (в случае ионов металлов). В отдельности апофермент, кофермент и кофактор могут лишь в незначительной степени катализировать биореакции. Будучи же в комплексе, они ускоряют метаболические процессы на несколько порядков. Коферменты могут быть связаны с белковой частью слабыми нековалентными

взаимодействиями или же достаточно прочно – ковалентной связью через сульфидный или дисульфидный мостики (в этом случае кофермент называют простетической группой). Установлено, что коферменты обеспечивают селективность связывания превращаемого субстрата в комплекс с ферментом. Роль же апофермента заключается главным образом в пространственной организации всего биохимического процесса. Кофермент или кофактор размещаются обычно в углублениях апофермента, создавая активный центр. Более 200 ферментов проявляют активность лишь в присутствии кофермента, а несколько сотен ферментов содержат кофакторы, которые связаны с белковой частью координационной связью.

Общеизвестно, что для нормального развития всем живым организмам требуются микроколичества различных металлов. К числу таких «металлов жизни» (помимо широко распространенных элементов первой группы периодической системы Менделеева – натрия и калия, а также элемента второй группы – кальция) относятся и несколько более экзотичные микроэлементы – железо, магний, медь, селен и цинк, которые входят в состав ферментов. Все они находятся в организме в виде катионов, координационно связанных с органическими лигандами (основаниями – аминоклуппами, гидрокси- и меркаптогруппами АК, а также с азотистыми гетероциклами, в первую очередь с азинами и азолами). Очень важную роль в обеспечении жизнеспособности человека играет элемент восьмой группы – железо. Этот микроэлемент входит в состав гемопротеидов гемоглобинов и цитохромов, в которых его ионы связаны в виде гемов. В составе ферментов цитохромов ионы железа участвуют в переносе электронов с органических субстратов на кислород (цитохром с) или окисляют (гидроксилируют) ксенобиотики, увеличивая их растворимость и скорость выброса из организма (цитохром Р 450). Микроэлемент второй группы магний входит в состав рекордного числа ферментов (ионы магния содержатся в 300 биокатализаторах). Ионы магния нужны также для уменьшения возбудимости нервной системы и мышц сердца и глаз.

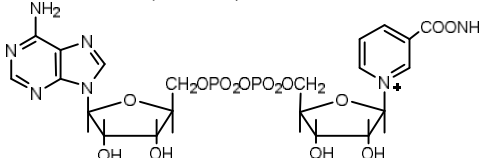
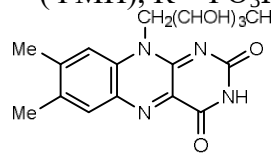
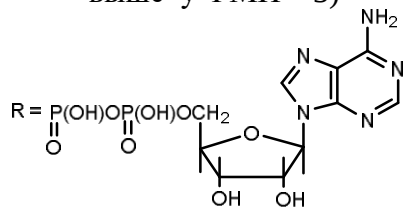
В организме человека содержится от 25 до 40 г ионов магния, что должно обеспечиваться их суточным приемом в 0.2 – 0.3 г. В состав ряда окислительно-восстановительных ферментов входит медь. Например, медьсодержащая цитохром с оксидаза катализирует окисление восстановленной формы цитохрома с. В организме человека ее содержится до 150-200 мг (суточная доза до 5 мг). Некоторые окислительно-восстановительные ферменты содержат селен (обычно в виде аминокислоты – селеноцистеина). Цинк является кофактором более 40 ферментов, в частности, в ряде ферментов, контролирующих гидролиз белков (в гидролазах) и синтез нуклеиновых кислот (в полимеразах). Установлено, что ион цинка в пищеварительной карбоксипептидазе А удерживается в активном центре благодаря координационным связям с двумя атомами азота двух имидазольных ядер остатков гистидина-69 и -196, и образованием ионной связи с карбоксильной группой глутамата-72. Поскольку для цинка характерно координационное число 4 (sp^3 -конфигурация), его остаточная

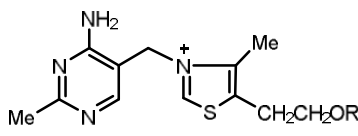
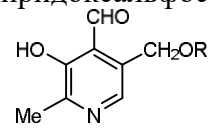
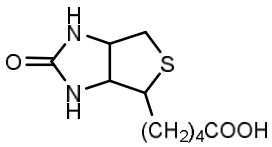
связь ориентирована электрофильно на С-концевую карбоксильную группу гидролизуемого белка. Суточная потребность организма человека в цинке достигает 20 мг. В организме человека имеется 2 г цинка, две трети которого сосредоточено в мышцах.

Уместно указать, что ядовитость таких металлов как As, Cd, Hg и Pb связана с тем, что они при попадании в организм человека в ионной форме также способны образовывать прочные комплексы с ферментами и ингибировать их каталитическую активность. При своевременном принятии антидотов (противоядий) эти комплексы разрушаются и металлы-токсиканты быстро выводятся из организма человека в виде более прочных комплексов с молекулами антидота.

Большинство коферментов представляют собой производные азотистых гетероциклов. В Таблица 6 представлены структуры основных коферментов, их витаминные предшественники, а также частицы, атомы и группы атомов, переносимые в биохимических реакциях, контролируемых этими биокатализаторами.

Таблица 6. Некоторые коферменты и их витаминные предшественники

№ п/п	Название кофермента	Название структурных фрагментов	Витаминный предшественник	Переносимые частицы
1.	Никотинамидадениндинуклеотид (НАД ⁺), R = H 	Пиридин*, Рибоза (тетрагидрофуран), адениндифосфат	Никотиновая кислота (витамин В ₅)	Водород и электроны
2.	Никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ ⁺), R=PO ₃ H ₂	То же, Трифосфат	То же	То же
3.	Флавиномононуклеотид (ФМН), R = PO ₃ H ₂ 	Изоаллоксазин*, фосфат	Рибофлавин витамин В ₂) R = H	То же
4.	Флавинадениндинуклеотид (ФАД; тот же скелетный остов, что дан выше у ФМН – 3) 	Изоаллоксазин*, аденин, тетрагидрофуран, дифосфат	То же	То же
5.	Тиаминпирофосфат (кокарбоксилаза)	Тиазол*, пиримидин, дифосфат	Тиамин (витамин В ₁), R = H	Альдегидная группа

	$R = \begin{array}{c} \text{P}(\text{OH})\text{OP}(\text{OH})_2 \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{O} \quad \text{O} \end{array}$ 			
6.	Кофермент А (КоА)	Аденин, дифосфат, пантотеновая кислота, меркаптоэтила мин*	Пантотеновая кислота, (витамин В ₃)	Ацетильна я группа
7.	Кобамидный кофермент	Полигидро- порфирин*, Бензимидазол, аденин	Кобаламин (витамин В ₁₂)	Метильная группа
8.	Пиридоксальфосфат		Пиридоксаль (витамин В ₆), R= H	Амино- группа
9.	Биотин		Тетрагидроим идазол*, тетрагидротио фен, пентановая кислота	Диоксид углерода

* – отмечена активная часть кофермента.

Как видно из таблицы, коферменты могут служить переносчиками электронов и атомов водорода (коферменты 1-4), ацильных групп (5, 6), алкильных групп (7), аминогрупп (8), а также и ряда других частиц.

5.8 Белковые рецепторы-мишени. Строение и функции

Рецепторами называют белки, интегрированные в клеточную мембрану, которые способны «узнавать» специфические эндогенные или чужеродные молекулы и невалентно селективно связывать их в виде комплекса. При этом рецепторы, изменением своей конформации передают сигнал внутрь клетки для запуска в ней соответствующего каскада биохимических реакций. Подобное событие генерирует физиологический ответ организма на появление в нём указанного агента. При этом рецептор в отличие от фермента не катализирует какое-либо химическое превращение агента-лиганда. Белки, выполняющие рецепторные функции, составляют более 20% от всех биомишеней. Они присутствуют в клеточном материале в очень небольших количествах и в свободном виде (их можно выделить обработкой клеток детергентами) часто малоустойчивы. В связи с этим на настоящее время функции рецепторов изучены намного лучше, чем их строение. Рецепторы не обязательно представляют собой единичные белки. Они могут быть составлены из двух-трех белков, связанных друг с другом в

виде комплексов или даже мозаики из многих белков (субъединиц). Рецепторы имеют три части – внеклеточную часть, мембрано-пронизывающую и внутриклеточную часть. Внешняя часть рецептора (в которой имеется активная зона, состоящая из 20-25 аминокислотных остатков) предназначена для взаимодействия с ЛВ. Образующийся из рецептора и ЛВ ансамбль-комплекс благодаря возникшим конформационным изменениям в рецепторном белке передает внешний сигнал (поступающий от ЛВ) через мембрану внутрь клетки. Конформационный сигнал далее передаётся по внутриклеточной части интегрированного рецепторного белка на внутриклеточный G-белок, который связан с рецептором в виде комплекса. Этот слабый сигнал, однако успевает активизировать G-белок, который его (сигнал) усиливает и, тем самым, инициирует каскад внутриклеточных биохимических реакций по синтезу различных веществ, необходимых клетке в соответствии с природой возникшего сигнала.

Внутриклеточные G-белки совместно со связанными с ними рецепторными белками занимают 1% всего генома организма позвоночных. Поэтому расширение знания структуры и функций белков, входящих в этот пул, раскрывает богатейшие возможности для создания новейших лечебных препаратов.

Рассмотрим конкретный пример подобного взаимодействия ЛВ ацетилхолина с его рецептором. Как известно, клетки нервной системы (нейроны), не имеют непосредственного контакта друг с другом. Они разделены синаптическими щелями, через которые сигнал (передаваемый в виде бегущей по нейронной мембране волны поляризации-деполяризации) пройти не может без определенного посредника, называемого нейромедиатором (или нейротрансмиттером).

Передача нервного импульса от одного нейрона к другому происходит в случае ацетилхолина следующим образом (**Рисунок 24, схема А**).

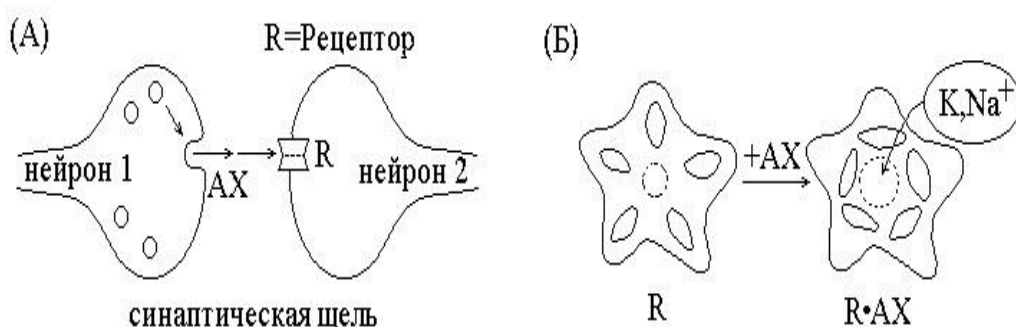


Рисунок 24. (А). Передача нервного импульса ацетилхолином (АХ) через синаптическую щель. (Б). Расширение ионофорного канала в рецепторе (R) под действием АХ

По достижении нервным сигналом конца возбужденной клетки (нейрон 1) в её пресинаптической области синтезируется нейротрансмиттер (АХ), который затем выбрасывается в синаптическую щель и быстро диффундирует к своему рецептору (R), расположенному в постсинаптической мембране покоящейся клетки (нейроне 2). Один из

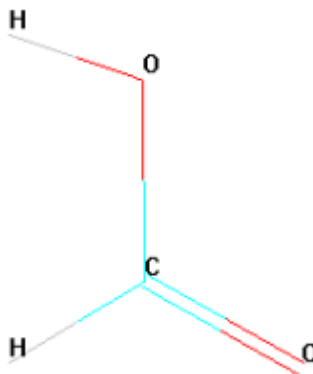
рецепторов ацетилхолина представляет собой белок, состоящий из пяти субъединиц (рис. 6.5, схема Б). Этот интегральный, пронизывающий защитную мембрану, белок образует цилиндрический канал, который с одной стороны выступает на 65 Å в синаптическую щель, а с другой – пронизывает липидный двойной слой мембраны, входя на 15 Å внутрь клетки. Этот узкий канал (или пора) расширяется до 20 Å при "посадке" на рецептор нейромедиатора (комплекс **R·AX**) за счет резкого уменьшения вращательного (конформационного) движения субъединиц. Увеличение размера канала облегчает прохождение ионов K^+ и Na^+ через мембрану против электрохимического градиента. При этом изменяется мембранный потенциал покоящегося нейрона (2), и в нем генерируется нервный импульс. После акта передачи нервного сигнала нейромедиатор гидролизруется ацетилхолинэстеразой до неактивного холина и ионофорный канал закрывается.

5.9 Лабораторный практикум

Исследование водородной связи

Цель работы: Изучения механизма образования водородной связи.

Задание на лабораторную работу Постройте структуры межмолекулярных ассоциатов муравьиной кислоты $H-(C=O)-OH$ с водой, перекисью водорода, метаном, аммиаком и фтористым водородом, азотистой, азотной, ортофосфорной и серной кислотами, ацетоном, уксусной кислотой. Рассчитайте геометрию, энергии, колебательные частоты. Рассчитайте энергию водородной связи. Применяйте методы **PM3** и **ab initio (STO-3G)**.



Структура молекулы муравьиной кислоты

Структуры реагентов для расчета водородной связи с муравьиной кислотой:

1 вода	2 перекись водорода	3 ортофосфорная	4 аммиак	5 фтористый водород
H_2O	H_2O_2	$H-O_2P(OH)_2$	NH_3	HF
6 азотистая	7 азотная	8 метан	9 серная	10 ацетон
$H-ONO$	$H-ONO_2$	CH_4	$H-O_3SOH$	$CH_3-(C=O)-CH_3$

Занятие 6.

Тема занятия: Эмпирические основы дизайна пролекарств для моделирования их биологической активности. Нуклеиновые кислоты.

Цель занятия: Изучить эмпирические основы дизайна пролекарств для моделирования их биологической активности.

Вопросы к занятию:

1. Проблема резистентности к лекарственным веществам. Механизмы выработки резистентности к лекарствам

2. Некоторые химические и комбинированные приёмы борьбы с возникающей устойчивостью патогенных микроорганизмов к классическим лекарствам

3. Сравнительный анализ молекулярных полей (САМП)

4. Геномика. Постгеномный этап в создании новых лекарств. Дизайн потенциального лекарственного вещества, взаимодействующего с ДНК-мишенью.

6.1 Проблема резистентности к лекарственным веществам. Механизмы выработки резистентности к лекарствам

Полвека назад считали, что с инфекционными заболеваниями покончено. Но оказалось, что уже в те времена половина штаммов золотистого стафилококка была устойчива к пенициллину, а к концу прошлого века цифра возросла до 90%. Как это случилось? Дело в том, что бактерии быстро размножаются, и если после их обработки данным антибактериальным средством остаётся в живых 1-2 бактерии из миллиона, то вскоре из выживших экземпляров возникает новый бактериальный штамм, уже устойчивый к этому ЛВ. Каковы механизмы выживания и адаптации микроорганизмов? Молекулярные уровни (пути) выработки устойчивости патогенных микроорганизмов к широко используемым ЛВ можно разделить на *внеклеточные, мембрано-клеточные и внутриклеточные*.

К *внеклеточным механизмам* можно отнести *иммунную транспортную систему* патогенного микроорганизма который включает свою внешнюю иммунную защиту клетки от атаки ЛВ на близких подступах этого ксенобиотика к своей биомишени, находящейся в клеточной мембране или внутри клетки. Во внеклеточном пространстве ЛВ встречают специальные транспортные белки-насосы. Они распознают чужеродное вещество, захватывают его кооперативно действующими слабыми связями и быстро, чтобы ЛВ не успело оказать на микроорганизм токсического действия, транспортируют его подальше от чувствительной биомишени в межклеточное пространство, выводя его таким образом без всяких метаболических (биохимических) событий. Патогенная бактерия при этом получает сигнал для выработки приёмов ускорения синтеза подобных транспортных белковантител.

Второй внешний уровень иммунной защиты включает *биохимическую окислительную систему* (он же действует и внутри клетки). В случае атаки

лекарством бактерия активизирует окислительную способность ферментов семейства цитохромов P450, резко увеличивая их концентрацию. Убыстрение метаболического биоокисления ксенобиотика (например, введением в его структуру гидрофильных ОН-групп) превращает ЛВ в неактивное соединение, легко удаляемое от биомишени или из клетки.

После распознавания клеткой атакующего ЛВ-токсиканта, несущего заряд или сильный диполь, микроорганизм может перестроить электростатически внешнюю сторону клеточной мембраны. В этом случае на том участке мембраны, к которому приближается ЛВ, формируется заряд противоположного знака таким образом, чтобы отталкивать ЛВ от АЦ мембраны. Такой приём защиты называют *внешним мембрано-клеточным*. Аналогичная мембраноклеточная самозащита микропатогеном включается через механизм точечной мутации АКО в активном центре интегрального рецептора. Его АЦ находится на внешней стороне мембраны, и точечная мутация в биомишени приводит к уменьшению силы связывания ЛВ с биомишенью.

Существует целый ряд *внутриклеточных путей* выработки самозащиты бактериальной клеткой от ЛВ. Так, если биомишенью для ЛВ-ингибитора является конкретный внутриклеточный фермент (например β -лактамаза для пенициллинов), то бактерия вырабатывает приём перепроизводства этого фермента, восполняя его потери от действия лекарственной дозы («умная бактерия знает принцип Ле Шателье»). Она же методом замены всего одной АКО (точечной мутации) в активном центре подобного фермента-биомишени уменьшает силу его связывания с ЛВ.

Известна также возможность выработки патогеном способности переключать биосинтез нужного метаболита с обычного пути на другой путь, т.е. с помощью другого фермента. Некоторые виды бактерий способны к защитному перепроизводству своего природного субстрата для внутриклеточного фермента, который является биомишенью данного ЛВ-ингибитора. Патоген, как бы «зная» закон действия масс, пытается таким образом вытеснить из АЦ конкурентный ЛВантагонист-интоксикант.

Развитие устойчивости у бактерии может происходить благодаря прекращению бактерией или раковой клеткой биосинтеза того внутриклеточного фермента, который превращал пролекарство в истинное ЛВ. С другой стороны, бактерия способна к индуцированию ею генов, которые контролируют биосинтез новых внутриклеточных ферментов, метаболизирующих проникшее в клетку ЛВ его ацетилированием, аденилированием и фосфорилированием с потерей возникающими производными начальных антибиотических свойств (например, биосинтез новых внутриклеточных β -пенициллиназ в борьбе с пенициллинами).

6.2 Некоторые химические и комбинированные приёмы борьбы с возникающей устойчивостью патогенных микроорганизмов к классическим лекарствам

Чтобы снизить эффект выработки патогенными микроорганизмами устойчивости к широко используемым в медицинской практике ЛВ прибегают к дизайну комбинированных препаратов. С этой целью создаются мультилекарственные средства, которые состоят из двух – пяти лекарственных субстанций, разных по структуре и по функциям. В этом случае вероятность мутаций и переключений путей в защитных системах патогена резко уменьшается, и он теряет способность к нормальной пролиферации (размножению клеток). Рассмотрим несколько общих путей дизайна комбинированных препаратов, которые могут проявлять эффективно своё «хроническое» терапевтическое действие.

В том случае, когда патогенный микроорганизм способен ускорять биосинтез защитных транспортных белков, начинающих очень быстро удалять из активной зоны опасный для него препарат (ЛП), то общим подходом для сохранения эффективности действия этого ЛП является дизайн композитного мультиЛВ, который включает новые синтетические селективные ЛВ-ингибиторы этих транспортных белков. Аналогично, при выработке патогеном способности резко активизировать свою защитную метаболическую систему цитохромов Р450 дизайн комбинированного ЛП заключается в том, что в композитное лекарство добавляют новый препарат – селективный ингибитор иммунных цитохромов. В таком композитном препарате указанный селективный ингибитор цитохромов может не иметь целевого терапевтического эффекта, но поддерживает во времени ожидаемый лечебный эффект базового препарата.

В случае выработки бактерией приёма перепроизводства эндофермента, являющегося биомишенью для вводимого ЛП, возникает задача по дизайну нового желателно бифункционального ЛП, который бы обладал не только первоначальным лечебным действием, но и дополнительным биодействием, направленным и на торможение каскада биохимических реакций по перепроизводству указанной биомишени.

При активизации бактерией фермента биосинтеза избыточного эндосубстрата, необходимого ей для повышения сопротивляемости к введённому ЛВ путём вытеснения эндосубстратом ксенобиотика из активной зоны, химику остаётся сконструировать новое ЛВ, которое ингибирует этот фермент. При выработке бактерией новых ферментов для быстрой дезактивации ЛВ метаболическими реакциями ацетилирования, фосфорилирования т.п., подобную устойчивость пытаются преодолеть дизайном новых ЛВ, ингибирующих эти неоферменты, или конструированием ЛВ, в которых присутствуют мало гидроксильных и аминогрупп, заменённых на соответствующие биоизостерные группировки или атомы.

В случае приобретения устойчивости к ЛВ за счёт прекращения биосинтеза фермента, который метаболизировал проЛВ в истинное ЛВ, также пытаются создать комбинированные ЛП, которые активируют биосинтез нужного фермента. В общем случае конструируют новое вещество, которое, не обладая лечебным действием, в комбинации со старым

ЛВ потенцирует его терапевтический эффект. Подобное явление синергизма встречается довольно часто при создании комбинированных препаратов и стало общим подходом.

Остановимся более подробно на удивительной способности микроорганизмов быстро переходить к биохимической модификации своих ферментных систем путём «умной» замены в них одной или нескольких аминокислотных остатков. При этом модифицированные ферменты (псевдоферменты) могут не терять каталитических свойств, но приобретают устойчивость к известному лекарству! При выработке подобной точечной мутации в цепи АКО фермента или вируса перед химиком и фармакологом возникает необходимая задача по дизайну новых ЛВ, которые были бы структурно более близки к природным субстратам данной биомишени и взаимодействовали с образовавшимися псевдоферментами. Например, к ламивудину быстро вырабатывается устойчивость у ВИЧ-1 вируса, т.к. этот вирус мутирует за счёт замены валина 184 на метионин 184. Но ламивудин в комбинации с новым компонентом AZT показывает пролонгированность антивирусного действия, т.к. добавленный AZT легко ингибирует этот мутированный псевдовирс, который принимает новый компонент за свой эндосубстрат.

К настоящему времени СПИД причисляется к «болезням XXIго века». Тем не менее, для его лечения применяют пока лишь 20-30 синтетических препаратов, которые, однако, способны только понижать концентрацию вируса. Более того, этот вирус очень, как мы отмечали выше, быстро эволюционирует, давая уже за один репродуктивный цикл одну мутацию. Возникающая у разновидностей ВИЧ резистентность приводит к необходимости использовать композиции-«коктейли» из двух-трех ЛВ, что значительно удорожает курс лечения. Следует отметить, кроме того, что все известные ЛВ, применяемые против СПИДа, токсичны и поэтому длительность курса лечения не может пока превышать 2-3-х лет. Вместе с тем после прекращения приема ЛВ концентрация ВИЧ снова быстро возрастает и через некоторое время лечение необходимо возобновлять.

6.3 Сравнительный анализ молекулярных полей (САМП)

Большинство молекул лекарств взаимодействуют с биологическими мишенями: ферментами, рецепторами, ионными каналами, ДНК. В подавляющем большинстве случаев механизм действия лекарства является результатом невалентного связывания молекулы с участком связывания биомолекулы. В связи с этим необходимым и достаточным условием биологической активности является сродство молекулы к участку связывания. Ингибиторы ферментов предотвращают либо связывание субстрата, либо каталитическую реакцию на активном центре; антагонисты рецепторов препятствуют связыванию агониста или переходу рецептора к активной конформации. Более сложная ситуация с агонистами и частичными агонистами. Помимо сродства к определенному сайту связывания, они имеют

различные характерные для них активности. Наиболее ясной представляется гипотеза, заключающаяся в том, что агонист рецептора стабилизирует его «активную» конформацию, в то время как антагонист стабилизирует «неактивную».

Структурные элементы всех биологических макромолекул принадлежат к одной группе оптически активных энантиомеров. Таким образом, все участки связывания лекарств сами являются энантиомерами, т.е. обладают ассиметричной геометрией. Поэтому неудивительно, что энантиомеры оптически активных лекарств различны по своей биологической активности и этот факт не учитывается адекватно во многих исследованиях количественной связи структура-активность.

Классический САМП связывает биологическую активность лекарств с физико-химическими дескрипторами или индикаторными переменными (да/нет, 1/0, истина/ложь), которые определяют конкретные структурные особенности. Помимо липофильности, поляризуемости и электронных свойств также часто используются стерические параметры для отображения различного размера заместителей. В некоторых случаях индикаторные переменные могут быть использованы для дифференцирования рацематов и активных энантиомеров.

Для участка связывания рецептора физический образ приближающегося лиганда выглядит совершенно иначе, нежели в классическом «структурном» представлении. На относительно большом расстоянии (десятки ангстрем) участок связывания, по-видимому, распознает некое молекулярное поле, например, электростатический потенциал, а на ближней дистанции начинает воспринимать якорные группы и форму распределения заряда на поверхности доступной растворителю. В 1979 г. Крамер и Милне сделали первую попытку сравнения молекул путем сопоставления их в пространстве и картографирования их молекулярных полей на трехмерной сетке. В 1986 г. Сванте Волд предложил использование метода частичных наименьших квадратов (МНК) вместо анализа основных составляющих для нахождения взаимосвязи амплитуды поля с биологической активностью. В 1988 г. вышла ключевая публикация в JACS и примерно с этого времени метод получил название САМП (CoMFA – Comparative Molecular Field Analysis). Появилось коммерчески доступное программное обеспечение. Несмотря на существенные проблемы с его корректным использованием, метод в настоящее время рассматривается как полезный инструмент для получения трехмерных моделей КССА.

САМП количественно описывает взаимосвязь структуры и активности в трехмерном пространстве. Вначале отбирается группа молекул для анализа. Важным условием является то, что все молекулы должны взаимодействовать с одним типом рецептора (фермента, ионного канала и т.д.) аналогичным образом, т.е. адсорбироваться на одном и том же участке связывания. На следующей стадии выбирается определенная подгруппа молекул, составляющая обучающую выборку для получения САМП-модели. Остальные молекулы становятся проверочным набором, через который

независимо оценивается качество полученной модели. Гипотеза о фармакофоре служит для ориентирования суперпозиции всех индивидуальных молекул.

Вокруг молекул позиционируется достаточно большой куб и выбирается шаг сетки. Для расчета амплитуды поля в каждой точке сетки используются пробные атомы, такие как атом углерода, положительно или отрицательно заряженный атом, донор или акцептор водородной связи или липофильная проба. Эти «поля» соответствуют таблицам, зачастую включающим несколько тысяч колонок, которые должны соответствовать константе связывания или другим значениями биологической активности. МНК является наиболее подходящим для этого. Обычно для определения внутренней прогнозирующей способности полученной модели используется перекрестная проверка.

Результатом анализа является уравнение регрессии с тысячами коэффициентов. Наиболее часто он представлен в виде набора контурных карт. Эти карты показывают благоприятные и неблагоприятные стерические области вокруг молекулы также как и благоприятные и неблагоприятные зоны для электроположительных и электроотрицательных заместителей в определенных положениях. Прогнозирование для проверочного набора и для других молекул производится путем качественного исследования данных контурных карт, либо количественным образом, путем расчета полей этих молекул и подстановки полученных значений в процедуру МНК.

Несмотря на стремительное развитие метода САМП, существует ряд серьезных проблем и возможных препятствий. Существуют несколько модификаций САМП, которые решают или обходят некоторые из этих проблем. В дополнение были разработаны методы альтернативные САМП, такие как сравнительный анализ молекулярных индексов сходства и другие пространственные методы нахождения количественной связи сходство-активность.

Эффективность применения статистических методов зависит от правильного планирования эксперимента. Это касается как обучающего набора, на основе которого получают модель КССА, так и проверочного, для которого будет сделан прогноз биологической активности. При проведении анализа КССА этим важным условием зачастую пренебрегают. Не удивительно, что в таких случаях проблемы связаны со смещенным выбором объектов и различными структурными и параметрическими пространствами обучающего и проверочного наборов.

Вещества, входящие в обучающий набор, должны образовывать параметрическое пространство, в котором все точки более или менее равномерно распределены. Структуры и все соответствующие свойства обучающего набора не должны слишком сильно отличаться от таковых для проверочного набора. Для получения удовлетворительных статистических моделей с учетом экспериментальных затрат должна быть использована схема, позволяющая заполнить необходимую область структурного пространства, используя при этом минимально возможное количество

объектов. Это позволяет избежать избыточности. С другой стороны, некоторая избыточность все же должна присутствовать, чтобы избежать возможной неприменимости перекрестной проверки и возможности выведения конечной модели КССА из равновесия точечными ошибками.

Специфическое взаимодействие молекул с белками зависит от структурной совместимости лиганда и участком связывания, при пространственном соответствии всех свойств молекулы. Обычно фармакофор является пространственной моделью таких структурных соответствий, в простейшем случае – двумерной моделью состоящей из 3-х точек.

Структурно-гибкие соединения сравниваются с жесткими аналогами, с целью определения геометрии гибкого лиганда, соответствующей биологически активной конформации. Любое повышение жесткости гибкой молекулы в неверной геометрии приводит к неверным результатам. С другой стороны, практика показывает, что фиксация биологически активной конформации лиганда может привести к завышению активности и избирательности. Как уже было отмечено, энантиомеры оптически активных веществ различны по своей биологической активности. Хорошей иллюстрацией тому является различный запах близких по структуре монотерпенов (R)- и (S)-лимонена и (R)- и (S)-карвона, что связано со стереоспецифичным взаимодействием этих соединений с обонятельными рецепторами, связанными с G-протеинами.

Например, дофамин является нейромедиатором с двумя фенольными гидроксильными группами, фенильным циклом и положительно заряженной аммониевой группой, отделенной от ароматического кольца двумя углеродными атомами. Соответственно фармакофорная модель может быть определена, как состоящая из двух донорно-акцепторных групп, положительно заряженной донорной группы и липофильной области. Однако дофамин имеет две лабильные связи. Вращение вокруг них приводит к другой геометрии с другими межатомными дистанциями. Наличие общего фармакофора в группе веществ не обязательно означает, что все соединения имеют одинаковую молекулярную форму. Одним из наиболее важных преимуществ метода САМП является возможность включения в один анализ молекул содержащих один и тот же фармакофор, но различное распределение связей в молекуле.

Сопоставление молекул производится в соответствии с функциональными эквивалентными группами, которые идентифицируются как фармакофорные, либо вручную или с помощью соответствующего метода сопоставления с учетом амплитуды поля в однородном ряду веществ. Он позволяет определить индекс сходства между двумя молекулами при любом их взаиморасположении.

После взаимного позиционирования молекул вокруг них задается куб, таким образом, чтобы расстояние от любого из атомов до его граней не было меньше нескольких Å. Далее выбирается шаг решетки, для задания точек в пересечениях.

В соответствии с размерами куба и выбранным шагом решетки обычно задается несколько тысяч точек. Дистанция в 2 Å оказывается слишком большой для шага решетки, если исходить из того, что даже пяти десятых Å достаточно для перехода между ван-дер-ваальсовыми, притягивающими и сильными отталкивающими взаимодействиями между двумя атомами. Тем не менее, в случае выбора малой дистанции, эта дистанция диктуется экспоненциальным ростом затрат машинного времени.

Либо перед генерацией различных конформаций молекул, либо после этого частичные заряды на атомах определяются для всех аналогов (в основном полуэмпирическими методами, такими как AM1, PM3 или MNDO). Эти заряды используются для расчета (отдельно для каждой молекулы), значений электростатического поля во всех точках решетки с использованием заряженного пробного атома. Дополнительно рассчитываются стерические поля с использованием нейтрального атома. Значения электростатического и стерического полей в отдельных точках решетки получаются из потенциальной функции Кулона и потенциальной функции Леннарда-Джонса. Вблизи поверхности атомов оба потенциала имеют очень крутой спад. Они стремятся к бесконечным значениям, если положения атомов двух молекул совпадают. Во избежание этого потенциал отсекается по определенному правилу, и все достаточно большие значения приводятся к некоторой константе. Дополнительно или вместо этих полей рассчитываются гидрофобные поля. Различным полям могут присваиваться условные веса.

Хорошей аппроксимацией потенциалов Кулона (1) и Леннарда-Джонса (2) являются колоколообразные гауссовы функции, которые ограничены отсекающими значениями, с учетом того, что это «гладкие» функции. Чтобы избавиться от точек, где значение функции незначительно используется значение «минимальная сигма»:

$$E_c = \sum_{i=1}^n \frac{q_i q_j}{D r_{i,j}} \quad (1)$$

где E_c – энергия взаимодействия Кулона, q_i – заряд i -го атома молекулы, q_j – заряд пробного атома, D – диэлектрическая константа, r_{ij} – дистанция между i -м атомом и j -м узлом решётки (в котором расположен пробный заряд). Далее:

$$E_{wdw} = \sum_{i=1}^n \frac{A_{i,j}}{r_{i,j}^{12}} - \frac{C_{i,j}}{r_{i,j}} \quad (2)$$

где E_{wdw} – ван-дер-ваальсова энергия взаимодействия, r_{ij} – дистанция между i -м атомом и j -м узлом решётки, A_{ij} и C_{ij} константы, зависящие от ван-дер-ваальсовых радиусов соответствующих атомов

Поскольку результатом расчета полей является достаточно большое число значений x , использовать регрессионный анализ затруднительно. На начальном этапе развития анализа КССА основные компоненты получали из блока значений x (например, таблица значений поля), а затем коррелировали

с биологической активностью. В 1986 Сванте Волд предложил использование МНК. Метод похож на регрессионный анализ основных компонентов получением векторов из Y и X блоков данных.

МНК считается естественным способом моделирования, однако практика показывает, что слишком много переменных, вносящих шум, например переменные, которые не вносят вклад в прогноз, снижают достоверность результата. Для прогнозирования такие дополнительные переменные обычно бесполезны и даже вредны. Проблема искажения САПМ моделей большим числом несоответствующих точек была решена путем улучшения процедуры выбора переменных, названной GOPLE (генерация оптимальных линейных МНК решений). Сначала используется D-оптимальный дизайн для выбора безызбыточных переменных. С помощью этой процедуры определяется подгруппа переменных, имеющих более высокую степень ортогональности в многомерном параметрическом пространстве. Затем используется фракционный факториальный способ для проведения анализа МНК с различными комбинациями этих переменных. Прогнозирующая способность моделей проверяется с помощью процедуры перекрестной проверки. Влияние каждой переменной может быть определено из сравнения значений PRESS для моделей, включающих данную переменную и не включающих её. Значимые переменные, например точки вносящие вклад в прогноз, остаются, остальные удаляются.

Результаты МНК анализа могут быть трансформированы в коэффициенты регрессии для значений X, которые далее используются для расчетов и прогнозирования значений биологической активности. В силу большого количества коэффициентов регрессии прямая интерпретация соответствующего уравнения невозможна. Удовлетворительным способом визуализации результатов является генерация контурных карт, показывающих значения в определенных областях, которые больше или меньше, чем некоторые положительные или отрицательные значения заданные исследователем:

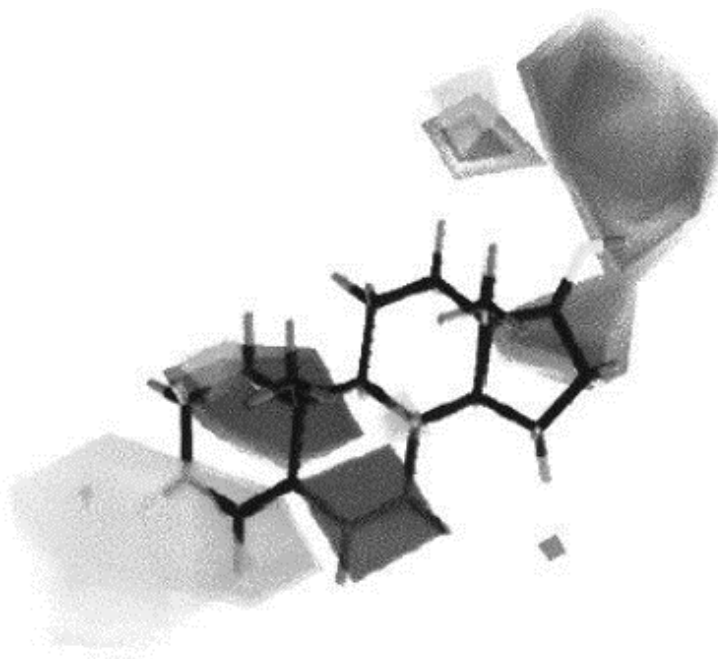


Рисунок 25 Результат САМП анализа сродства к тироксин-связывающему глобулину в ряду стероидов.

В силу сложности метода САМП, при его проведении и в процессе интерпретации полученных результатов возникает много проблем. Один из наиболее важных источников неверных выводов и ошибок в процедуре САМП является поиск биологически активной конформации и общего фармакофора. Риск получения несоответствующих геометрий может быть снижен путем согласования со структурно жесткими аналогами. Даже в этом случае взаиморасположение представляет сложную процедуру, т.к. возможны несколько способов связывания казалось бы близких аналогов.

Другой возможный источник ошибки – это взаиморасположение всех молекул. Т.к. обучающий набор содержит активные и неактивные молекулы, то структурам неактивных соединений может быть присвоен слишком большой статистический вес. Модели САМП улучшались путем переориентирования молекул обучающего набора на основании первых предварительных результатов; молекулы, для которых были получены слишком низкие значения активностей, переориентируются так, чтобы получить «улучшенное» расположение. Определение парных индексов сходства молекул, полученных из пространственных полей, позволяет осуществить парное взаиморасположение независимо от других молекул; недостатком такого подхода является потеря пространственной информации для прогнозирования.

Конечно, риск ошибки при генерации конформаций и при взаиморасположении может быть снижен путем использования данных рентгеновской кристаллографии и многомерных ЯМР исследований. Преимущество такой процедуры очевидно, но возникает вопрос: действительно ли САМП является адекватным инструментом в таких случаях? Аналогичная проблема также наблюдается при перекрестной проверке. В хорошо подобранных обучающих выборках, где используется

малое количество объектов для исследования параметрического пространства, с минимальным количеством экспериментов перекрестная проверка невозможна: прогнозирование для исключенных объектов не может быть проведено с помощью моделей полученных на основе набора, не содержащего структурных особенностей исключенных объектов.

Как уже было отмечено, функции, используемые в САМП, создают относительно «жесткие» поля. Переменные (особенно относящиеся к стерическим полям) иногда принимают значения близкие к нулю (вокруг нет атомов) или у значения отсечения (внутри молекул). Соответственно, контурные карты обычно фрагментированы и трудно интерпретируемы, особенно, если во время анализа была применена процедура выбора переменной. Систематическое исследование зависимости результатов САМП от ориентации куба привело к модификации САМП, которая разделяет куб на одинаковые области. Вместо выбора переменных производится выбор областей: выбираются для дальнейшего анализа только те области, которые являются значимыми для прогнозирования.

Контурные карты полученные в результате исследований САИМС (сравнительный анализ индексов молекулярного сходства), с использованием более «гладких» гауссовых полей, очевидно дают также более гладкие и более четкие поля, которые легче интерпретировать.

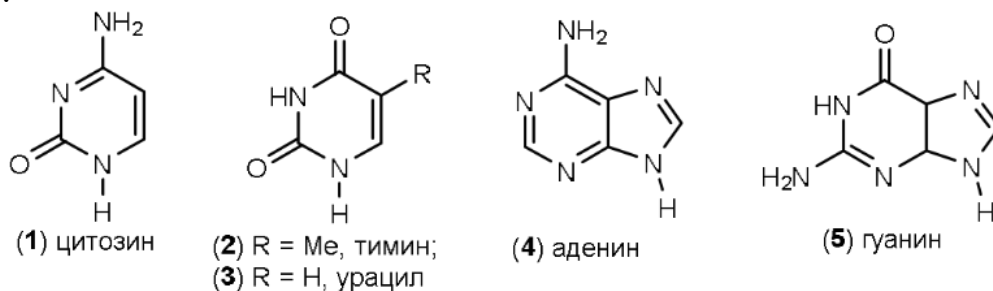
В настоящее время опубликованы несколько сотен практических приложений САМП в области создания лекарств. Большинство из них посвящены изучению лиганд-рецепторного взаимодействия, описания констант сродства или ингибирования. Дополнительно САМП использован для сопоставления стерических и электронных параметров. Менее убедительным выглядит применение САМП для объяснения данных полученных *in vivo*, даже в том случае, когда в качестве дополнительного параметра используется липофильность.

САМП является мощным пространственным методом КССА, показавшим свою практическую ценность во многих случаях. Получаемые результаты во многом зависят от того, как подобран пространственный фармакофор и от расположения молекул. Очевидно, что использование мягких полей лучше, нежели жестких, особенно для интерпретации контурных карт. Выбор переменных, по-видимому, необязателен при использовании таких полей. С другой стороны новый способ выбора областей на основе GOPLE-алгоритма выглядит более перспективным по сравнению с другими процедурами выбора переменных. Основная проблема заключается во внешней прогнозирующей способности моделей САМП. Чем лучше описывается обучающая выборка, тем хуже зачастую качество прогноза для проверочной выборки, что, очевидно, зависит в основном от выбора обучающего и проверочного наборов.

6.4 Строение и функции ДНК

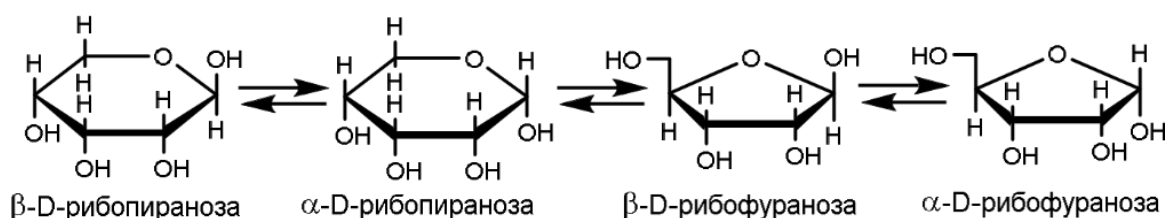
Как уже упоминалось выше, в человеческом геноме закодировано несколько тысяч потенциальных биомишеней, из которых более 500 известны (для 120 из них, являющихся целевыми для применяемых сейчас ЛП, установлено трёхмерное строение). Известно, что основным типом биомишеней для известных ЛВ являются ферменты – протеазы, киназы и др. Ещё одним типом активных структур-мишеней белковой природы считают рецепторы, не проявляющие каталитических свойств (от 20% до 40% по разным данным). Кроме того мишенями служат ионные каналы (сложные полиэфиры), гормоны, а также нуклеиновые кислоты.

Макромолекулы дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК) входят в состав каждой живой клетки. В 1944 г было открыто, что в них хранится вся наследственная информация. Механизм передачи наследственных признаков в живых организмах от родителей к их потомству был открыт в 1953 году. Было установлено, что в зашифровке (кодировании), хранении и передаче (декодировании) наследственных признаков и всей биологической информации участвуют производные двух групп азотистых гетероциклов – пиримидина и пурина: цитозин, тимин, аденин и гуанин, которые содержатся в огромных молекулах ДНК, имеющих молекулярную массу до нескольких миллионов:



Наряду с ДНК в клетках находятся и представители другого типа нуклеиновых (т.е., находящихся в ядрах клеток, от лат. нуклеус – ядро) кислот – рибонуклеиновые кислоты (РНК). Их основная функция – обеспечение синтеза надлежащих белков – носителей жизни. «Записанный» в РНК код, определяющий аминокислотную последовательность в белках, передаётся рибонуклеиновой кислоте от ДНК. В этом смысле РНК имеет подчинённое по отношению к ДНК значение.

Рассмотрим первичную структуру ДНК. Под нею подразумевается состав входящих в них компонентов и характер их соединения друг с другом. Полный гидролиз ДНК приводит к образованию трёх видов веществ: фосфорной кислоты, сахара-пентозы и перечисленных выше азотистых оснований. Здесь выявляется два существенных отличия РНК от ДНК. В молекулах РНК вместо тимина присутствует урацил, а в качестве сахарной компоненты – D-рибоза (в ДНК – 2-дезоксид-рибоза). Обе рибозы существуют в НК не в линейной, а в циклической полуацетальной форме в виде пятичленного фуранозного кольца, а не шестичленного пиранозного не смотря на то, что фуранозная форма менее устойчива из-за большей напряжённости валентных углов в пятичленном цикле:



Находящийся при атоме С-1 гидроксил называется полуацетальным. Он может занимать два различных положения относительно плоскости кольца, т.е. быть как бы снизу или сверху от неё. В зависимости от этого фуранозная форма имеет α - и β модификации. Рибоза находится в нуклеиновых кислотах исключительно в виде β -D-рибофуранозы, т.к. лишь эта конфигурация обеспечивает построение протяжённой и достаточно устойчивой с точки зрения электронных и геометрических факторов спиральной полимерной цепи вторичной структуры. Фрагмент такой цепи показан ниже **Рисунок 26**

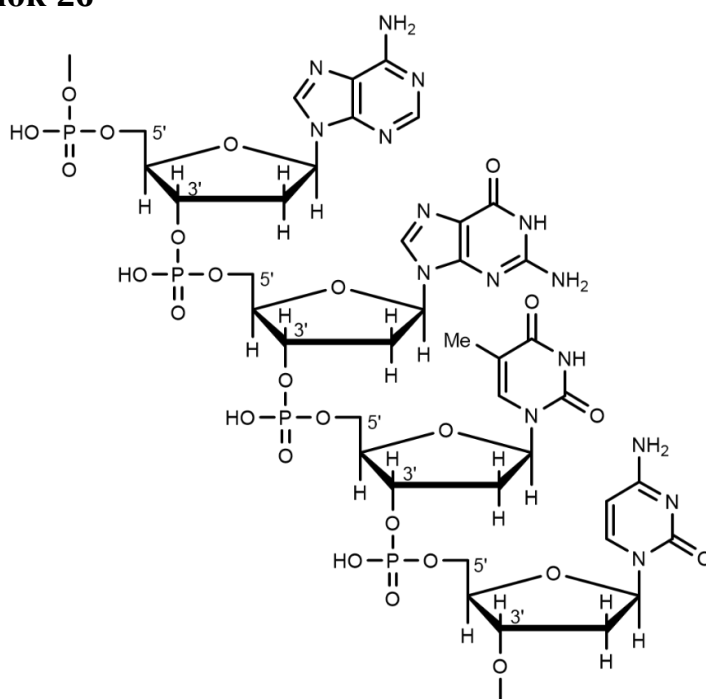


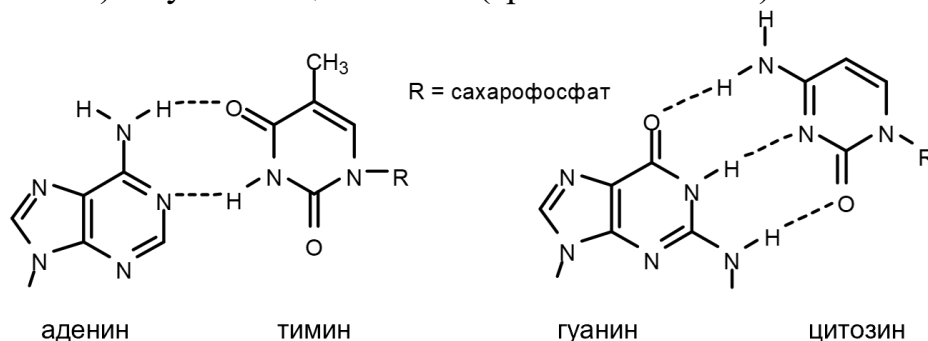
Рисунок 26 3'-5'-Фосфодиэфирная связь между нуклеотидами и полинуклеотидный участок цепи ДНК.

Исследование первичной структуры ДНК и РНК – это прежде всего установление последовательности чередования гетероциклических оснований. Первые успешные попытки секвенирования НК (т.е. установления такой последовательности) были осуществлены в 1960-е годы. В настоящее время имеются надёжные методы определения такой последовательности. Более того – разработаны методы направленного синтеза полинуклеотидов, в том числе с помощью автоматического робота-синтезатора, который по специально заданной компьютерной программе осуществляет сборку больших фрагментов нуклеиновых кислот из моно-, ди- и олигонуклеотидов.

При изучении пространственной вторичной структуры ДНК было установлено, что она образует не просто спиральную структуру, как в случае

белков, а двойную спираль, в которой участвуют две молекулы ДНК. Ниже приведены основные характеристики вторичной структуры ДНК:

1. Молекула ДНК состоит из двух скрученных правосторонних полинуклеотидных спиралей. Спирали антипараллельны друг другу (т.е., если двигаться вдоль них в одном направлении, то в одной спирали последовательность связей в углеводофосфатной цепи будет: 5', 3'-5', 3'-5', 3'–, тогда как в другой –3', 5'-3', 5'-3', 5'–).
2. Пуриновые и пиримидиновые основания находятся внутри двойной спирали и плоскости их колец практически перпендикулярны её главной оси. Наоборот, плоскости пентозных колец в углеводофосфатном остове примерно параллельны главной оси спирали.
3. Полный виток спирали имеет в длину 34 Å и включает 10 нуклеотидных пар. Расстояние между плоскостями соседних гетероциклических оснований в цепи составляет 3,4 Å.
4. Наиболее существенным для вторичной структуры ДНК является механизм сцепления двух спиралей. Его обеспечивают сразу несколько типов невалентных взаимодействий. Прежде всего, между парами направленных к общей оси и навстречу друг другу азотистых оснований образуются Н-связи. При этом основания связываются в строго определённые, комплементарные пары: пиримидиновое основание только с пуриновым, а именно аденин с тиминам (двумя Н-связями) и гуанин с цитозином (тремя Н-связями).



В результате общее количество пуриновых остатков в молекуле ДНК должно точно равняться количеству пиримидиновых. Например, в сперме человека содержится 31% аденина, 19% гуанина, 31% тимина и 19% цитозина. ДНК туберкулёзных бацилл содержит большее количество гуанина и цитозина (по 36%), чем аденина и тимина (по 14%).

Второй вид сил, который стабилизирует каждую нить ДНК в виде моноспирали и двойную спираль в целом – так называемое стэкинг-взаимодействие. Оно означает, что азотистые основания, связанные между собой Н-связями, обращены к периферии своими гидрофобными фрагментами и ощущают отталкивающее действие молекул воды. Поэтому их пары плотнее располагаются параллельно друг другу, образуя стопки.

Молекулы ДНК имеют и третичную структуру – реальную компактную форму, которую они принимают в хромосоме живой клетки.

Например, противоположные концы одной или сразу двух нитей ДНК способны слипаться (опять-таки за счёт водородных связей между азотистыми основаниями), образуя макрокольцо. Последнее может закручиваться на белках, называемых гистонами, в суперспирали, напоминающие жгуты. Суперспирали принимают самые различные формы, исследованием которых занимается топология. В ядре клетки содержатся двуспиральные нити ДНК, которые существуют в виде сложного комплекса с белками – нуклеопротеида хроматина. Плотную структурную упаковку хроматинов называют хромосомами. Белковые фрагменты заполняют желобки, имеющиеся на внешней поверхности двойной спирали ДНК, что способствует ещё более плотной их упаковке. Человеческой неоплодотворённой (гаплоидной) клетке присущ одинарный набор 46 хромосом, состоящих из 23 видов. При репликации двойная спираль расходится в нескольких местах, в которых с помощью специального фермента начинают синтезироваться короткие олигонуклеотиды – затравки будущей новой ДНК. На этих затравках другие ферменты ДНК-полимеразы инициируют сборку отдельных блоков ДНК. По мере удлинения блоков, двойная спираль раздвигается дальше. Затем образовавшиеся блоки сшиваются друг с другом ещё одним ферментом – ДНК-лигазой. Из-за антипараллельности ДНК, одна нить новой ДНК может расти непрерывно, в то время, как другая нить собирается из олигонуклеотидов. Так как на первых этапах биосинтеза ДНК весьма велика вероятность ошибок в выборе подходящих олигонуклеотидов, то начальные затравки вырезаются и могут пополнять нуклеотидом. Схематически процесс биосинтеза новых ДНК, называемый репликацией, показан на **Рисунок 27** Этот процесс удалось наблюдать с помощью электронного микроскопа.

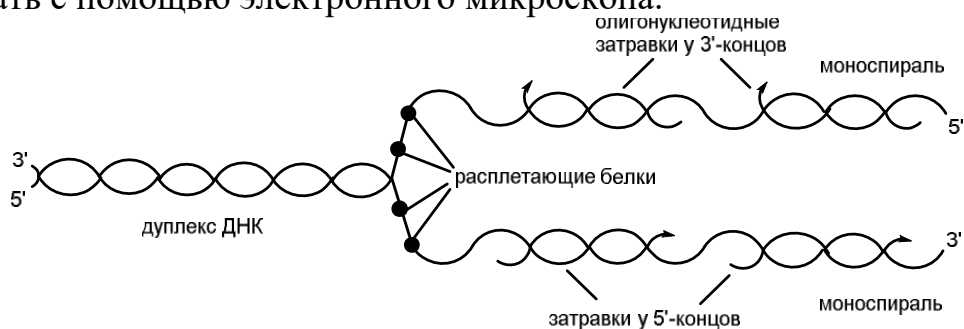


Рисунок 27 Схема репликации молекулы ДНК

Химизм репликации заключается в том, что ДНК-полимераза доставляет к месту сборки необходимый нуклеозид-5'-трифосфат (1, **Рисунок 28**). Она же обеспечивает его присоединение к растущей цепи ДНК (2). Как видно, реакция сшивания представляет собой нуклеофильное замещение пирофосфатной группы $P_2O_7^{4-}$ в нуклеозид-5'-трифосфате (1) в результате атаки его α -фосфатного фрагмента 3'-гидроксильной группой концевой нуклеотида ДНК (2). Таким образом, синтез цепи идёт в направлении 5'-3'. Очевидно, поскольку спирали ДНК антипараллельны, синтез новых молекул ДНК на

двух матричных цепях протекает одновременно в противоположных направлениях.

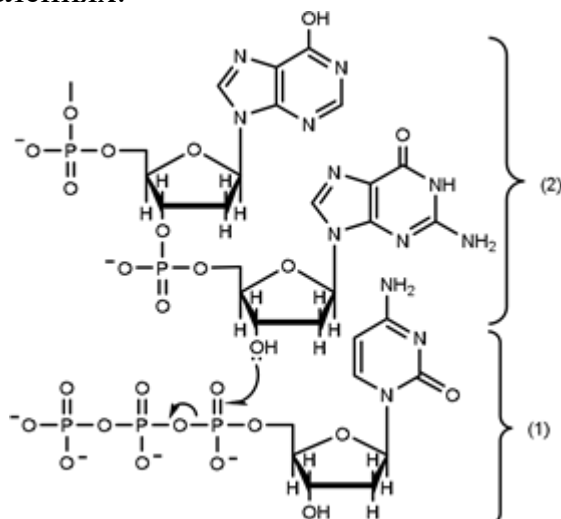


Рисунок 28 Химическая реакция, лежащая в основе наращивания цепи при помощи днк-полимеразы: (2) – фрагмент растущей цепи днк; (1) – встраиваемый нуклеозид -5'-трифосфат.

Разумеется, новые молекулы ДНК наращиваются в строгом соответствии с принципом комплементарности азотистых оснований, т.е. в том месте, где на матричной нити ДНК находится, скажем, остаток 5'-дезоксиадениловой кислоты, на растущей молекуле ДНК присоединяется фрагмент 5'-дезокситимидиловой кислоты, и т.д. Именно этим обеспечивается образование из одной двуспиральной молекулы ДНК двух новых, полностью идентичных исходной. Каждая из них состоит из одной прежней нити ДНК и одной вновь синтезированной. Генетическая стабильность обеспечивается именно высокой степенью точности репликации, а также работой многих ферментов, которые могут исправлять возникающие при сборке ошибки, а также повреждения нити растущей ДНК.

6.5. Гены и их кодирование

В отличие от ДНК, рибонуклеиновые кислоты и белки не способны к самовоспроизводству. Программа их синтеза в организме в конечном итоге заложена в ДНК. Такую программу называют генетической, т.к. ген (от *греч.* ген – род, происхождение), по определению, представляет собой участок молекулы ДНК, кодирующий строение РНК, аминокислот, пептидов, белков. В более широком смысле, ген является единицей генетического (наследственного) материала по формированию того или иного признака организма. Информация по синтезу индивидуальных аминокислот закодирована в виде нуклеотидных триплетов, называемых *кодонами*. (всего 61 кодон, плюс 3 кодона, которые являются только сигналами окончания процесса синтеза белка). Совокупность кодонов и их зашифрованную связь с аминокислотами называют генетическим кодом.

Таким образом, генетический код человека триплетен, так как использует природа по три последовательно соединённых нуклеотида в

каждом кодоне для шифровки одной аминокислоты. Код этот вырожден, так как на 20 аминокислот приходится 64 триплетных кодона, что составляет избыток в 44 единицы. Код един (универсален) для всех организмов. Тем не менее, для некоторых микроорганизмов возможна иная триплетная кодировка аминокислот.

6.6. Геном и функциональная геномика

В 23 видах хромосом человека содержатся десятки тысяч генов, в которых имеется несколько миллиардов нуклеотидных пар. Вся эта совокупность генов, представленных в наборе хромосом человека, обозначается в понятии геном. Начало 21 века ознаменовалось блестящим открытием, осмысление значения которого со временем будет постоянно возрастать,- была завершена расшифровка полного генома человека и возникла наука о геноме живого организма, структуре и функциях всех его генов. Эту науку называли геномикой. Работы по расшифровке человеческого генома начались в 1989 г., практически цель была достигнута в 2001 г, и вплоть до настоящего времени ведутся исследования по уточнению данных. При этом установлены следующие факты:

- 1) геном человека содержит около 24800 генов (из них более трёх тысяч рассматриваются как потенциальные биомишени);
- 2) наследственные гены, по которым воспроизводится в целом человеческий организм, составляют всего 5% от его генома;
- 3) остальная часть генома состоит в основном из (а) транспозонов (перемещающихся участков ДНК, которые формируют и изменяют структуру генома; (б) «молчащих» генов (многократно повторяющихся последовательностей нуклеотидов).

В геноме шимпанзе, как и у человека, насчитывается около 25 тысяч генов (25 молекул ДНК, включающих 3,1 млрд. нуклеотидов), причём последовательности нуклеотидов совпадают в этой паре видов живых существ на 96,0-98,8%. Наибольшее различие зафиксировано среди генов, связанных с восприятием запахов. Весьма важным с точки зрения создания эффективных лекарств для человека является наличие у шимпанзе гена, который предохраняет обезьяну от старческой болезни Альцгеймера.

В связи с полной расшифровкой генома человека утвердился новый подход в создании ЛВ – принцип функциональной геномики. Он основан на знаниях как структуры генома, так и функциях тех его участков, которые кодируют и передают информацию по синтезу нуклеиновых кислот, полипептидов и белков. Раскрытие структуры (карты) генома и изучение функций генов человека позволяют медицине становиться всё более превентивной, возрастает роль профилактики благодаря появлению способности выявлять возможность возникновения какой-либо генетической болезни у каждого человека заранее. Это приводит к существенно большей целенаправленности в создании соответствующих лекарств высокоизбирательного действия. Для предсказания вероятности проявления

подобной болезни достаточно будет проанализировать даже не весь генетический «портрет-паспорт» человека, а только определённую часть генома на наличие единичных различий («однобуквенный» мутагенный эффект) в коде аминокислот, которые могут привести к заболеванию. Решение этой задачи становится вполне реальным благодаря недавней разработке методов массспектрометрического анализа макромолекулярных полинуклеотидов. После выявления подобных нарушений химики могут синтезировать нужные ЛВ, исправляющие эти дефекты. Таким образом, на настоящее время основной задачей становится нахождение генов, контролирующих биосинтез функциональных олигопептидных и белковых молекул (включая биорецепторы), которые являются биомишенями для уже известных веществ. Так, найден ген, который контролирует биосинтез белка, ответственного за отложение амилоидных бляшек в сосудах мозга. Знание этого факта поможет в создании лекарств для лечения болезней Альцгеймера и Дауна. Систематические работы по расшифровке геномов других организмов начались в 1980-х годах, и к 2006 году установлено строение геномов около 100 бактерий, что открыло новую перспективу для синтеза препаратов узконаправленного действия против патогенных микроорганизмов и вредителей сельскохозяйственных растений. Эти знания позволят создать новые синтетические пестицидные структуры мощного селективного действия, а также вещества, увеличивающие урожайность и устойчивость культурных растений к засухе, перепадам температуры и другим неблагоприятным явлениям окружающей среды.

Первым расшифрованным растительным геномом был геном сорняка арабидопсиса, состоящий из 120 млн. пар оснований в 25 тыс. генов. В геноме риса *Oryza sativa* содержится 466 млн. пар оснований, заключённых в 45-56 тыс. генах. Определены также геномы нематоды – круглого почвенного червя (около 17-22 тыс. генов), плодовой мухи дрозофилы (13,5-15 тыс. генов), малярийного комара (13 600 генов). Геном полевой мыши, включающий около 30 тыс. генов, как оказалось, не сильно отличается от генома человека (24 847 генов). В связи с этими данными философско-поэтический образ Г. Державина – «Я царь, я раб, я бог, я червь», – получает некоторое «научное подтверждение».

Недавнее открытие в геноме дрозофилы гена развившейся устойчивости к хлорорганическому инсектициду ДДТ (ген DDT-R) даёт новые перспективы для синтеза пестицидных и регуляторных веществ. Была раскрыта функция этого гена в организме плодовой мушки. Оказалось, что ген DDT-R контролирует уровень важнейшего гемопротейда- цитохрома P-450. Этот сложный белок содержит протопорфириновую простетическую группу (гем) и обладает ферментативной функцией расщепления инсектицида ДДТ и других ядохимикатов. Цитохром P-450 имеется у всех живых существ в малых концентрациях. Теперь установлено, что, по крайней мере, у дрозофилы количество этого фермента резко возрастает при появлении гена резистенции DDT-R. Это научное открытие подтвердило важность принципа

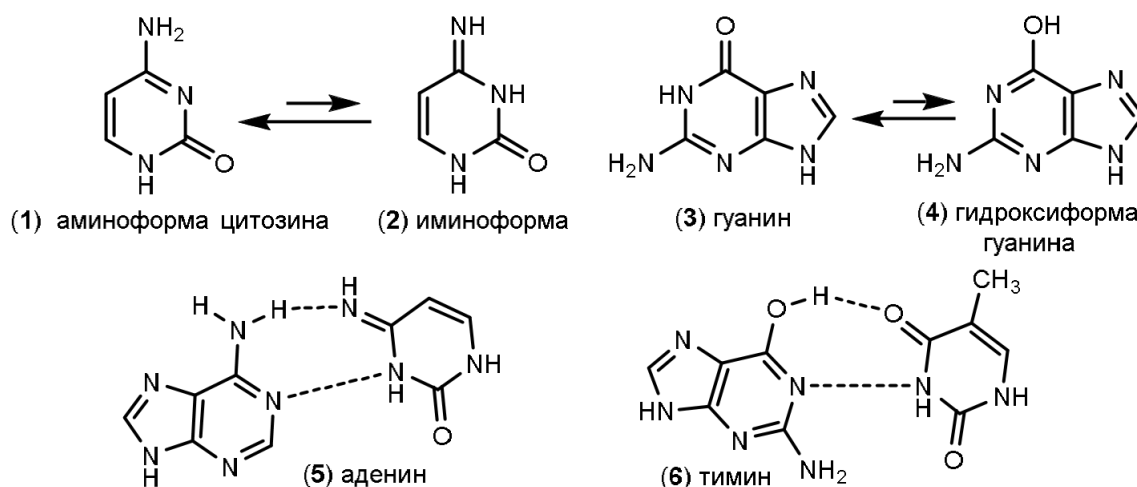
функциональной геномики-протеомики для поиска веществ, которые могут ингибировать выработку генов резистенции у вредных насекомых.

6.7. Мутации генов

Наиболее серьёзные нарушения химии организма связаны с изменением нормальной последовательности азотистых оснований в цепи ДНК. Такие мутации ведут к синтезу неправильных белков исследовательно к расстройству обменных процессов. Каковы же причины такого рода мутаций? Прежде всего, есть определённая, чисто статистическая вероятность включения неправильного азотистого основания при сборке молекулы ДНК или мРНК. Надо сказать, что эта вероятность чрезвычайно мала, не более 10^{-7} . К тому же существует специальный фермент, часть самой ДНК-полимеразы, своего рода контролёр, вырезающий ошибочно введённые в цепь нуклеотиды и заменяющий их правильными нуклеотидами. Но при огромных масштабах синтеза нуклеиновых кислот, какая-то часть ошибок, даже после репарационной работы такого биокорректора, остаётся неисправленной.

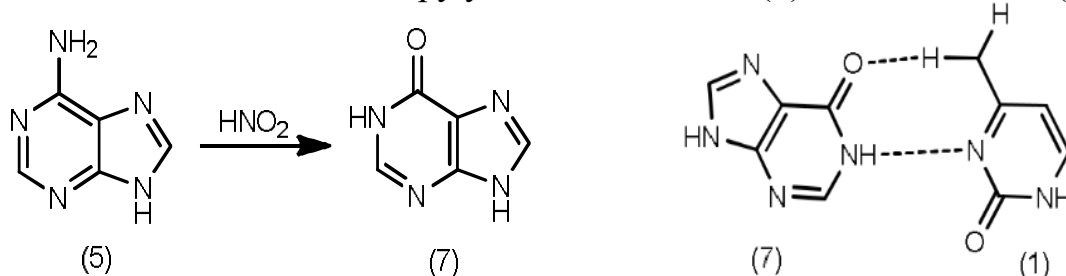
Случайным мутациям может способствовать также таутомерия азотистых оснований, например цитозина (1) и гуанина (3) – компонентов нуклеиновых кислот.

Аномальные комплементарные пары оснований.



Хотя эти гетероциклы (1, 3) существуют преимущественно в амино- и оксоформе, для них нельзя пренебрегать и менее устойчивым (одна часть на 10 тысяч) таутомером. Так, 0,01% цитозина в физиологических условиях (вода, pH 7) находится в иминоформе (2). Примерно такова же и концентрация гидроксиформы (4) в гуанине. Если в момент сборки ДНК даже чрезвычайно малые доли цитозина (1) и гуанина (3) находятся в этих формах (2, 4), теоретически возможно образование неправильных пар азотистых оснований А(5)-С(2) и G(4)Т(6). В них, как и в нормальных парах оснований, имеются хорошие предпосылки для стабилизации водородными связями. Мутациям способствуют некоторые химические вещества. Среди такого рода мутагенов – недостаточно апробированные лекарственные

препараты, многочисленные загрязнители окружающей среды, вредные компоненты табачного дыма и недоброкачественной пищи. Например, для придания свежего вида мясным продуктам, в них добавляют незначительные количества солей азотистой кислоты – нитритов. Между тем, в лабораторных опытах азотистая кислота легко превращает аденин (5) в гипоксантин (7), который может связываться в пару уже не с тиминам (6), а с цитозином (1):



Аномальная комплементарная пара

Хорошо известна высокая токсичность таких активных алкилирующих агентов, как йодистый метил, диметилсульфат, азиридины, диазометан. Попадая в организм, они алкилируют гетероатомы групп N-H, O-H, и S-H в аминокислотных остатках полипептидов, белков, ферментов и в нуклеиновых кислотах, приводя к ингибированию их активности. В случае O-алкилирования оснований ДНК (А, **Рисунок 29**) некоторыми химическими веществами, происходит потеря ими способности сохранять у повреждённой ДНК (Б) нативную структуру, например двойную спираль – за счёт невозможности образования водородных связей.

Для борьбы с подобным химическим мутагенезом в клетке имеются белки алкилтрансферазы, которые могут расщепить O-алкильную связь и «залечить» этот вид генетического повреждения. При этом сам белок становится прочно (ковалентно и необратимо) алкилированным, и его, строго говоря, уже нельзя считать ферментом.

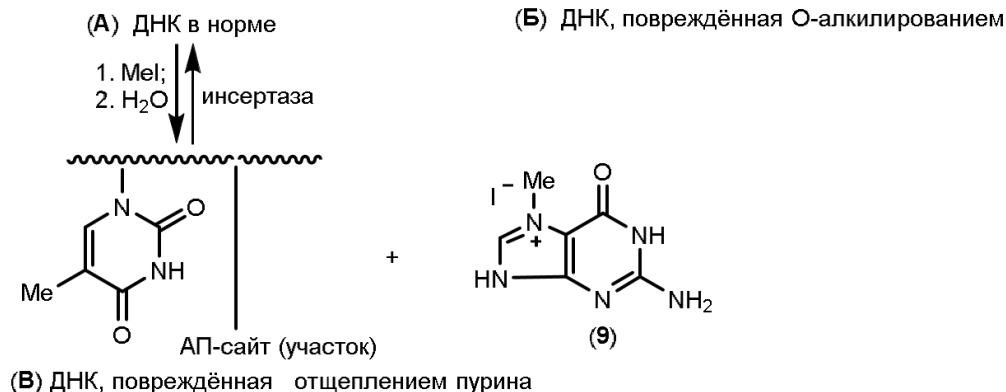
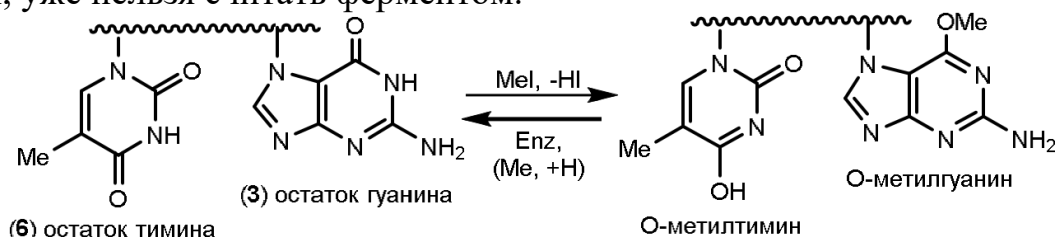
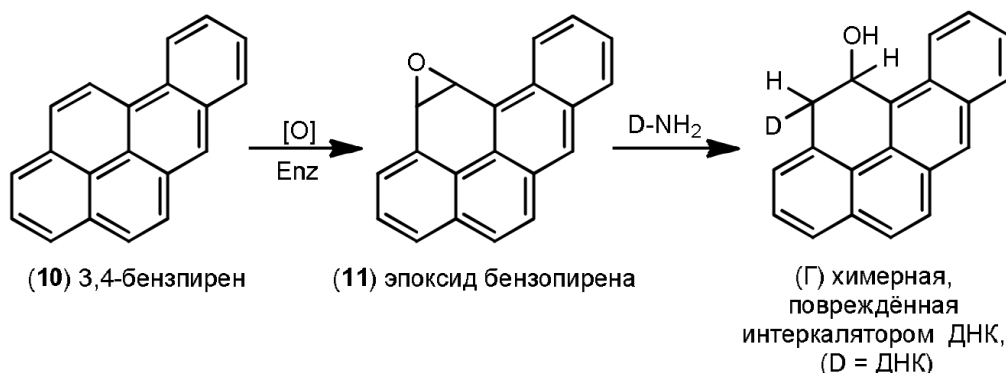


Рисунок 29 Схема генетических повреждений ДНК О-алкилированием и отщеплением гуанина при действии алкилирующих мутагенов (АП-сайт – апуриновый участок).

При действии алкилирующих мутагенов на ДНК (А) могут образовываться четвертичные соли азотистых оснований, в которых связь между азотом и остатком сахара легко разрывается даже при действии воды. Это приводит к удалению данного основания из цепи ДНК. В повреждённой ДНК (В) в результате отщепления оснований от остатка рибозы возникает апуриновый сайт (АП-сайт) – место, ранее занимаемое пурином (в данном случае гуанином). Этот тип повреждений репарируется ферментами инсертазами, которые способны вставлять (англ. insert) в освободившийся АП-сайт идентичное основание.

Другие ферменты – семейство гликозилаз, – способны сами отщеплять от сахара по гликозидной связи пуриновые и пиримидиновые основания, если они оказались химически (структурно) изменёнными и перестали нормально функционировать. В этом более сложном, чем предшествующий вид, ремонте на молекулярном уровне принимает также участие АП-эндонуклеаза, которая распознаёт возникший АП-сайт и вырезает его (один сахарофосфат). Затем в действие вступают ещё два фермента. Это ДНК-полимераза и полинуклеотидлигаза, которые сшивают два конца разорванной нити ДНК, вставляя между ними новый, нормальный нуклеотид.

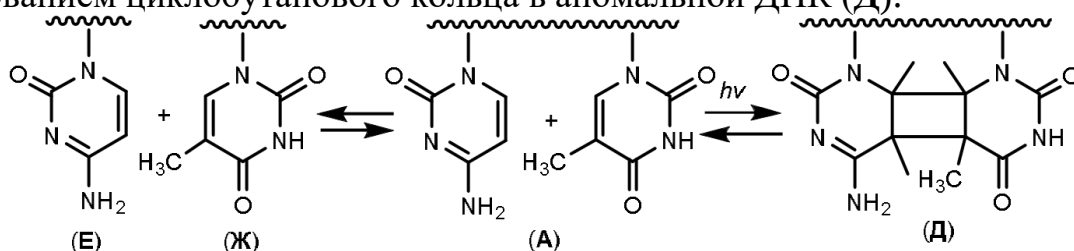
Внимание учёных привлекает ещё один класс веществ-мутагенов, называемых *интеркаляторами*. Молекулы этих соединений обычно имеют плоскую полициклическую структуру, что даёт им возможность проникать в пространство между парами соседних азотистых оснований в цепи ДНК и располагаться там параллельно друг другу. Мощными интеркаляторами являются некоторые полиядерные гомо- и гетероароматические соединения. При интеркаляции полинуклеотидная цепь, подобно пружине, растягивается, и вблизи места внедрения интеркалятора раскручивается. Сам интеркалятор нередко служит матрицей для встройки лишнего нуклеотида в цепь ДНК при её репликации. Иногда действие интеркалятора может быть весьма специфичным. Например, канцерогенная активность 3,4-бензпирена (10) вызвана тем, что попадая в организм, он предварительно подвергается ферментативному окислению с образованием эпоксида (11), который затем и интеркалирует в цепь ДНК. Будучи сильным алкилирующим агентом, эпоксид далее ковалентно связывается с амино- и гидроксигруппами компонентов нуклеиновых кислот. Образующаяся при этом *химерная* ДНК (Г) уже не может нормально функционировать.



Как удаление азотистого основания из нормальной цепи ДНК, так и внедрение в её цепь лишних азотистых оснований, представляют собой особенно опасные разновидности мутаций. В результате подобных изменений сдвигается весь генетический код, и образующийся на испорченной матрице белок становится совершенно непригодным для выполнения естественных биологических функций.

Тем не менее, при определённых условиях интеркаляторы могут стать базой для создания новых лекарств.

К более мягким последствиям ведут *точечные мутации*, когда одна пара комплементарных оснований в цепи ДНК заменяется другой. В этом случае в белок включается лишь одна неправильная аминокислота. Если такое включение произошло вдали от активного центра фермента-белка, мутация может оказаться безвредной (*молчащая мутация*). Если же соответствующая аминокислота играет важную роль в работе белка, мутация ведёт к нарушению его деятельности и к заболеванию. Важнейшими причинами мутаций генного материала являются также и такие внешние воздействия на организм человека, как различные виды облучения. В результате воздействия УФ-облучения или другой проникающей α - и β -радиации в молекулах ДНК могут возникать повреждения структуры, связанные с тем, что два соседних основания (здесь на схеме цитозин и тимин) в нормальной нити ДНК (А), поглощая квант света, димеризуются с образованием циклобутанового кольца в аномальной ДНК (Д):



(А) - ДНК в норме; (Д) ДНК, повреждённая димеризацией соседних оснований;
(Е, Ж) - остатки ДНК, повреждённой разрывом тяжа.

В этом месте теряется целостность генетической информации. Однако возникающая фотомутация может быть исправлена специальным ферментом – фотолиазой, которая сама активируется фотооблучением, и в возбуждённом состоянии распознаёт циклобутановый фрагмент в ДНК и дециклизует его, восстанавливая естественную структуру ДНК (А). Если же под действием ионизирующей радиации в нормальной ДНК (А) произошёл разрыв тяжа (сахарофосфатной нити) и образовались два её фрагмента (Е) и (Ж), то в

репарации этого генетического повреждения (т.е. в связывании двух фрагментов **Е** и **Ж**) участвуют ДНКполинуклеотидлигазы.

В целом, в случае нарушений деятельности репарирующих ферментов возможно возникновение ряда наследственных заболеваний. К ним могут относиться высокая чувствительность к химическим мутагенам и солнечному УФ-свету (красная пигментация кожи и др.). неврологические и иммунные расстройства, повышенная ломкость волос, отсталость в физическом, умственном и половом развитии, а также увеличение предрасположенности к раковым заболеваниям кожи и прямой кишки из-за активации онкогенных участков ДНК. Таким образом, накопление мутаций является, возможно, одной из главных причин заболеваний и старения (сверхболезни) живого организма. Неблагоприятные мутации могут переходить от родителей к потомству, что приводит к возникновению наследственных (молекулярных) заболеваний. В настоящее время расшифрована химическая сущность сотен молекулярных заболеваний, однако они всё ещё остаются неизлечимыми. Надежды здесь связываются в первую очередь с коррекцией и активацией естественной защитной (иммунной) системы человека, а также с генной инженерией.

6.8.Хемогеномика. Типы взаимодействий лекарств с ДНК

Хемогеномика. В 1980-х годах возникла наука *фармакогенетика* - часть фармакологии, изучающая зависимость лечебных и токсических эффектов одного и того же лекарственного вещества не только от возраста и характера больных, но и от их генетических особенностей и, в частности, от их пола и этнической принадлежности. Например, приём арабами кодеина не устраняет боли, т.к. это пролекарство в их организмах быстрее метаболизируется до неактивных метаболитов, чем гидролизуется до обезболивающего агента морфина. Из-за сложности индивидуальных генетических особенностей каждого пациента лекарства помогают лишь в половине случаев. В связи с полной расшифровкой человеческого генома в 2001 году фармакогенетика перерастает в *фармакогеномику*. Геномная паспортизация каждого человека позволит делать предварительный (перед назначением ЛВ) генетический анализ пациента для более точного выбора ЛВ.

Параллельно на стыке фармакологии, химии и информатики (науке о поиске, обработке, хранении и предоставлении надёжных информационных данных) возникла ещё одна наука – хемогеномика. Она изучает влияние любых химических веществ, а также потенциальных ЛВ и мишень-специфичных веществ на функции генов. Предсказательная хемогеномика опирается на:

- 1) библиотеки химических веществ;
- 2) библиотеки генов и генов-биомишеней;

3) сведения по экспериментальному скринингу множества химических веществ на множестве генов-биомишеней, включая библиотеку веществ с известной фармакокинетикой (данные по АРМЭТ).

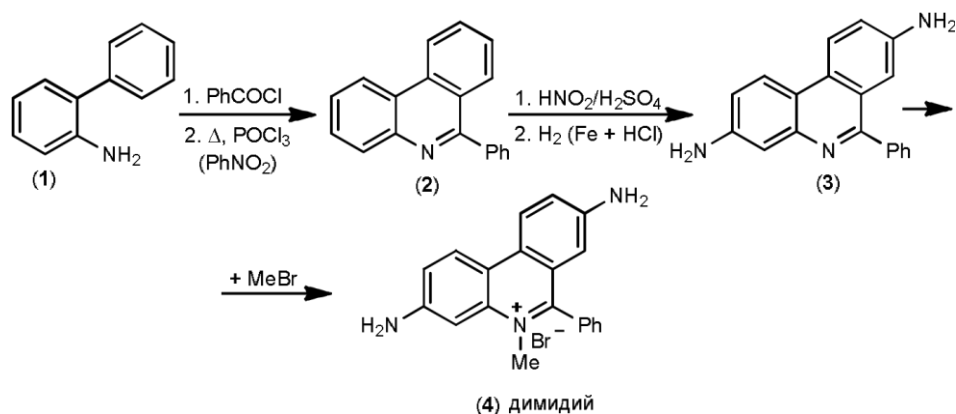
При этом предполагается, что структурно подобные вещества (СПВ) связываются с одними и теми же генами-мишенями и, следовательно, будут иметь подобный профиль биоактивности. А биомишени, взаимодействующие с такими СПВ, имеют аналогичные активные центры.

Типы взаимодействий ПЛВ с ДНК. Возможны по крайней мере три типа обратимого взаимодействия ПЛВ с ДНК. Внешний сахарофосфатный тяж ДНК содержит отрицательно заряженные группы фосфата. С фосфатными группами могут взаимодействовать положительно заряженные или сильно поляризованные группы линейных ПЛВ. Такой тип связи обеспечивается посредством внешнего электростатического взаимодействия. В дизайне новых противораковых ПЛВ линейной структуры (например, имеющих полиамидную цепь) следует учесть полезность введения в их молекулы концевых положительных зарядов или сильно поляризованных группировок атомов.

Второй тип взаимодействия может осуществляться путём связывания ПЛВ по канавке (или жёлобу), образующейся между двумя тяжами. При этом такой укладке способствуют электростатические силы, образование Н-связей, стерическое соответствие молекулярных фрагментов, вытеснение молекул воды гидрофобными силами. В больших жёлобах ДНК могут с ней связываться протеины, а в малых – небольшие по размеру ПЛВ типа широко известных противораковых ЛВ цисплатина и карбоплатина.

Наконец третий тип взаимодействия заключается в встраивании (интеркаляции) плоского ПЛВ между двумя парами оснований. Для дизайна взаимодействия третьего типа, а именно, интеркаляции ПЛВ стэкингом перпендикулярно оси двойной спирали ДНК, надо создавать плоские, преимущественно ароматические или гетероароматические молекулы ПЛВ, способные к образованию Н-связей и, что важнее, комплексов с переносом заряда. При интеркаляции расстояние между парами комплементарных оснований А-Т и С-Г значительно увеличивается, что нарушает структуру тяжа, размеры спирали и передачу информации на РНК. При этом интеркалятор входит не между каждыми двумя парами оснований, а через один интервал (например, в случае последовательности из четырёх пар он входит между 1-й и 2-й и между 3-й и 4-й парами, но не между 2-й и 3-й). Этот принцип «отрицательной кооперативности» или «исключения соседа» определяет конформационное «прижатие» двух соседних пар оснований друг к другу и уменьшение за счёт этого расстояния между ними, что затрудняет вход второй молекулы интеркалятора к соседу. Н-связи при этом не разрушаются, но нарушается регулярность спиральной структуры. На принципе интеркаляции был осуществлён дизайн четвертичных солей типа (4), обладающих трипаноцидными свойствами. Димидий (4) и этидий (структура та же, что и у димидия 4, но вместо группы ^+NMe введена биоизостеричная ^+N -этильная группа) – эффективные средства для лечения

трипаносомозов. Это болезни, вызываемые паразитическими микроорганизмами (трипаносомами), переносчиками которых являются муха це-це (вызывает африканскую "сонную болезнь") и клоп триатомид (южноамериканская болезнь чага). Кватернизация пиридинового атома азота в соединении (3) значительно повышает биоактивность препарата. Получение циклического скаффолда (2) осуществляют гетероциклизацией 2-аминодифенила (1).



Рассмотрим ещё один пример успешного использования взаимодействий третьего типа. В середине 1980-х годов был предложен оригинальный способ использования природного фурукумарина - 8-метоксипсоралена (5), встречающегося в плодах инжира и некоторых овощах, - для лечения одной из разновидностей рака крови (Тклеточной лимфомы). Этот метод, названный фотофорезом, основан на интеркаляции кумарина (5) в ДНК Т-лимфоцитов и последующем фотооблучении образующегося при этом комплекса (Рисунок 30):

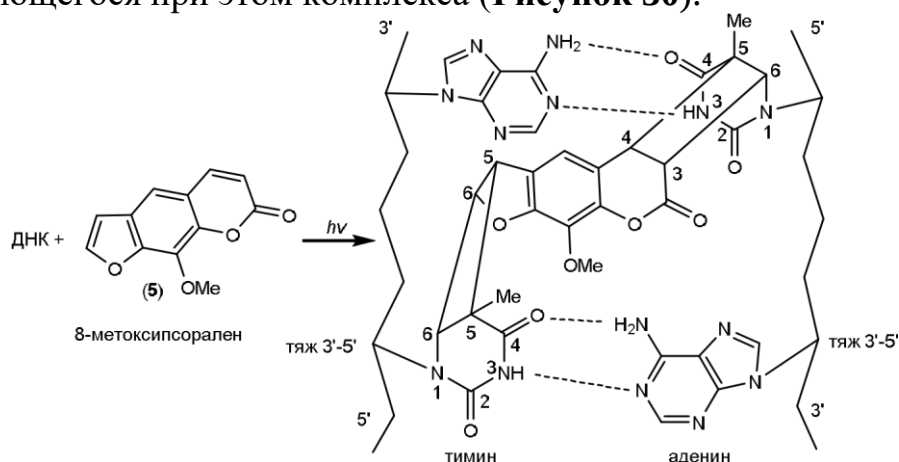


Рисунок 30 Схема взаимодействия интеркаляторной молекулы метоксипсоралена (5) с основаниями ДНК при фотовозбуждении.

При фотовозбуждении подобного комплекса УФ-светом определенной длины волны двойная связь $C_5=C_6$ тиминового фрагмента ДНК раскрывается и взаимодействует с двойной связью при $C_5=C_6$ фуранового фрагмента интеркалятора (5), а тимин соседней пары оснований реагирует аналогичным образом с двойной связью при $C_3=C_4$ пиранового фрагмента той же молекулы интеркалятора. Происходит, таким образом, прочная

ковалентная сшивка двух цепей ДНК раковой клетки, что предотвращает репликацию ДНК и, следовательно, останавливает размножение и рост "бессмертных" раковых Т-лимфоцитов.

В заключение раздела отметим, что на 2014 год создано «химическое пространство» синтезированных органических соединений, включающее более 50 миллионов индивидуальных структур, а изучено в качестве потенциальных мишеней более тысячи генов и более трёх тысяч белков человека. На этой основе за «постгеномное» почти пятнадцатилетие получен ряд ЛВ для лечения некоторых наследственных заболеваний и некоторых видов рака, индуцирующих специфические дефекты в геноме. Однако в целом считают, что пока польза для медицины оказалась не столь большой, как ожидалось в первые годы наступления.

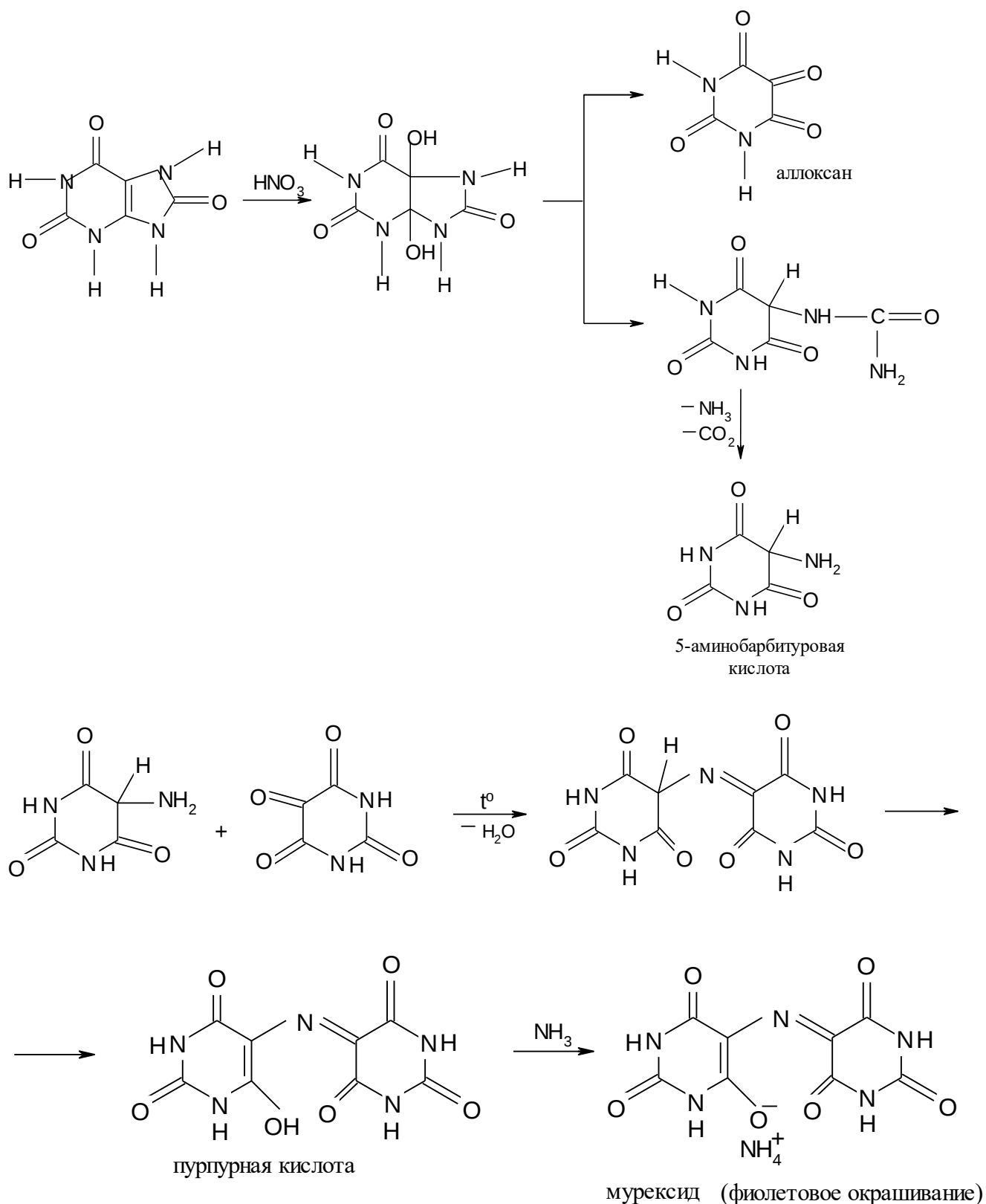
6.9 Лабораторный практикум

Пурины

Пурины, представляющие собой конденсированную систему пиримидина и имидазола, имеют большое биологическое значение. Интерес представляют оксипурины, 2,6-диоксипурин (ксантин), и его метильные производные (кофеин, теofilлин, теобромин). 2,6,8 – Триоксипурин называют мочевой кислотой.

Мурексидная проба. Общегрупповая реакция на пурины (ксантин, теобромин, кофеин, мочевая кислота), основанная на окислительно-гидролитическом разложении веществ группы ксантина до производных пиримидина.

Имидазольное кольцо оксипурина при действии окислителей разрывается. Например, из мочевой кислоты получают аллоксан и 5-аминобарбитуровая кислота, которые при взаимодействии друг с другом дают пурпурную кислоту. Пурпурная кислота реагирует с аммиаком с образованием аммониевой соли – мурексида:

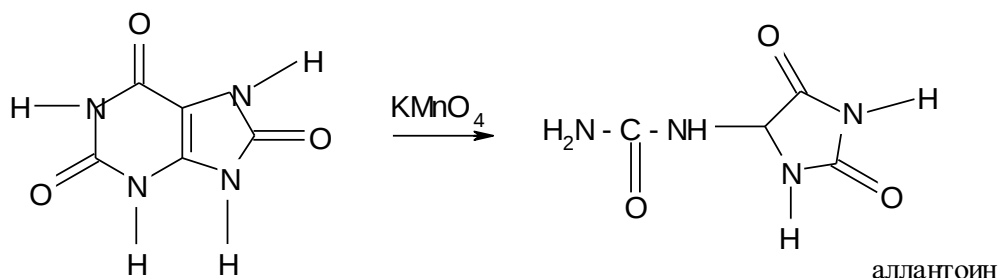


Экспериментальная часть.

В фарфоровый чашку помещают 1-2 мкг мочевой кислоты и добавляют 2 капли концентрированной азотной кислоты. Полученный раствор выпаривают досуха на кипящей водяной бане, стараясь избегать обугливания вещества. После выпаривания остаток приобретает розовый

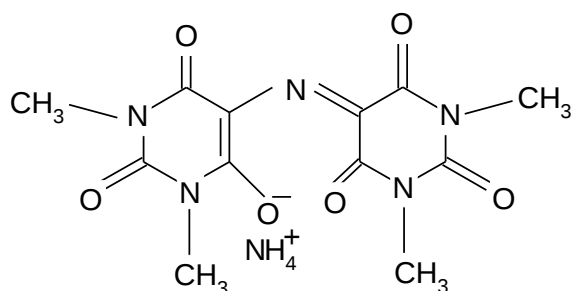
или коричневый цвет, а при смачивании его 2-3 каплями 10%-ного водного раствора аммиака. Появляется пурпурно-фиолетовое окрашивание.

При окислении перманганатом калия в структуре мочевого кислоты разрушается пиримидиновый цикл, а имидазольный сохраняется; образуется аллантаин:



В случае метилированных ксантинов вместо азотной кислоты используют раствор перекиси водорода в солянокислой среде.

Определение кофеина. В фарфоровый чашку помещают 1-2 мкг кофеина и добавляют 10 капель 5%-ного раствора пероксида водорода и 1 каплю 10%-ной хлороводородной кислоты. Полученный раствор выпаривают досуха на кипящей водяной бане, стараясь избегать обугливания вещества. После выпаривания остаток приобретает желто-коричневый цвет. К сухому остатку добавляют каплю раствора аммиака; остаток окрашивается в пурпуровый цвет, обусловленную аммониевой солью тетраметилпурпуровой кислоты:



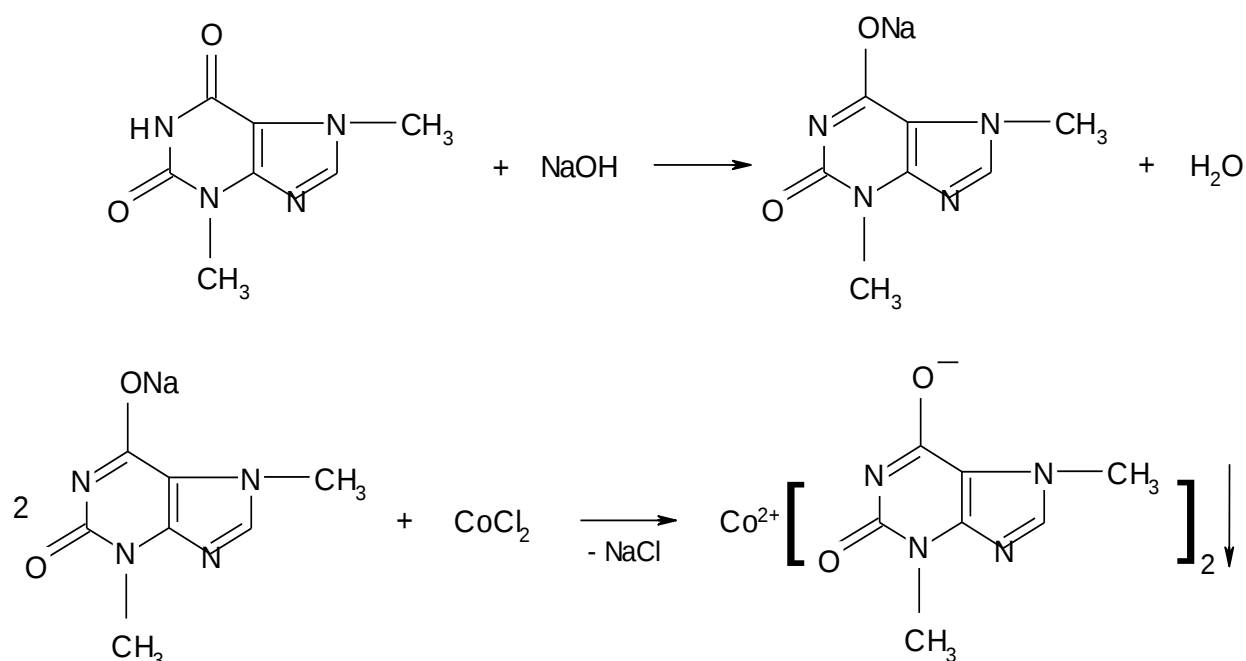
Аденин не дает мурексидной реакции.

Качественная реакция обнаружения метилированных ксантинов.

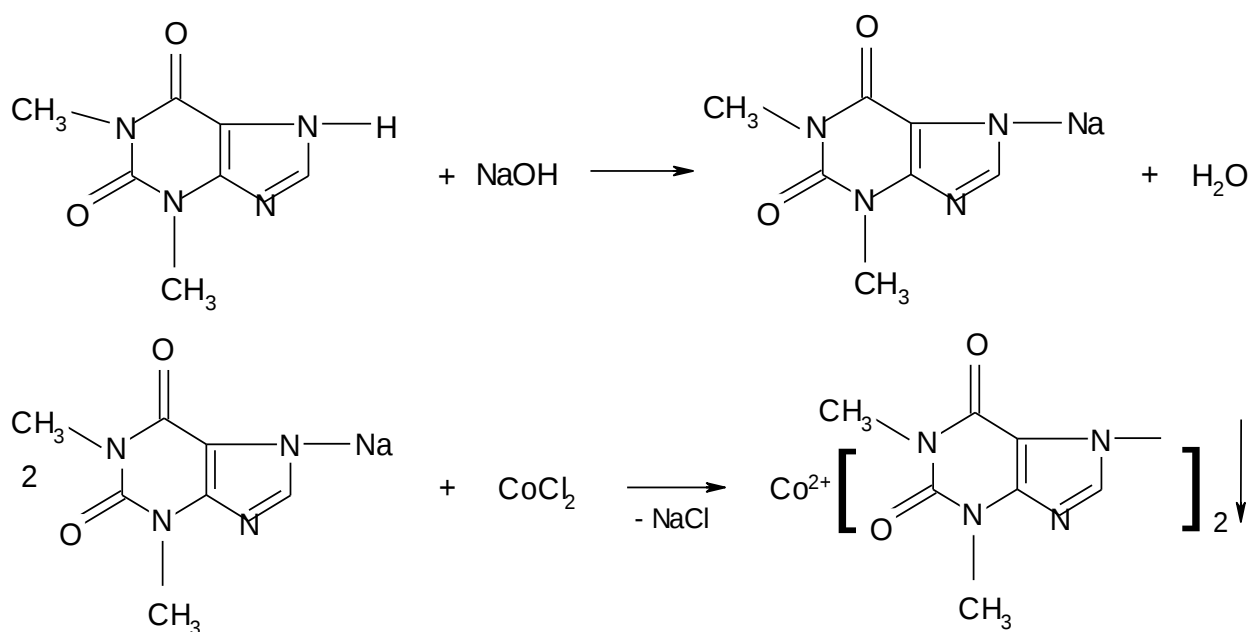
С помощью реакций с хлоридом кобальта (II) можно отличить кофеин, теofilлин, теобромин друг от друга; эта реакция используется для анализа алкалоидов пуринового ряда.

Экспериментальная часть.

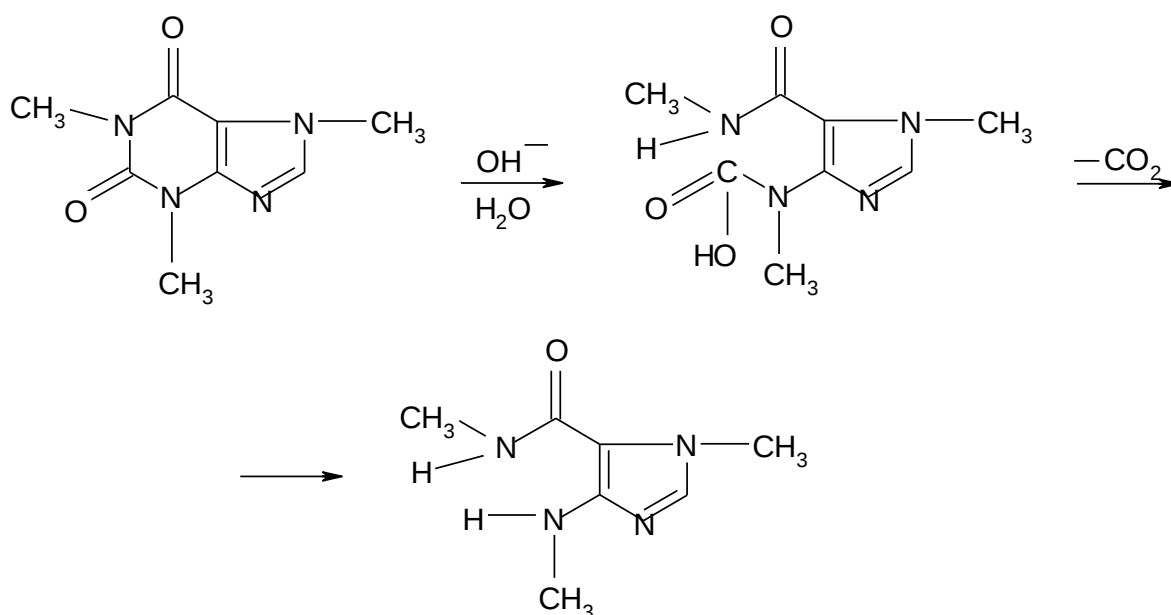
В первую пробирку добавляют несколько кристаллов кофеина, во вторую – теобромину, в третью – теofilлина. В каждую пробирку прибавляют по 2 капли 10%-ного раствора гидроксида натрия и встряхивают в течение 2 мин, а затем вносят по 2 капли 5%-ного раствора хлорида кобальта (II). Во второй пробирке теобромин-натрий окрашивается в преходящий фиолетовый цвет с выделением сероватого осадка:



В третьей пробирке наблюдается образование белого с розоватым оттенком осадка:

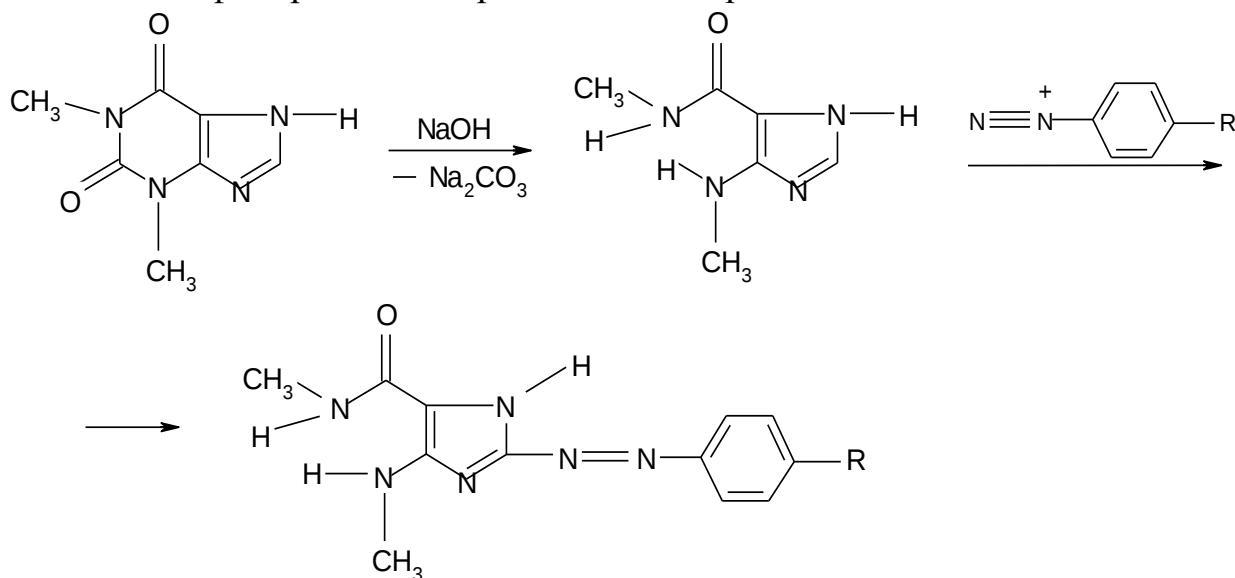


В первой пробирке, содержащей кофеин, не наблюдается образование осадка. Однако, при значении pH свыше 9 происходит разложение кофеина до кофеиндикарбоновой кислоты, которая разлагается до кофеидина и соответствующего карбоната:



В сернокислой среде кофеин может разлагаться до муравьиной кислоты.

Теофиллидин, полученный в такой же реакции с теофиллином, может быть идентифицирован по образованию азокрасителя:



Реакция с танином. К навеске кофеина прибавляют по каплям 0,1%-ный раствор танина и наблюдают беловатый или желтоватый аморфный осадок. В избытке раствора танина осадок растворяется.

Реакция с хлоридом ртути (II). Является общей для кофеина, теофиллина, теобромина; образуется белый кристаллический осадок, представляющий собой комплексное соединение, включающее оба вещества в эквимольном соотношении.

При добавлении к теофиллину щелочного раствора нитропруссид натрия появляется зеленое окрашивание, исчезающее при добавлении избытка кислоты.

Занятие 7.

Тема занятия: Значение функциональных групп в дизайне структуры новых потенциальных лекарственных средств. Функциональные группы в лекарственных препаратах. Гетерофункциональные соединения.

Цель занятия: Изучить современные подходы к дизайну лекарственных веществ природного происхождения для моделирования их биологической активности гетерофункциональных соединений.

Вопросы к занятию:

1. Полимерные материалы для создания наноматрицы-носителя лекарственного агента. Их структуры и синтеза
2. Гомоцепные (карбоцепные) полимеры и сополимеры для создания лекарственных наночастиц
3. Гетероцепные полимерные материалы
4. Нанотехнологии в дизайне устройств для защиты и доставки нанопрепаратов
5. Примеры успешного дизайна лечебных нанопрепаратов
6. Особенности работы в программе PASS

7.1. Полимерные материалы для создания наноматрицы-носителя лекарственного агента. Их структуры и синтеза

Пролонгирование действия лекарств чрезвычайно важно как с точки зрения медицинской (уменьшение вводимых доз, снижение риска нежелательных побочных эффектов и токсичности, увеличение эффективности лечения), так и с точки зрения экономической (удешевление курса лечения за счёт резкого снижения терапевтической дозы). Обычно лекарственное средство состоит из собственно ЛВ (активное начало) и компонентов лекарственной формы, используемых для удобства введения препарата в организм. Большинство ЛВ быстро подвергается метаболизму и до биоматрици порой достигает лишь десятая доля введенного препарата. Кроме того известно, что лечебный эффект низкомолекулярных веществ (после однократного их приёма) сохраняется в среднем лишь от 3 до 6 часов. В связи с этим постоянно ведутся работы по созданию таких лекарственных форм, которые обеспечивали бы длительную и равномерную подачу ЛВ в кровоток и точную их доставку к больному органу.

К физико-химическим приёмам пролонгирования действия ЛВ без изменения его структуры относятся различного рода химические «прививки» этого ЛВ к нейтральной (биологически не активной) полимерной основе в виде координационных донорно-акцепторных или легко рвущихся ковалентных связей. Наиболее надёжными физическими методами являются технологические способы пролонгирования, заключающиеся в создании лекарственных форм, которые резко замедляют выделение ЛВ в организме – матричных таблеток, микрокапсул, микродраже, накожных аппликаторов, наносфер, наночастиц и других наноустройств, включающих жидкие и твёрдые липосомы, мицеллы и тому подобные субмикронные ансамбли,

которые содержат лечебные молекулы. В матричных таблетках для перорального приема ЛВ в качестве матриц используют, например, как набухающие, так и инертные полимерные материалы. В этих материалах ЛВ равномерно диспергировано или растворено и медленно выводится из устройства на пути к биомишени, что позволяет защитить ЛВ от метаболических потерь. Создаются также «биологически активные полимеры», в которых фармакофором служит ЛВ, «привитое» слабой ковалентной или координационной донорноакцепторной связью к полимерному носителю. Такие системы имеют высокие периоды полувыведения ЛВ из организма. Степень пролонгирования их действия и уровень биоактивности зависят от скорости высвобождения ЛВ полимерной матрицей (например, гидролизом указанных связей ЛВ с носителем).

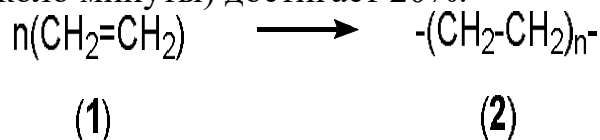
Любой выбранный полимерный носитель должен быть биосовместимым с организмом и обладать системой пор для контролируемого вывода из матрицы лекарства. Предполагается, что матричный полимер в идеале должен быть биоразлагаем путём химического или биохимического гидролиза или за счёт других метаболических процессов. При этом не должны образовываться токсичные метаболиты. Правильный подбор соответствующего полимерного носителя для того или иного ЛВ может определять необходимую скорость его высвобождения из матрицы. В целом рациональный дизайн комплекса ЛВ с полимером-носителем улучшает фармакокинетические и фармакодинамические свойства лечебного препарата, значительно пролонгирует его действие и позволяет контролировать его подачу в организм, замедляя диффузию лекарства из матрицы. Напомним, что в случаях применения обычных форм введения ЛВ в организм такой контроль невозможен.

Ниже приведены сведения о структурах и синтезах основных полимерных материалов, которые исследуются или уже используются для создания матриц-носителей лекарственных агентов. При выборе нужного полимера учитываются в каждом случае многие его свойства и параметры: молекулярная масса, твёрдость и жёсткость (определяемые степенью кристалличности и температурой фазового перехода – стеклования), вязкость, гидрофобность, уровень гидрофильности, набухаемость в воде, растворимость в воде, степень пористости, механическая прочность, липкость, механическая прочность.

7.2. Гомоцепные (карбоцепные) полимеры и сополимеры для создания лекарственных наноформ

Полиэтилен и полипропилен были одними из первых, использованных в качестве устройств для избирательной доставки лекарственных веществ к биомишеням. Однако эти синтетические полимеры слишком гидрофобны и не являются биоразлагаемыми материалами. Производят полиэтилен радикальной полимеризацией этилена (**1**) при высоком давлении (около 2000 атм. при 200-300⁰С) в трубчатых реакторах в присутствии кислорода или

пероксидов. Степень превращения этилена за один проход через реактор (время контакта около минуты) достигает 20%.



В другом промышленном методе полимер (2) получают координационно-ионной полимеризацией этилена при низком давлении (около 20 атм. при 80°C), что обеспечивается использованием катализаторов Циглера-Натта (комплексы тетрахлорида титана с триалкилалюминием).

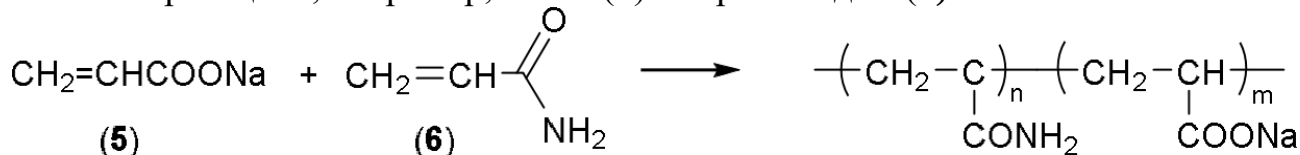
Особый интерес для создания носителей ЛВ представляют полимеры, которые содержат в качестве боковых заместителей различные функциональные группировки. Их реакционноспособные заместители способствуют образованию различных связей с лечебным веществом и лучше обеспечивают адресность его доставки к биомишени.

Сополимеры, полученные сополимеризацией различных эфиров метакриловой кислоты (3), нерастворимы в физиологической жидкости, но могут набухать и становятся проницаемыми для водных растворов ЛВ, особенно в присутствии растворимых эфиров целлюлозы. *Поли(алкилциано)акрилаты* (4) – относительно новая группа эффективных носителей ЛВ. Её представители оказались подвержены лёгкому биоразрушению по С2-С3-связи и нашли довольно широкое применение для контролируемой адресной доставки лекарственных веществ, высвобождаемых диффузными процессами.



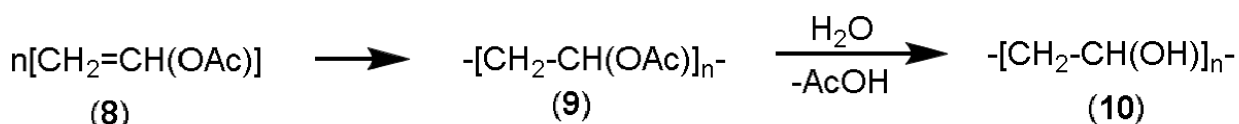
(3) R = Me, R' = алкильные группы нормального и изостроения, полиалкилметакрилаты; (4) R = CN, R' = алкильные группы нормального и изостроения, поли(алкилциано)акрилаты

Полимеры и сополимеры на основе солей (анионные *полиакрилаты*), эфиров и амидов акриловой кислоты используются для создания наноматриц с улучшенными показателями АРМЭТ. Полиакрилаты получают главным образом радикальной полимеризацией акриловой кислоты, её эфиров, солей или их сополимеризацией с акриламидом, 2-метилакрилатами, стиролом и т. д., например, акриловые смолы (7) получают радикальной сополимеризацией, например, солей (5) с акриламидом (6):



(7) акриловые смолы

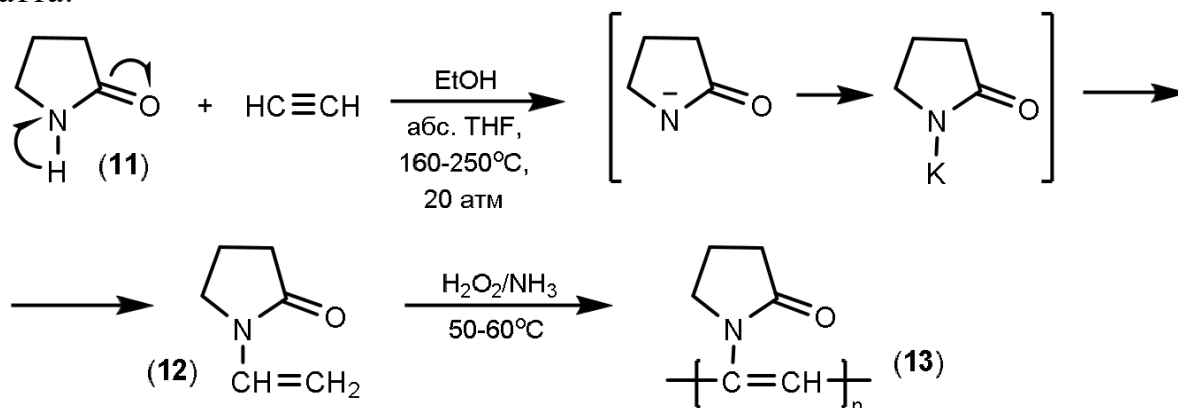
Поливинилацетат (9) и *поливиниловый спирт* (10), обладающие высокой адгезией и плёнкообразующей способностью, используют для получения наноносителей лекарств. Поливиниловый спирт синтезируют гидролизом или метанолизом (в присутствии едкого натра) поливинилового эфира (9), который в свою очередь получают радикальной полимеризацией винилацетата (8) при 60-65°C, в присутствии K₂S₂O₈.



пластификатор ВВ

Смесь поливинилового спирта с поливинилацетатом превращают действием фталевого ангидрида в смешанный полимер, который частично им ацилирован. На основе этого полимерного материала изготавливают оболочки для таблеток с ЛВ.

Сополимеры с *поливинилпирролидоновыми* сегментами интенсивно исследуются в качестве нетоксичных биосовместимых наноносителей лекарственных структур, связанных ионными, ковалентными или донорноакцепторными связями с полимерной матрицей. *Поливинилпирролидон (13)* синтезируют из исходного мономера N-винилпирролидона (12), который получают в промышленности N-винилированием NH-пирролидона (11) ацетиленом. Следует отметить, что NH-пирролидон амбифилен и может проявлять как основные свойства (с HCl он образует гидрохлорид), так и кислотные (с калием или натрием под действием щелочи он образует соль). Реакция катализируется этилатом калия или калиевой солью пирролидона и проводится в жидкой фазе (абсолютный толуол или ТГФ, 160-250 °С, P = 20 атм.) либо в паровой фазе (170 °С, P = 1,5 атм.). N-винилпирролидон (12) затем полимеризуют по радикальному механизму в присутствии пероксидов (50-60 °С, H₂O₂/NH₃) или по координационно-каталитическому механизму на катализаторах Циглера-Натта:



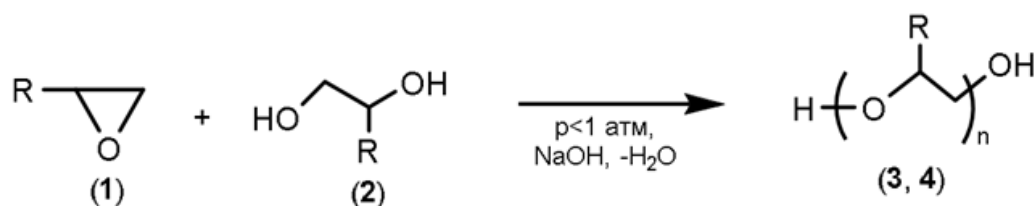
7.3. Гетероцепные полимерные материалы

Эпоксидные (полиэфирные, полигликолевые) смолы.

Полиэтиленгликоли (ПЭГ, полиэтиленоксиды, полиоксиэтилены 3) и полипропиленгликоль (ППГ, полипропиленоксид 4) относятся к неиногенным нетоксичным полимерам с молекулярной массой от 200 до 6000 дальтон. Эти полиэфиры благодаря своей хорошей адгезии образуют на наногранулах твёрдого ЛВ тонкие защитные пленки. Обычно полимерные наноносители и липосомы, несущие ЛВ, довольно быстро адсорбируются своей гидрофобной поверхностью плазменными белками (опсонидами), выводятся кровотоком в печень и нейтрализуются вместе с ЛВ. Так

реализуется один из защитных механизмов (ретикулоэндотелиальный) организма от вредного воздействия ксенобиотиков. Таким образом, большая часть введенного ЛВ не успевает достигнуть своей мишени и выводится из организма. Было найдено, что если покрыть гидрофобную поверхность наночастиц гидрофильным ПЭГ, адресность доставки ЛВ (вспомним концепцию «магической пули» Пауля Эрлиха) резко возрастает за счёт многократного увеличения периода полувыведения ЛВ. Это открытие назвали *технологией стелс* в фармакологии.

Синтезируют полиэфиры (3 и 4) полиприсоединением оксиранов (1) к стартовым исходным – этилен- или пропиленгликолям (2). Низкомолекулярные ПЭГ и ППГ получают при нагревании (100-160°C) в присутствии щёлочи с отгонкой воды:

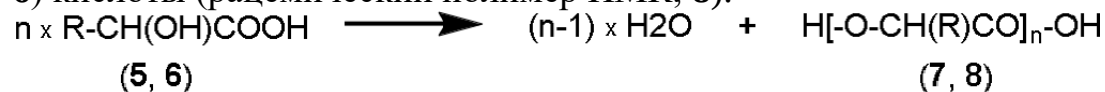


(3) R = H, ПЭГ, полиэтиленоксид;
(4) R = Me, ППГ, полипропиленоксид

Высокомолекулярные полимеры (3 и 4) образуются в присутствии триалкилалюминиевых катализаторов. Контролируя среднюю молекулярную массу полиолефиноксидов, можно управлять степенью их набухания и высвобождением ЛВ из их матриц.

Поли(α-гидроксикислоты и полиангидриды. Первыми биоразлагаемыми синтетическими полимерами, которые были с успехом применены как матрицы-носители, были *поли(α-гидроксикислоты)*. Наиболее удачными оказались полимеры, получаемые термической поликонденсацией гликолевой (2-

гидроксиэтановой, 5) кислоты в присутствии октаноата олова (полимер ПГК, 7) или поликонденсацией молочной (2-гидроксипропановой, 6) кислоты (рацемический полимер ПМК, 8).



(5) R = H;

(6) R = Me

(7) R = H, ПГК;

(8) R = Me, ПМК

Сополиконденсацией этих двух карбоновых кислот получают полиэфир ПГМК (9):



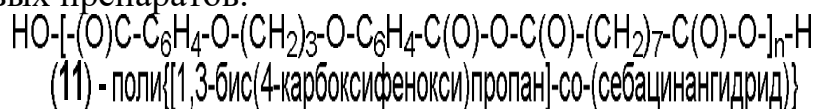
Подобные полимеры обладают достаточной биосовместимостью и биоразлагаемостью.

Высокой проницаемостью для ряда ЛВ матрицей может также служить поликапролактон (ПКЛ, 10):



Нетоксичный полиэфир (10) получают поликонденсацией бгидроксикапроновой (6-гидроксигексановой) кислоты. Обычно гидролазы постепенно расщепляют эфирные связи в опорожнённой от ЛВ полигидроксикислотной матрице, и полимер затем метаболизируется иммунной системой.

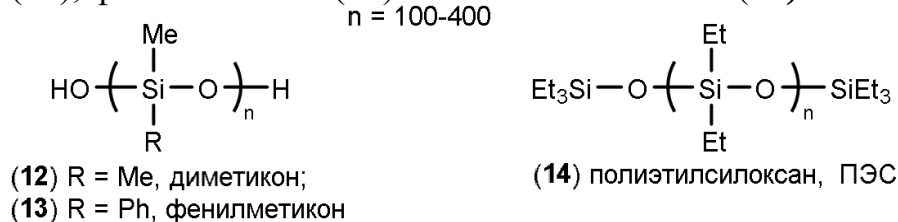
На основе дикарбоновых кислот алифатического ряда (например, себаценовой и фумаровой кислот) и ароматического ряда (например, терефталевая или 4-гидроксibenзойная кислоты) синтезируют их *полиангидриды*, которые хорошо биосовместимы и биоразлагаемы в физиологических условиях. Их часто применяют для изготовления матриц-носителей ЛВ. Ниже приведена структура смешанного полиангидрида (11), в состав которого входит себаценовая кислота (4 части), *пара*-гидроксibenзойная кислота (1,4 части) и 1,3дигидроксипропан (0,7 части). Этот сополимер используют в виде имплантов для адресной доставки противораковых препаратов.



Полиортоэфиры (ПОЭ) также широко применяют для создания устройств адресной доставки ЛВ и пролонгирования их действия.

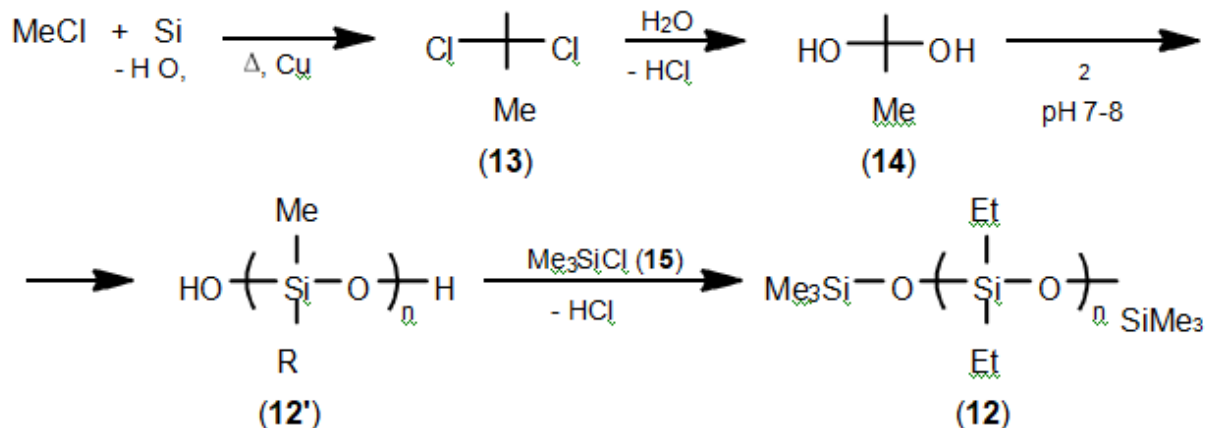
Устройства на основе ПОЭ легко высвобождают ЛВ из матрицы в районе биомишени. Выделение ЛВ происходит в основном благодаря диффузии и сравнительно лёгкой химической и ферментативной «эрозии» (гидролиза) этих полимеров в присутствии воды. Нестабильность полиортоэфиров в кислой среде позволяет разрабатывать носители ЛВ с высвобождением ЛВ, контролируемым изменением pH.

Полиорганосилоксаны (силиконы). Поли(диалкил)силоксановые каучуки общей формулы $\text{HO}-[\text{S}(\text{R}_2)-\text{O}]_n-\text{H}$ довольно широко применяются для формирования наноматриц, поскольку обладают хорошей гидрофильностью, эмульгирующей и стабилизирующей эмульсии способностью, имеют свойства регуляторов вязкости и плёнокообразователей. Силиконовые импланты, содержащие нанолечения, проявили себя как эффективные устройства точечной и долговременной контролируемой доставки ЛВ в больной орган, особенно в область постоперационных ранений. Наибольшую популярность при составлении косметических или лекарственных наноконпозиций приобрели полидиметилсилоксаны диметикон (12), фенилметикон (13) и полиэтилсилоксан (14):

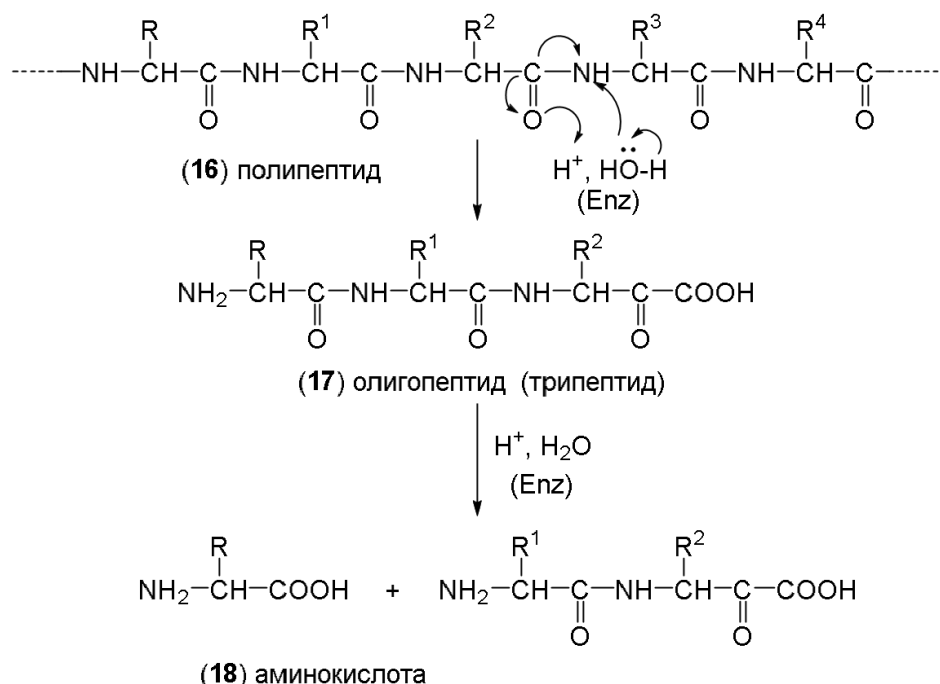


Ниже представлена схема синтеза диметикона (12), содержащего концевые триметилсилильные группировки. На первой стадии проводят синтез основного исходного (13), для чего в автоклаве нагревают

метилхлорид с кристаллическим кремнием. Затем полученный диметилдихлорсилан (13) гидролизуют до дигидроксисилана (14), который самопроизвольно поликонденсируется до полимера (12'). Концевые гидроксильные группы в последнем этерефицируют монохлортриметилсиланом (15)

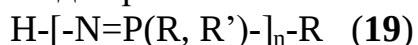


Альбумины и желатины. Белковые альбуминовые и желатиновые матрицы часто используют для создания микро- и субмикросферных устройств селективного переноса ЛВ. Желатин представляет собой смесь полипептидов (с ММ 50-70 тыс.). В его состав входят 18 аминокислот (глицин – до 31%, пролин – до 18%, гидроксипролин – до 15%, глутаминовая кислота – до 12%, аланин – до 11%, аргинин – до 9% и аспарагиновая кислота – до 7%). Желатин получают из коллагена (греч. *колла* – клей) – самого распространённого в животном мире белка, содержащегося в костях, связках, хрящах и коже животных, откуда его выделяют, растворяя в кислотах или щелочах, так как в воде он нерастворим. Коллаген, подверженный такой обработке при нагревании расщепляется. Его молекула, состоявшая из трёх α-цепей (с ММ по 100 тысяч дальтон каждая) гидролизуеться и превращается в смесь полипептидных цепей желатина. При ферментативном гидролизе (гидролазами и протеиназами) белков полипептидная цепь (16) разрывается по связи С-N пептидного (амидного) фрагмента O=C-NH, а к образовавшимся остаткам присоединяются элементы воды. В результате гигантские полимерные (полиамидные) молекулы белков превращаются сначала в менее высокомолекулярные фрагменты, а затем в так называемые олигомерные пептиды (например, 17) с малой степенью полимеризации n = 2-20, и, наконец, в индивидуальные аминокислоты (18). Аналогично происходит и химический гидролиз, который обычно проводят в кислой среде при нагревании.



В желатине, полученном гидролизом в присутствии щёлочи, большая часть амидных групп остатков аспарагина и глутамина гидролизуется до свободных карбоксильных групп. В условиях кислотного гидролиза этого не происходит – амидные группы не затрагиваются. Этот эффект расширяет ассортимент ЛВ, которые могут быть связанными с желатиновой матрицей значительно большим набором связей. Желатин способен растворяться в тёплой (40°C) воде, её солевых и сахарных растворах, образуя золи (жидкие коллоидные системы). При охлаждении золи становятся вязкими и переходят в гели (студенистые системы) за счёт формирования трёхмерных структур, в которых полипептиды имеют спиральную форму, стабилизированную водородными связями, с многократно повторяющимся триплетом аминокислот: глицин-АК_x-АК_y). В желатиновые гели иногда заключают ЛВ, капсулированные в липосомы. Высвобождение ЛВ из желатиновой матрицы можно регулировать, используя химическую сшивку глутаровым ангидридом.

Полифосфазены. Из других гетероцепных полимеров, нашедших некоторое важное применение в качестве нанопереносчиков ЛВ, следует отметить полифосфазены (19). При их синтезе используют на первой стадии гсахлорзамещённый циклический трифосфатриазин. При его дециклизации образуется мономерное линейное дихлорфосфазеновое звено, которое затем полимеризуется в линейные неорганические поли(дихлор)фосфазены. В них затем нуклеофильно замещают боковые атомы хлора на различные органические заместители. Подбором боковых заместителей получают полифосфазены (19) с нужным уровнем устойчивости в биологических жидкостях. Их успешно применили для адресной доставки антинеопластиков типа комплексных соединений платины (цисплатин и др.) и метотрексата – антагониста фолиевой кислоты, – который полезен при лечении лейкемии, саркомы и некоторых других видов раковых заболеваний.



R, R' = органические группы

7.4. Нанотехнологии в дизайне устройств для защиты и доставки нанолекарств

Технология изготовления наночастиц ЛВ. Многие ЛВ плохо растворимы в воде и поэтому их доставка к мишени проблематична. В настоящее время для увеличения их растворимости прибегают к тонкому дроблению микроразмерных частиц ЛВ до наноразмерных частиц, что резко увеличивает растворимость этих ЛВ в водных средах. Обычно дробление ЛВ, суспендированного в воде, проводят в присутствии растворённого стабилизатора дисперсий (поверхностноактивного вещества – ПАВ). Процесс ведут в специальных вращающихся мельницах-дробилках, в которых твёрдые ЛВ перемалывают с помощью стальных, фарфоровых, стеклянных или полимерных (полистирольных) шариков или роликов. Измельчение ЛВ до наноразмерных частиц возможно и в струйных мельницах.

Применяют также и «мокрые» методы. Например, растворяют ЛВ в органическом растворителе и затем этот раствор распыляют инертным газом в нагретой трубке или подают его на вращающийся диск. Растворитель при этом испаряется с определённой скоростью и из аэрозоля формируются твёрдые наночастицы ЛВ. Особенно эффективным является использование во втором случае сил центробежного ускорения, что позволяет контролировать размеры образующихся наночастиц простым регулированием скорости вращения диска.

Можно аналогичный подогретый исходный раствор ЛВ распылять газом в горячем водном слое (погружное распыление). Испарение растворителей приводит к суспендированию наночастиц ЛВ, которые затем отделяют и сушат.

Технология создания устройств, содержащих наночастицы ЛВ на полимерных носителях. В настоящее время в нанотехнологиях получения полимерных матриц, несущих растворённые, адсорбированные и/или диспергированные наночастицы ЛВ, широко используют следующие два метода. Первый метод их производства заключается в растворении ЛВ в сверхкритической жидкости-растворителе (например, в диоксиде углерода) при низких температурах и высоком давлении. Подобный растворитель обладает свойствами и жидкости (у него сохраняется высокая плотность, как у жидкости) и газа (свойственная газам малая вязкость и высокая сжимаемость). Затем в этот раствор помещают полимерные гранулы, которые насыщаются диоксидом углерода и ЛВ. При последующем понижении давления в полимерных гранулах образуется система связанных пор, заполненных газом и ЛВ.

Во втором методе осуществляют формование гранулированных матриц из расплава соответствующего полимера, смешанного с микросферами желатина, которые содержат ЛВ. Эту смесь помещают в тефлоновую пресс-форму, где сначала её нагревают до температуры выше фазового перехода

стеклования выбранного полимера, а затем сдавливают расплав. Слипшиеся компоненты охлаждают и после обработки водой (для удаления желатина) получают пористые гранулы полимерной матрицы, содержащей ЛВ.

Применяют также и другие, менее распространённые методы. Например, первоначально готовят два раствора: 1) раствор соответствующего полимера и ЛВ в органическом растворителе, который должен быть очень хорошо водорастворимым; 2) раствор в воде высаливающего агента и липофильного стабилизатора дисперсии (поверхностно-активного вещества – ПАВ). Затем к интенсивно перемешиваемому водному раствору постепенно добавляют первый раствор (в аппаратах гомогенизаторах). При этом происходит диффузия органического растворителя в водную фазу и образуется стабильная эмульсия *масло в воде*. В мелких капельках масляной фазы концентрируются наночастицы полимера-носителя вместе с ЛВ, чему способствует наличие в воде высаливающего агента. Можно осуществлять образование аналогичных наночастиц и в отсутствие высаливающих агентов. В таких случаях необходима очень быстрая диффузия органического растворителя в водную фазу (например, смешивающийся полностью с водой ацетон). Растворители затем в обоих методах удаляют под вакуумом, а полученные дисперсии концентрируют в центрифугах и отмывают от стабилизаторов и ПАВ.

Достаточно успешно применяют и методы аналогичного эмульгирования, используя органические растворители, которые не растворимы в воде. В этих случаях размеры образующихся масляных капель увеличены и приходится использовать различные дополнительные способы их уменьшения до наноразмерных (применением экструдеров, мембранных фильтров и других аппаратов микро- и нанофлюидизации).

Наноматричные препараты обычно получают в виде наносфер или нанокapsул иных форм субмикронного размера (т. е., менее одного микрона). Наносферы представляют собой однородные сферические (как правило) системы с равномерным распределением (диспергированием) лекарственных наночастиц. Нанокapsулы – это нанососуды, частично или полностью ограниченные полимерной стенкой-плёнкой, в которых заключены частицы наноЛВ. Подобные нанокapsулированные системы ЛВ часто получают методом эмульсионной полимеризации в водной среде. В этом случае готовят водную эмульсию микроразмерных мицелл ПАВ, внутри которых находится водяное ядро, содержащее катализатор полимеризации. Эти мицеллы диспергируют в органической фазе и к полученной микроэмульсии добавляют мономер и ЛВ. На границе раздела фаз происходит полимеризация с образованием частиц полимерного носителя, который содержит наночастицы ЛВ. Этот ансамбль наночастиц затем отделяют, помывают водой для удаления компонентов полимеризации, удаляют остатки растворителя и сушат.

В заключение раздела подчеркнем, что контролируемое выведение активного ЛВ из его матрицы-носителя (устройства) в окружающее пространство осуществляется либо путём диффузии ЛВ через поры

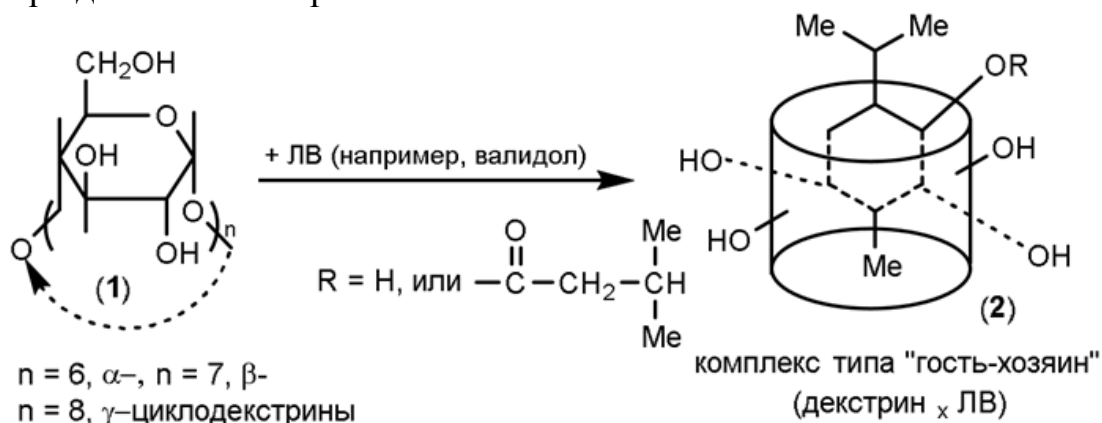
полимерной плёнки матрицы, либо путём выдавливания осмотическим (гидростатическим) давлением через специальное отверстие в стенке устройства или, наконец, путём химической и биохимической эрозии матрицы (в основном благодаря её биоразлагаемости). В некоторых случаях создают устройства, в которых высвобождение ЛВ осуществляется комбинированными механизмами.

7.5 Примеры успешного дизайна лечебных нанопрепаратов

Введение ЛВ в полимере-носителе в виде дисперсии или раствора улучшает АРМЭТ-свойства препарата, значительно пролонгируя его действие и позволяя контролировать его подачу в организм благодаря замедленной диффузии лекарства из наноустройства. В накожных терапевтических системах (аппликаторах *монокристаллического* плёночного типа) используют замедленную диффузию ЛВ из раствора, расположенного между наружной непроницаемой мембраной и внутренней, медленно проницаемой микропористой мембраной, изготовленной, например, из эфиров целлюлозы, декстринов или полипропилена. На основе растворов *тринитроглицерина* в сополимере 2-гидроксиэтановой и 2-гидроксипропановой кислот (ПГМК) получен аппликатор

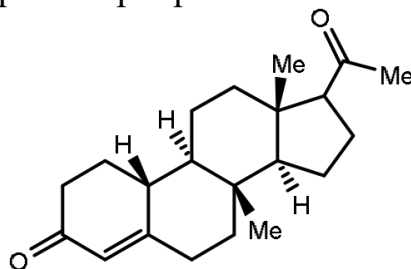
"тринитролонг", прикрепляемый к десне. Он эффективно действует как средство от стенокардии не несколько минут (как в случае приёма обычной микрокапсулы), а уже в течение нескольких часов!

Циклодекстрины (1), олигомерные молекулы которых составлены из α -D-глюкозы с 1,4-связями. С наружной части емкости располагаются гидроксильные (гидрофильные) группы, а внутри формируется гидрофобный карман, в который попадает гидрофобная часть лекарственного вещества (например, *ментол* или *валидол*). В результате возникает супрамолекулярный комплекс ЛВ с водорастворимым «хозяином» (2) и подобный ансамбль быстро доставляется кровотоком к биомишени:



Макромолекулярные наносистемы с растворенными или суспендированными в них ЛВ широко применяются в гинекологической и стоматологической практике. Например, контрацептив *прогестерон* (природный стероидный гормон, 3) или его 17-гидрокси- (или 17-ацетокси)-

10-метилпроизводные (*медроксипрогестерон*), диспергированные в твердом биосовместимом полидиметилсилоксановом каучуке $\text{HO}[-\text{S}(\text{Me}_2)-\text{O}]_n-\text{H}$, помещают в виде силиконового кольца в полость женского организма (противозачаточную «спираль» прикрепляют к шейке матки).

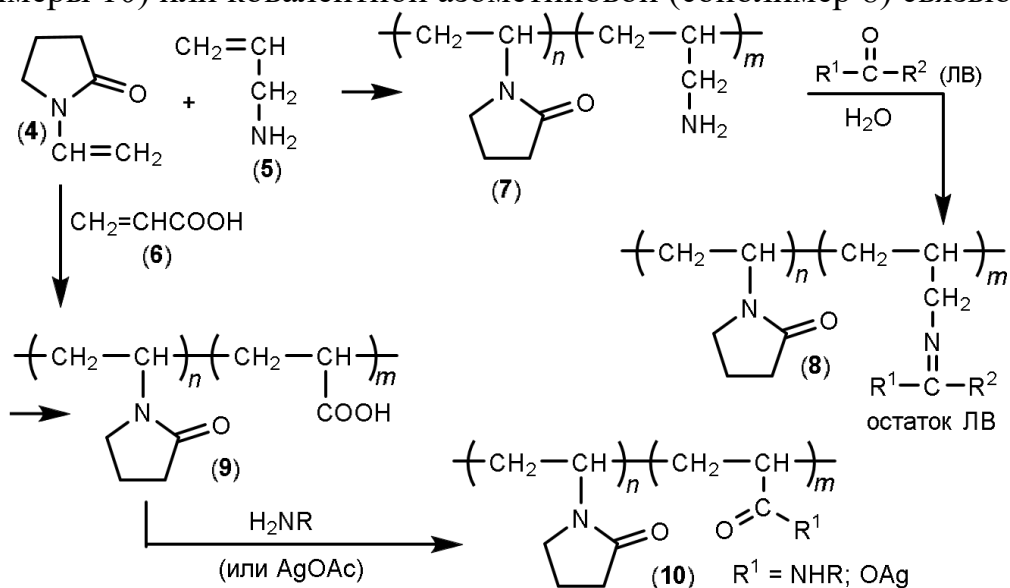


(3)

контрацептив
прогестерон

Этот приём введения обеспечивает в течение года предупреждение нежелательной беременности (поскольку этот гормон очень быстро разлагается при пероральном приеме, ранее использовались его более стабильные, но и более токсичные гидроксипроизводные). В качестве другой полимерной плёнки в матрице-носителе противозачаточного средства используют поликапролактон или сополимер, который получен сополимеризацией этилена с винилацетатом. В последнем случае в условиях применения устройства резервуарного типа (активное вещество помещено в концентрированном виде в середине резервуара, окружённого полимерной микропористой плёнкой-оболочкой) прогестерон диффундирует с постоянной скоростью очень долго – в течение 3-4-х лет.

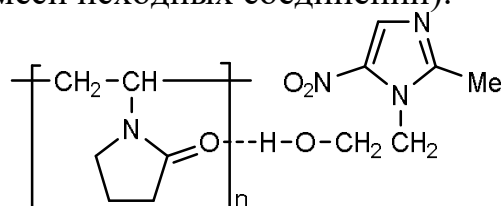
Ведутся работы по созданию водорастворимых нетоксичных сополимеров N-винилпирролидона (4), например, с аллиламином (5) или с акриловой кислотой (6). Наличие в полученных таким образом сополимерах (7) и (9) свободной амино- или карбоксильной группы позволяет затем химически «прививать» к ним различные ЛВ. Например, синтезирована этой основе сополимеры (8) и (10), связанные с ЛВ ионной или амидной связью (сополимеры 10) или ковалентной азометиновой (сополимер 8) связью:



Подобные системы (10) используют для получения антибактериальных средств (когда, например, R' является остатком лекарств *сульфаниламидного* типа) и гемостатических (для остановки раневых и операционных кровотечений) средств пролонгированного действия.

Препараты *пенициллинового* ряда при их пероральном приёме для лечения желудочных инфекций обычно быстро распадаются в кислой среде и теряют свою эффективность. Оптимизация длительности их активности стала возможной после разработки полимерных наноматриц-носителей для этих антибиотиков.

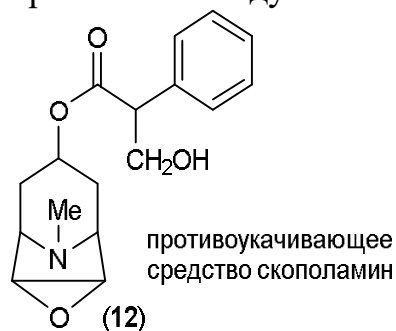
Для повышения эффективности метронидазола в борьбе с анаэробной инфекцией ран был получен его комплекс с (11) с водорастворимой поливинилпирролидоновой матрицей (комплекс образуется при длительном нагревании при 70°C смеси исходных соединений):



(11) n = 100-500, бактерицид метропол

Использование такого антибактериального препарата (*метропола*) позволяет поддерживать лечебную концентрацию активного начала до двух суток (отпадает, таким образом, необходимость 3-кратного введения ЛВ в сутки). Полимерная часть ЛВ играет роль не только депо ЛВ, но и сорбента болезнетворных микроорганизмов. Кроме того, метропол приобретает при этом более выраженное биодействие и расширяется спектр его антибактериального действия. Он начинает подавлять большое число возбудителей гнойных раневых инфекций, в том числе грамотрицательных анаэробных палочек, бацилл, стрептококков, стафилококков).

Трансдермальная система позволяет пролонгированно поставлять обезболивающий препарат *фентанил* [1-фенэтил-4-(Nпропионил-N-фенил)аминопиперидин] через кожу в кровеносную систему для смягчения болевых ощущений онкологической этиологии. Накожные аппликаторы на основе полипропилена применяются для длительной подачи противорвотного, успокаивающего и противоукачивающего средства скополамина (12) при морской или воздушной болезни.



противоукачивающее средство скополамин

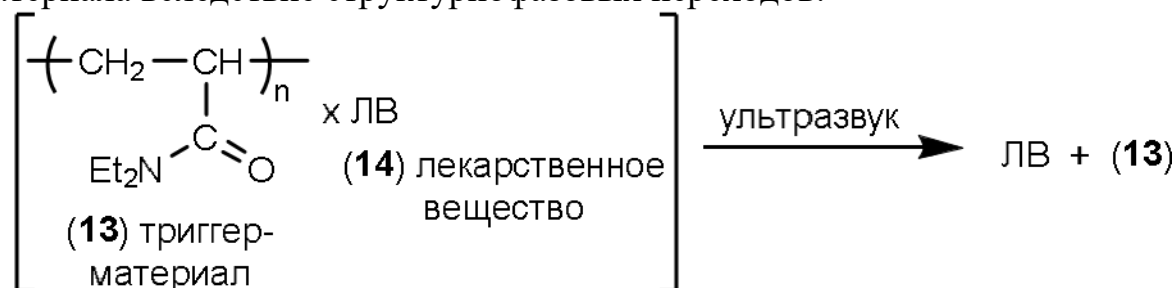
Противотуберкулёзные препараты пиридинового ряда типа *изониазида*, введённые в альгинатные наноносители, продемонстрировали значительное повышение уровня биодоступности при ингаляционной подаче ЛВ.

Показана хорошая эффективность антибактериального средства *ципрофлоксацина* (производное тетрагирохинолина) при его инкапсулировании в наночастицы поли(алкилциано)акрилатах.

Поли(алкилциано)акрилаты нашли довольно широкое применение для контролируемой адресной доставки ЛВ, высвобождаемых диффузными процессами. Их успешно используют для приготовления наноразмерных матриц-носителей многих ЛВ, включая те, которые предназначены для лечения СПИДа.

Для улучшения доставки ЛВ *семейства ацикловира* в очаг инфекции вирусом герпеса, улучшения их биодоступности и пролонгирования действия этих ЛВ созданы кожные наносомальные системы.

Изучаются возможности доставки ЛВ в больные органы в виде биосовместимых полимерных композитов, способных выделять из себя ЛВ под действием тепла. Например, гидрогели (или растворы) ЛВ (14), помещённые в теплочувствительном полидиэтилакриламиде (13) выделяются из него при нагревании низкоэнергетическим ультразвуком. Этот процесс происходит в результате резкого уменьшения в объеме полимерного материала вследствие структурнофазовых переходов:



Тепловой эффект в этом случае является основным фактором воздействия ультразвука на подобные транспортные носители ЛВ, названные триггер-материалами.

Поводятся широкие клинические исследования по использованию магнитоуправляемого транспорта ЛВ в биомишень. Например, создаются липосомы и микрокапсулы, которые кроме ЛВ содержат ультрадисперсные частицы металлов (ферромагнетики Fe, Co, Ni) или коллоидные частицы ферромагнетиков [смесь оксидов Fe(III) с оксидами Ni, Co, Mn, Zn и др., называемых ферритами]. Подобные магнитоуправляемые носители ЛВ позволяют точно доставлять ЛВ к тромбу, опухоли или любому нужному месту в больном организме, воплощая, таким образом, в жизнь идею «магических пуль» и уменьшая побочное токсическое действие лекарства. В случае ферриколлоидов в качестве дисперсионной среды используют или водорастворимые полиэлектролиты, или полимеры с присоединенными к ним лекарствами. В случае микрокапсул применяют дисперсию ЛВ и

ферримагнетиков, например, в белковой (альбуминной) матрице. При этом применяют химическую сшивку или тепловую денатурацию.

7.6 Программа PASS

Общие сведения. Компьютерная система PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) является результатом исследований, которые были начаты В.В. Авидоном в 1974 году. Прогноз в программе PASS основан на анализе взаимосвязей «структура-активность» с использованием обучающей выборки, содержащей большое количество разнородных химических соединений с различными видами биологической активности. Будучи обученной, PASS позволяет прогнозировать спектры биологической активности для новых веществ по их структурным формулам. Версия PASS 1.703 прогнозирует одновременно почти 1000 различных видов биологической активности – основные и побочные фармакологические эффекты, механизмы действия, мутагенность, канцерогенность, тератогенность и эмбриотоксичность.

Точность прогноза PASS зависит от нескольких факторов, но в настоящее время наиболее важным в этом подходе представляется качество обучающей выборки. С точки зрения разработчиков PASS, «идеальная» обучающая выборка должна включать все биологически активные вещества с исчерпывающей информацией об их биологической активности. Другими словами, для каждого вещества должен быть полностью изучен весь спектр биологической активности. На самом деле не существует ни одной базы данных химических соединений, которые были бы исследованы на все виды биологической активности. Поэтому неполнота информации о биологической активности есть общее свойство всех баз данных. Более того, полное экспериментальное исследование принципиально невозможно – для испытания на все известные в настоящее время виды биологической активности всех известных к настоящему времени более 20 млн. веществ (данные cas.org) не хватило бы ресурсов биосферы. Для преодоления этого противоречия в СССР выполнялась государственная программа, в рамках которой в системе Государственной регистрации химических соединений для оптимизации затрат на испытания химических соединений и эффективного выявления наиболее перспективных кандидатов в лекарства было положено начало созданию компьютерной системы. По описанной причине важнейшими требованиями к прогнозу биологической активности химических соединений являются: большое количество и разнообразие прогнозируемых видов биологической активности; использование для прогноза реальной обучающей выборки, далекой по полноте информации от идеальной; способность прогнозировать с приемлемой точностью биологическую активность соединений самых разнообразных химических классов, возможно, даже еще не открытых; использование для прогноза минимальной информации, достаточной для прогноза спектров активности новых и даже еще не синтезированных, а только планируемых к синтезу химических соединений; быстрое действие, позволяющее за приемлемое время

выполнять прогноз и анализ спектров биологической активности сотен тысяч и миллионов химических соединений.

К настоящему времени компьютерная система PASS в значительной степени удовлетворяет этим требованиям.

Основными составляющими компьютерной системы PASS являются: представление биологической активности; описание структуры химических соединений; база данных и знаний взаимосвязей структура-активность – SAR base; алгоритм прогноза спектров биологической активности.

Представление биологических активностей. Биологические активности представлены в PASS качественно в виде спектра биологической активности химического соединения (весь комплекс биологических эффектов, которые вещество способно вызвать при некоторых условиях). При этом авторы PASS следуют «принципу невиновности»: в PASS принимается, что вещество не обладает теми видами биологической активности, которые не указаны в его спектре. Хотя и возможно, что информация о какой-то активности вещества не была найдена в доступных источниках, или оно обладает некоторой биологической активностью, но на эту активность вещество еще не испытывалось.

Необходимо подчеркнуть, что любой способ объективной классификации химических соединений может быть использован для прогноза посредством PASS. Если соответствующие классы действительно определяются особенностями структуры химических соединений, то прогноз принадлежности к этим классам может быть вполне успешным. Например, интервал значений некоторой количественной величины можно рассматривать в PASS как «активность»: если значение величины принадлежит этому интервалу, то вещество «активно», и «неактивно» в иных случаях. Поэтому ясно, что применимость PASS гораздо шире прогноза спектров биологической активности.

Описание химической структуры. В анализе КССА и СС используется множество различных характеристик химических соединений: структурные фрагменты, геометрические и топологические индексы, физико-химические дескрипторы, и т.д. Для разных видов биологической активности в разнообразных рядах химических соединений конкретные дескрипторы оказываются более или менее значимыми в соответствующих уравнениях КССА/СС. При прогнозе одновременно большого количества разнообразных видов биологической активности для разнородных соединений важно использовать такое описание химической структуры, которое обеспечивало бы получение достаточно точных непротиворечивых результатов, но не было бы чувствительно к случайным зависимостям.

Результат воздействия вещества на биологический объект, при прочих равных условиях, определяется структурой его молекул. В зависимости от внешних условий молекула может находиться в различных состояниях. Но все состояния молекулы однозначно связаны между собой, хотя эти зависимости могут быть очень сложными. Поэтому, в принципе, любое состояние молекулы может быть использовано для описания ее структуры.

Основное состояние молекулы без учета внешних полей однозначно определяется минимумом на ППЭ. Поэтому, если не учитывать принципиально неустранимых нулевых колебаний ядер, взаиморасположение в пространстве атомов свободной молекулы в основном состоянии - необходимая (и достаточная) характеристика ее структуры. Однако, ее описание, как показано в главах посвященных CoMFA и MATRIX, требует значительных вычислительных ресурсов для проведения соответствующих квантово-химических расчетов и порождает непростую и еще не решенную проблему полного инвариантного к преобразованиям координат, описания.

С другой стороны, в основе расчетов трехмерной структуры лежит традиционная плоская (2D) структурная формула. С определенной степенью допущения можно сказать, что структурная формула однозначно определяет свойства молекулы. Поэтому в программе PASS в качестве основы для описания структуры химических соединений выбрана структурная формула. Это соответствует задаче прогноза спектров активности новых, не только экспериментально не исследованных, но даже еще не синтезированных, а только планируемых к синтезу, химических соединений. Стереохимические особенности молекул, несмотря на хорошо известную важность для биологической активности в некоторых случаях, например, хиральности, не учитываются. Это обусловлено невозможностью обеспечить полноту стереохимической информации в достаточно большой выборке структур, а также тем, что единой универсальной стереохимической номенклатуры нет, и наиболее адекватным способом представления стереохимической информации является на самом деле пространственная (3D) структура молекул с учетом сказанного выше.

Первоначально в PASS использовался предложенный В.В. Авидоном фрагментарный код суперпозиции подструктур (ФКСП). Суть его состоит в выделении в структуре молекулы значимых с точки зрения биологической активности так называемых дескрипторных центров – гетероатомов с учетом заряда и гибридизации орбиталей, метильных групп, и т.п., – и образовании из них фрагментов в виде пары дескрипторных центров и кратчайшей цепи между ними. В ФКСП есть также циклические дескрипторы в виде характеристики циклов или полициклических систем и входящих в них гетероатомов. Но это описание имеет ряд недостатков.

Как и многие другие дескрипторы, код ФКСП является эвристическим, отражающим скорее абстрагирование структурной химической информации в сознании человека, чем явление биологической активности. Список дескрипторных центров соответствует конкретным представлениям его авторов о лиганд-рецепторных взаимодействиях, которые к тому же не исчерпывают все многообразие взаимодействий химических соединений с биологическими объектами. Многие дескрипторы ФКСП оказываются уникальными – встречаются в единственной структуре, – и поэтому, по существу, бесполезны для прогноза. Некоторые молекулы

описываются двумя-тремя кодами ФКСП, тогда как другие, незначительно отличающиеся от них, - сотнями кодов ФКСП.

Недостатки кода ФКСП, выявившиеся в ходе его использования, было предложено преодолеть с помощью разработки новых структурных дескрипторов. Первоначально эти дескрипторы были названы молекулярным базисом атомных окрестностей, но теперь они известны под названием MNA-дескрипторы (Multilevel Neighborhoods of Atoms) – многоуровневые атомные окрестности.

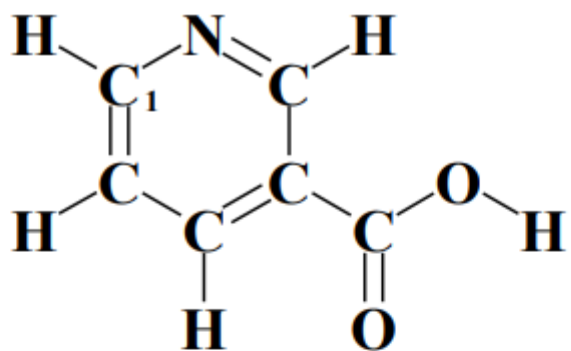
MNA-дескрипторы основаны на представлении структурной формулы, в которой, согласно валентностям и зарядам атомов, явно указаны все водороды, и не учитываются типы связей: природа не знает, что такое столь любимые химиками-профессионалами «стертые водороды», а связи во многих случаях на самом деле должны быть дробными - например, ароматические или в группе NO₂, - можно лишь утверждать, имеется ли между данными двумя атомами достаточно устойчивая химическая связь или нет. В таком виде структурная формула становится однозначной даже формально - она не зависит, например, от альтернативных способов изображения ароматических систем.

На основе описанного представления структурной формулы MNA-дескрипторы для каждого атома молекулы строятся рекурсивно следующим образом: MNA-дескриптор 0-го уровня – метка A самого атома; MNA-дескриптор любого следующего уровня – условное обозначение структурного фрагмента A(D₁D₂..D_i...), где D_i – MNA-дескриптор предыдущего уровня для i-го непосредственного соседа данного атома с меткой A. Дескрипторы соседей D₁D₂..D_i... записываются в каком-нибудь однозначном порядке, например, лексикографическом.

Эта итерационная процедура может быть продолжена до любого уровня. Важно подчеркнуть, что метки атомов могут быть не только соответствующим символьным обозначением согласно таблице Менделеева, но и включать любую дополнительную информацию, например, о принадлежности атома к цепи или к какой-либо циклической системе.

Структура молекулы в PASS версии 1.703 представлена как неповторное множество MNA-дескрипторов 1-го и 2-го уровней. В дескрипторах 2-го уровня используется индикатор "-" для обозначения атомов в цепях.

На рисунке представлена структура никотиновой кислоты:



HC	C(C(CC-H)C(CC-C)-H(C))
HO	C(C(CC-H)C(CN-H)-H(C))
CHCC	C(C(CC-H)C(CN-H)-C(C-O-O))
CHCN	C(C(CC-H)N(CC)-H(C))
CCCC	C(C(CC-C)N(CC)-H(C))
CCOO	N(C(CN-H)C(CN-H))
NCC	-H(C(CC-H))
OHC	-H(C(CN-H))
OC	-H(-O(-H-C))
	-C(C(CC-C)-O(-H-C)-O(-C))
	-O(-H(-O)-C(C-O-O))
	-O(-C(C-O-O))

Для атома C₁ получается следующая последовательность MNA-дескрипторов:

- уровень 0: C
- уровень 1: C(CN-H)
- уровень 2: C(C(CC-H)N(CC)-H(C))
- уровень 3: C(C(C(CC-H)C(CN-H)-H(C))N(C(CN-H)C(CN-H))-H(C(CN-H)))
-

На первый (и не только на первый) взгляд в MNA-дескрипторах нет ничего нового – они похожи на очень многие уже известные структурные дескрипторы. Это не удивительно, поскольку благодаря многолетнему широкому интересу к SAR/QSAR уже предложены многие десятки, если не сотни, классов структурных дескрипторов, - и процесс «придумывания» новых дескрипторов едва ли может быть хотя бы замедлен. Однако история разработки MNA-дескрипторов такова, что поиск основополагающих идей для их конструирования привел к квантовой химии и далее – к теории квантованных полей. Где наиболее удобное полное описание квантовой системы дается ее функцией Грина, которая может быть вычислена в виде суммы ряда, членами которого являются постепенно усложняющиеся комбинации функций Грина взаимодействующих частей системы. Так вот,

каждый MNA-дескриптор строится так же, как соответствующий член разложения в ряд полной функции Грина молекулы по функциям Грина составляющих ее атомов, но отличается тем, что есть лишь последовательность символов, а не сложный математический объект, каковым является квантовая функция Грина. Поэтому MNA-дескрипторы имеют фундаментальную основу и совершенно ясные пути их развития в направлении более полного учета квантово-химического описания структуры молекул, например, перехода к пространственной структуре молекулы при наличии необходимых для этого вычислительных и информационных ресурсов.

Важной особенностью MNA-дескрипторов является их открытость – дескрипторы порождаются на основе структурной формулы, а не на основе какого-либо заранее составленного списка структурных фрагментов. Другая их особенность – сохранение целостности фрагментов структуры в том смысле, что для каждого MNA-дескриптора можно, при некотором навыке, изобразить соответствующий ему фрагмент.

В PASS особое значение имеет понятие эквивалентности структур: структуры считаются эквивалентными, если они описываются одним и тем же множеством MNA-дескрипторов. В обучающую выборку включаются только уникальные структуры. Поскольку MNA-дескрипторы не отражают стереохимических особенностей молекулы, структуры, которые имеют только стереохимические отличия, рассматриваются как эквивалентные.

Обучающая выборка (SAR base). Для прогноза в PASS используется база данных и знаний SAR base, которая создается на основе анализа обучающей выборки (выборок), содержащей структурные формулы и спектры активности биологически активных веществ. SAR base включает в себя словарь названий видов биологической активности, словарь MNA-дескрипторов, базу описаний структур и активностей веществ из обучающей выборки, данные и знания о взаимосвязях «структура - биологическая активность».

Для включения обучающей выборки в SAR base для каждого вещества выборки генерируются MNA-дескрипторы. Если структура молекулы не полностью определена, т.е. содержит неопределенный атом или остаток, то вещество не включается в SAR base. Если в SAR base обнаруживается эквивалентная структура, то существующий спектр активности вещества дополняется новыми активностями. Данные и знания о взаимосвязях «структура – биологическая активность» порождаются в ходе описанной ниже процедуры обучения.

В PASS версии 1.703 SAR base содержит 45660 описаний структуры и спектра активности лекарств, лекарственно подобных и биологически активных веществ. Словарь MNA-дескрипторов содержит 41644 разных дескрипторов 1-го и 2-го уровней.

В разных источниках информации биологические активности веществ описаны неодинаковыми терминами. Поэтому спектры активности в обучающей выборке были стандартизированы и объединены для

эквивалентных веществ из многих источников. Общее количество разных видов биологической активности 1482, но 432 из них представлены менее чем 3-мя соединениями.

По умолчанию список прогнозируемых видов активности содержит 900 названий, средняя точность их прогноза – 85% по скользящему контролю.

Алгоритм прогноза. Главная цель PASS состоит в прогнозе спектров активности именно новых, еще не изученных, веществ. Поэтому общим принципом алгоритма прогноза в PASS является исключение из SAR base вещества со структурой молекулы, эквивалентной структуре молекулы вещества, спектр биологической активности которого прогнозируется. Например, ниже показаны результаты прогноза для никотиновой кислоты, структура которой показана ранее:

21 Substructure Descriptors; 0 new.

Exclude structure with activities:

- Antihypercholesterolemic
- Atherosclerosis treatment
- Cholesterol antagonist
- Cyclic AMP phosphodiesterase stimulant
- Hypolipemic
- Nucleotide metabolism regulator
- Spasmolytic
- Vitamin

334 of 900 Possible Activities at Pa > Pi.

Pa Pi for Activity:

- 0.887 0.007 Lipid metabolism regulator
- 0.814 0.006 Fibrinolytic
- 0.821 0.014 Cholesterol synthesis inhibitor
- 0.813 0.015 Pulmonary hypertension treatment
- 0.793 0.005 Lipoprotein lipase inhibitor
- 0.777 0.007 Cholesterol antagonist
- 0.780 0.016 Vasodilator, peripheral
- 0.752 0.006 Thromboxane B2 antagonist
- 0.747 0.007 Antihypercholesterolemic
- 0.746 0.012 Lysase inhibitor
- 0.742 0.019 Antiseborrheic
- 0.729 0.010 GABA C receptor agonist
- 0.719 0.030 Vascular (periferal) disease treatment
- 0.704 0.019 Atherosclerosis treatment
- 0.701 0.020 Prostatic (benign) hyperplasia treatment
- 0.659 0.007 Keratoses actinic (solar) treatment
- 0.670 0.031 Inflammatory Bowel disease treatment
- 0.660 0.047 Oxidoreductase inhibitor
- 0.593 0.006 Antihyperlipoproteinemic
- 0.605 0.028 Vasodilator
- 0.590 0.013 Antinephritic
- 0.589 0.014 5 Hydroxytryptamine release inhibitor
- 0.670 0.100 Fibrinogen receptor antagonist
- 0.623 0.059 Sickle-cell anemia treatment
- 0.595 0.031 Cytokine modulator

0.605 0.042 Cardiovascular analeptic
0.570 0.010 Vasodilator, cerebral
0.569 0.012 Cystic fibrosis treatment
0.550 0.006 Thromboxane synthase inhibitor
0.546 0.007 Antialcoholic
0.579 0.047 Nucleotide metabolism regulator
0.540 0.013 Histamine release inhibitor

...
0.430 0.109 Antiasthmatic
0.392 0.075 Spasmolytic
0.340 0.023 Acetylcholine nicotinic agonist

...
0.295 0.113 Ligase inhibitor
0.254 0.078 Hypolipemic
0.311 0.136 Vasodilator, coronary

Это вещество найдено в SAR base и исключено из построения прогноза. Известный (в SAR base PASS версии 1.703) спектр активности никотиновой кислоты включает: «Antihypercholesterolemic», «Atherosclerosis treatment», «Cholesterol antagonist», «Cyclic AMP phosphodiesterase stimulant», «Hypolipemic», «Nucleotide metabolism regulator», «Spasmolytic», «Vitamin» (сохранена авторская фармакологическая терминология).

Результат прогноза спектра биологической активности представлен в виде упорядоченного списка вероятностей «быть активным» («to be active») P_a , «быть неактивным» («to be inactive») P_i , и названий соответствующих активностей. Упорядочение выполнено по убыванию разности $P_a - P_i$; таким образом, более вероятные виды активности находятся в начале спрогнозированного спектра. Спектр активности может рассматриваться любым желаемым образом, но по умолчанию в него включаются все активности, для которых $P_a > P_i$. Спрогнозированный спектр активности никотиновой кислоты включает 334 из 900 прогнозируемых видов активности при условии по умолчанию $P_a > P_i$.

Алгоритм прогноза отобран как оптимальный среди исследованных за без малого 10 лет сотен различных вариантов. Он основан на следующих данных о взаимосвязях «структура-активность»:

n - общее количество веществ в SAR base;

n_i - количество веществ, содержащих дескриптор i в описании структуры;

n_k - количество веществ, содержащих активность k в спектре активности;

n_{ik} - количество веществ, содержащих и дескриптор i в описании структуры, и активность k в спектре активности.

Для оценки спектра активности вещества по его структурной формуле вычисляются MNA-дескрипторы. Если в SAR base обнаружена эквивалентная структура, то дальнейшие вычисления проводятся с использованием величин $n-1$, n_i-1 , и, если в спектре активности эквивалентного вещества в SAR base есть активность k , то n_k-1 и $n_{ik}-1$. Все

виды активности прогнозируются независимо друг от друга и для каждой активности k вычисляются следующие начальные оценки вероятности t_k :

$$p_k = n_k/n, \quad S_{0k} = 2 \times p_k - 1,$$

$$p_{ik} = n_{ik}/n_i, \quad S_k = S_{in}(\sum_i Arc)$$

$$t_k = (1 + s_k - s_{0k})/(1 - s_k * s_{0k}))/2$$

суммирование выполняется по MNA-дескрипторам прогнозируемого вещества, найденным в SAR base. В данном случае $n_i > 0$, и m – количество дескрипторов, $p_k = n_k/n$ - оценка априорной вероятности активности k , $p_{ik} = n_{ik}/n_i$ – оценка ловой вероятности активности k при наличии в описании структуры MNA-дескриптора i .

Вероятности P_a и P_i являются функциями начальных оценок t_k и определяются из уравнений:

$$\begin{aligned} A_k(P_a) &= t_k \\ I_k(P_i) &= t_k \end{aligned}$$

где функции A_k , I_k получаются как конечный результат процедуры обучения, которая состоит в следующем.

По SAR base, сформированной на основе обучающей выборки (выборок), вычисляются данные n , n_i , n_k , n_{ik} . Для каждой активности k для каждого соединения p из n_k активных и для каждого q из $n - n_k$ неактивных соединений в SAR base в режиме скользящего контроля с исключением по одному, т.е., после «исключения» этого соединения из SAR base, вычисляются начальные оценки t_{kp} и t_{kq} , соответственно. n_k оценок t_{kp} для активных соединений сортируются по возрастанию; $n - n_k$ оценок t_{kq} для неактивных соединений сортируются по убыванию. Функции A_k , I_k вычисляются как условные ожидания:

$$\begin{aligned} A_k(F) &= \sum_p \Pr(p - 1, n_k - 1, F) \times t_{kp} \\ I_k(F) &= \sum_q \Pr(q - 1, n - n_k - 1, F) \times t_{kq} \end{aligned}$$

где $P_r(m, n, F) = C_n^m F^m (1-F)^{n-m}$ – биномиальное распределение, $C_n^m = n!/(m! * (n - m)!)$ - биномиальные коэффициенты, F принадлежит интервалу $[0,1]$. Ясно, что A_k и I_k являются оценками квантилей распределения начальных оценок. Таким образом, вероятности P_a и P_i являются мерой принадлежности прогнозируемого вещества к подклассам «активных» и «неактивных» веществ, а также, по построению, оценками вероятности ошибок прогноза 1-го и 2-го рода, соответственно. Все эти интерпретации вероятностей P_a и P_i эквивалентны и полезны для анализа результатов прогноза.

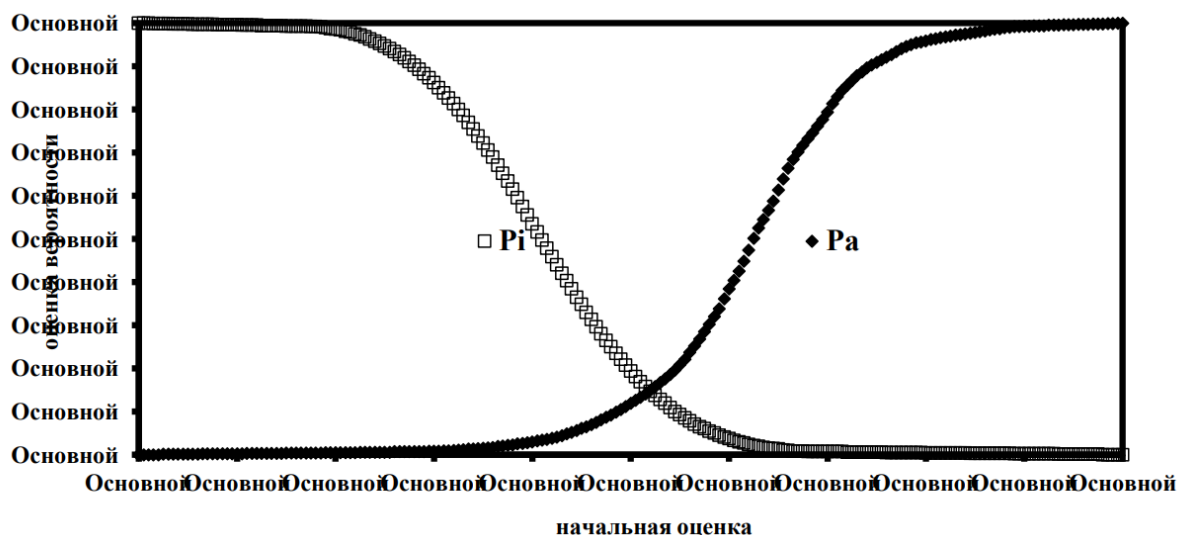


Рисунок 31 Пример оценок вероятностей как функций начальных оценок для активности «Alpha adrenoreceptor antagonist» в SAR base PASS версии 1.703

7.7 Лабораторный практикум

Новокаин (2-(диэтиламино)-этил-4-аминобензоат)

Брутто-формула $C_{13}H_{20}N_2O_2$.

Молекулярная масса 236,35 г/моль.

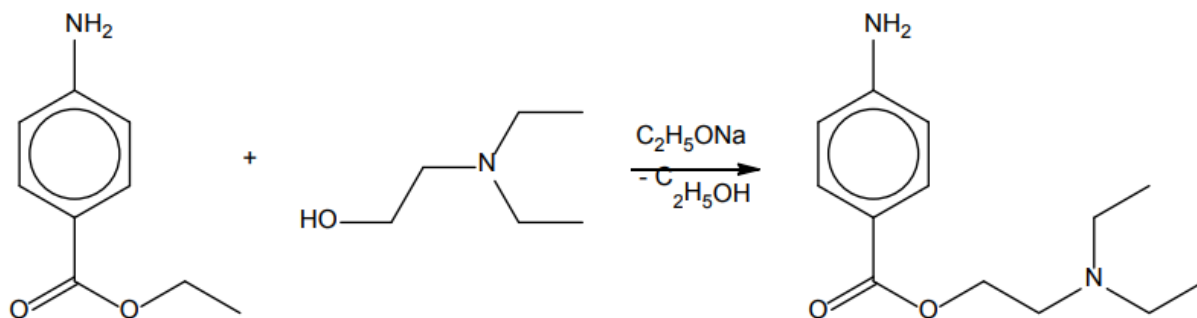
Сведения о препарате

Вещество представляет собой белый порошок без запаха, хорошо растворимый в воде, спирте.

Новокаин (гидрохлорид диметиламиноэтилового эфира п-аминобензойной кислоты) является анестетиком с умеренной активностью. Вещество входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов. Впервые новокаин был синтезирован в 1898 году немецким химиком Альфредом Эйнхорном. Использовался он для замены распространенного в то время анестетика кокаина.

Новокаин получают реакцией переэтерификации этилового эфира п-аминобензойной кислоты β -диэтиламиноэтанолом в присутствии алкоголята натрия.

Схема синтеза



Реактивы

β-Диэтиламиноэтанол	1,6 г
п-Аминобензойная кислота	1,07 г
Натрий металлический	0,001 г
Кислота HCl (конц.)	1,0 мл
Гидроксид натрия	Раствор 20 %-ный
Изопропиловый спирт	10 мл

Методика синтеза

В коническую колбу Вюрца помещают 1,6 г (0,01 моль) 95 % β-диэтиламиноэтанола и 1,07 г (0,01 моль) п-аминобензойной кислоты. Смесь нагревают в вакууме (40 мм) до 70-80 °С. При этой температуре отгоняют примерно 0,2 г β-диэтиламиноэтанола и прибавляют к реакционной массе алкоголята натрия, приготовленный из 0,001 г натрия и 0,05 г β-диэтиламиноэтанола. Наблюдается энергичное протекание реакции с выделением этилового спирта, который быстро отгоняют. Температура реакционной массы поднимается до 90- 100 °С и остаточное давление повышается до 100 мм. Через 30 минут скорость реакции падает, остаточное давление снижается до 60-70 мм. Отгоняют избыточный β-диэтиламиноэтанол при 115-120 °С (40- 50 мм). К остатку прибавляют 15 мл воды и 1 мл концентрированной соляной кислоты (рН 3,0-3,5), затем нейтрализуют 20 %-ным раствором едкого натра до рН 5,5-6,0, прибавляют 2 г гидросульфита натрия и 0,2 г угля, перемешивают 30 минут и фильтруют. К охлажденному раствору при перемешивании приливают 20 %-ного раствора едкого натра до рН 9,5-10,0. Выделившееся основание фильтруют, промывают водой и перекристаллизуют из 10 мл изопропилового спирта. Выход 1,38 г (59 %). Т.пл. 154-156 °С

Примечание

В качестве лекарственного средства используется гидрохлорид β-диэтилового эфира п-аминобензойной кислоты. Для получения соли 1,38 г β-диэтилового эфира п-аминобензойной кислоты растворяют в 15 мл 17 % соляной кислоте. Полученный раствор должен иметь рН 5,5-6,0. В раствор добавляют при 60-65 °С 0,004 г гидросульфита и 0,01 г угля, перемешивают 20 минут и фильтруют. К фильтрату при 45 °С и перемешивании прибавляют 3 мл насыщенного раствора хлористого натрия и охлаждают до 10-12 °С. Выпавший гидрохлорид β-диэтилового эфира п-аминобензойной кислоты отфильтровывают, растворяют в 20 мл воды, водный раствор перемешивают при 60 °С с 0,003 г гидросульфита 0,03 г угля и фильтруют. К раствору прибавляют 10 мл изопропилового спирта и охлаждают при 0-2 °С в течение 7-8 ч. Выпавший осадок фильтруют, промывают 20 мл изопропилового спирта и сушат. Выход составляет 0,98 г (42 %)

Возможно получение новокаина взаимодействием хлорангидрида п-нитробензойной кислоты с β-диэтиламиноэтанолом с последующей обработкой сернистым аммонием или железом в кислой среде. Также новокаин получают прямой этерификацией п-аминобензойной кислоты β-диэтиламиноэтанолом в кислой сред.

Спектральные характеристики

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3), δ , м.д.: 7.74 (д, $J = 8,4$ Гц, 2H, Ph), 6.49 (д, $J = 8,8$ Гц, 2H, Ph), 4.41 (с, 2H, NH_2), 4.24 (т, $J = 8,8$ Гц, 2H, CH_2), 4.18 (т, $J = 6$ Гц, 2H, CH_2), 2.72 (т, $J = 6$ Гц, 2H, CH_2), 2.51 (к, $J = 7,2$ Гц, 2H, CH_2), 0.95 (т, $J = 7,2$ Гц, 3H, CH_3).

Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, CDCl_3), δ , м.д.: 166.81 (C=O), 151.57 (C-N, Ph), 131.54 (Ph), 118.82 (Сипсо (Ph)), 113.54 (Ph), 62.71 (CH_2), 47.67 (CH_2), 51.03 (CH_2), 11.95 (CH_3).

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 3348, 3318, 3208 (NH_2), 2981 (CH_3), 1684 (C=O), 1280 (C–O–C).

Вопросы:

1. Как абсолютизируют растворитель для данного процесса?
2. Приведите основные правила безопасности при работе с оборудованием, работающим при пониженном давлении.
3. Сделайте отнесение сигналов протонов и ароматических углеродов в спектрах ЯМР новокаина и объясните их природу.

Занятие 8.

Тема занятия: Итоговая контрольная работа «Современные исследования в области дизайна лекарственных препаратов для лечения различных заболеваний»

Цель занятия: Изучить современные подходы к дизайну лекарственных веществ природного происхождения для моделирования их биологической активности.

Вопросы к занятию:

1. Этапы создания и лабораторный синтез потенциальных лекарственных препаратов.
2. Первичные этапы биотестирования и доклинические и клинические испытания.
3. Методы анализа органических соединений.
4. Категории чистоты вещества: определение температуры кипения и плавления.
5. Категории чистоты вещества: плотность, показатель преломления; молекулярная рефракция, удельное вращение.
6. Принципы химической модификации для моделирования их биологической активности.
7. Особенности химии ароматических соединений.
8. Создание групп синтетических лекарственных веществ случайными открытиями и аналоговыми синтезами на основе принципа химической модификации
9. Регрессионный анализ
10. Химические особенности гетероциклических соединений
11. Формирование протоарсенала природных лекарственных средств. Лекарственные средства растительного происхождения.
12. Формирование протоарсенала природных лекарственных средств. Лекарственные средства бактериального происхождения.
13. Комбинаторная химия.
14. Ввод химической структуры в программе HyperChem
15. Оптимизация геометрии в программе HyperChem
16. Основные понятия, современная химическая классификация алкалоидов.
17. Химические особенности алкалоидов: хинин.
18. Химические особенности алкалоидов: папаверин
19. Химические особенности алкалоидов: морфин, кодеин
20. Химические особенности алкалоидов: атропин, кокаин

21. Пролекарства. Эмпирические основы их дизайна. Фармакокинетические свойства лидерных молекул (показатели АРМЭТ)
22. Принцип антиметаболитов в умозрительном дизайне ЛП
23. Конформационный анализ в программе HyperChem
24. Особенности конформационного поиска
25. Определение активной группы в семействах биологически активных веществ. Принцип фармакофора. Умозрительный и эмпирический дизайн опиоидных анальгетиков на основе лидера-морфина
26. Химические особенности гликозидов.
27. Распознавание белковыми мишенями лекарственного вещества
28. Дизайн активного центра белка известной структуры
29. Дизайн активного центра белка неизвестной структуры по методу гомологии
30. Дизайн модели всего белка
31. Природные белокобразующие α -аминокислоты
32. Функциональная протеомика.
33. Строение, функции и активные центры ферментов
34. Белковые рецепторы-мишени. Строение и функции
35. Проблема резистентности к лекарственным веществам. Механизмы выработки резистентности к лекарствам
36. Некоторые химические и комбинированные приёмы борьбы с возникающей устойчивостью патогенных микроорганизмов к классическим лекарствам
37. Сравнительный анализ молекулярных полей (САМП)
38. Геномика. Постгеномный этап в создании новых лекарств. Дизайн потенциального лекарственного вещества, взаимодействующего с ДНК-мишенью.
39. Полимерные материалы для создания наноматрицы-носителя лекарственного агента. Их структуры и синтезы
40. Гомоцепные (карбоцепные) полимеры и сополимеры для создания лекарственных наночастиц.
41. Гетероцепные полимерные материалы
42. Нанотехнологии в дизайне устройств для защиты и доставки нанолекарств
43. Примеры успешного дизайна лечебных нанопрепаратов
44. Особенности работы в программе PASS

ЛИТЕРАТУРА

1. Бакибаев А.А., Ляпунова М.В., Мальков В.С. и др. Синтез биологически активных и лекарственных соединений. Учебное пособие. Издательский Дом Томского государственного университета. – 2019. – 49с. ISBN 978-5-94621 -811 -5
2. Погребняк Л.В., Кульгав Е.А., Ковтун Е.В. и др. Цифровая трансформация и искусственный интеллект в разработке биологически активных веществ и лекарственных форм: монография. – Изд-во мир науки. – 2022. – 201с. ISBN 978-5-907603-27-1
3. Рубцов М.В., Байчиков А.Г. Синтетические химико -фармацевтические препараты. М.: Медицина. – 1971. – 326 с.
4. Солдатенков А.Т., Ле Туан Ань, Нгуен Ван Туен и др. Основы дизайна и химии лекарств и их наночастиц. Ханой. Издательство Знания. – 2014. – 280с. ISBN: 978-604-908-955-8
5. Хайрутдинов Ф.Г., Ахтямова З.Г., Головин В.В. и др. Синтез лекарственных веществ: учебно-методическое пособие. Казань: Изд-во КНИТУ, 2014. 136 с.