

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

Національний фармацевтичний університет

фармацевтичний факультет

кафедра медичної хімії

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: **«ВИКОРИСТАННЯ *IN SILICO* ТЕХНОЛОГІЙ ДЛЯ
ОПТИМІЗАЦІЇ ПОШУКУ НОВИХ ГІПОГЛІКЕМІЧНИХ ЗАСОБІВ, ЯК
ІНГІБІТОРІВ ДИПЕПТИДИЛПЕПТИДАЗИ-4 (DPP4)»**

Виконала: здобувачка вищої освіти групи Фм19(4.10д)-06

спеціальності: 226 Фармація, промислова фармація

освітньої програми Фармація

Катерина ШЕКЕРА

Керівник: доцент закладу вищої освіти кафедри

медичної хімії, к.фарм.н., доцент

Маргарита СУЛЕЙМАН

Рецензент: професор закладу вищої освіти

кафедри фармацевтичної хімії, д.фарм.н., професор

Ганна СЕВЕРІНА

Харків – 2024 рік

АНОТАЦІЯ

Робота присвячена використанню *in silico* технологій для оптимізації пошуку нових гіпоглікемічних засобів, як інгібіторів дипептидил пептидази-4 (dpp4). Отримані результати комп'ютерного моделювання *in silico* параметрів свідчать про перспективність подальших синтетичних та фармакологічних досліджень потенційних кандидатів. Робота складається із вступу, трьох розділів, висновків, списку використаної літератури, що включає 48 найменувань. Зміст роботи викладено на 52 сторінках машинописного тексту та містить 8 таблиць та 37 рисунки.

Ключові слова: цукровий діабет, гіпоглікемічна активність, *in silico* методи, ADMET-параметри, дипептидилпептидаза-4 (dpp4), молекулярний докінг.

ANNOTATION

The work is devoted to the use of *in silico* technologies to optimize the search for new hypoglycemic agents, such as dipeptidyl peptidase-4 (dpp4) inhibitors. The obtained results of the *in silico* computer modeling of the parameters indicate the prospects of further synthetic and pharmacological studies of potential candidates. The work consists of an introduction, three chapters, conclusions, a list of used literature, which includes 48 titles. The content of the work is laid out on 52 pages of typewritten text and contains 8 tables and 37 figures.

Key words: diabetes, hypoglycemic activity, *in silico* methods, ADMET parameters, dipeptidyl peptidase-4 (dpp4), molecular docking

ЗМІСТ

	стор.
ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ІНГІБІТОРИ ДИПЕПТИДИЛ ПЕПТИДАМИ 4 ЯК ЕФЕКТИВНІ ГІПОГЛІЦЕМІЧНІ АГЕНТИ: ЕВОЛЮЦІЯ СТВОРЕННЯ ТА ЇХ НОВІ СИНТЕТИЧНІ ГЕТЕРОЦИКЛІЧНІ АНАЛОГИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	7
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 1	30
РОЗДІЛ. 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ТА АРГУМЕНТАЦІЯ ВИБОРУ ОБ'ЄКТІВ І МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	
2.1. Об'єкти досліджень, характеристика структур	31
2.2. Обґрунтування вибору <i>in silico</i> методів для оптимізації пошуку нових структур та кристалографічної моделі для докінгу	34
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 2.....	41
РОЗДІЛ 3. ВИКОРИСТАННЯ <i>IN SILICO</i> ТЕХНОЛОГІЙ ДЛЯ ОПТИМІЗАЦІЇ ПОШУКУ НОВИХ ІНГІБІТОРІВ ДИПЕПТИДИЛ ПЕПТИДАЗИ-4 (DPP4)	
3.1. Розрахунок параметрів «лікоподібності» і ADMET конструйованих структур.....	42
3.2. Молекулярний докінг потенційних інгібіторів дипептидилпептидази-4 (DPP4).....	46
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3.....	51
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ	52
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	54
ДОДАТКИ.....	61

ВСТУП

Актуальність теми. Близько 422 мільйонів людей у всьому світі хворіють на цукровий діабет, більшість із яких проживає в країнах із низьким і середнім рівнем доходу, а 1,5 мільйона смертей щороку безпосередньо пов'язані з діабетом. Як кількість випадків, так і поширеність діабету невинно зростають протягом останніх кількох десятиліть. Найпоширенішим є діабет 2 типу, зазвичай у дорослих, який виникає, коли організм стає стійким до інсуліну або не виробляє достатньо інсуліну. Цукровий діабет в Україні займає 3-тє місце за поширеністю після серцево-судинних хвороб та онкології. До протоколів контролю діабету 2 типу входять більшість пероральних гіпоглікемічних засобів, які посилюють секрецію інсуліну; стимулюють синтез і виділення інсуліну β -клітинами підшлункової залози (препарати сульфанілсечовини і нессульфанілсечовини (глініди)). Постійний прийом таких препаратів може спонукати виснаження β -клітин, що в подальшому може призвести до тяжкої форми діабету. Дипептидилпептидаза-4 (DPP4) стала багатообіцяючим терапевтичним шляхом для лікування діабету 2 типу, оскільки вона регулює гомеостаз глюкози. Інгібітори дипептидилпептидази IV (DPP4) є важливим класом протидіабетичних препаратів, визнаних за їх системну біологічну дію. Головним чинником такої активності є те, що вони пригнічують глюкозозалежну секрецію глюкагону на фоні підвищення рівня глюкози крові. Тому пошук нових гіпоглікемічних агентів, направлених на цю мішень є безперечно актуальним і відповідає всім викликам сьогодення.

Метою дослідження є використання *in silico* технологій для оптимізації пошуку нових гіпоглікемічних засобів, як інгібіторів дипептидил пептидази-4 (dpp4)

Завдання дослідження:

- змодельовати потенційні структури для подальшого вивчення;
- спрогнозувати за допомогою *in silico* методів параметри «лікоподібності» та ADMET;

- провести молекулярний докінг конструйованих молекул до відповідної біологічної мішені згідно обраного напрямку;
- надати рекомендації щодо подальших синтетичних та фармакологічних досліджень.

Об'єкт дослідження. інгібітори DPP4, *in silico* дослідження параметрів «лікоподібності» та ADMET, докінгові дослідження.

Предмет дослідження – прогнозування гострої та хронічної токсичності, фармако-кінетичного профілю, рецепторно-орієнтований гнучкий молекулярний докінг.

Методи дослідження. *In silico* методи параметрів «лікоподібності», токсикологічних та фармакокінетичних параметрів. Молекулярний докінг.

Елементи наукових досліджень. З метою пошуку потенційних інгібіторів DPP4 було згенеровано 4 хімічних структури на основі інгібіторної (R) β-аміноамідної групи, яка містила заміщену похідну піперазин-2-ону або (S)-піролідін-2-карбонітрильний фрагмент і заміщені дифенільні кільця в 4-му положенні β-аміноамідного ланцюга. *In silico* оцінка «лікоподібності» і фармакокінетичного профілю досліджуваної групи сполук показала, що досліджувані сполуки можливо є субстратами/інгібіторами р-глікопротеїну та ізоферменту CYP3A4, що може призвести до проблем з біодоступністю, підвищення ефективності деяких препаратів та може збільшити ризик взаємодії та токсичності. За всіма іншими фармакокінетичними параметрами сполуки мали помірні/середні значення, отже були рекомендовані для подальшого молекулярного докінгу. Згідно прогнозу токсичності, обчислені значення гострої та хронічної токсичності для всіх тестованих сполук є прийнятними, а визначені класи токсичності – 4 і 5, свідчать, що досліджувані молекули є практично не токсичними речовинами. За результатами докінгу досліджувані молекули мали помірну та високу спорідненість до дипептидилпептидази-4. Детальний аналіз утворених комплексів виявив сполуки, які мали спосіб зв'язування, подібний до класичних інгібіторів. Відповідно до розрахункового масиву

значень та аналізу результатів докінгу сполуку 4 було визнано перспективним інгібітором для подальших експериментальних досліджень.

Апробація результатів дослідження та публікації. Результати досліджень були представлені у вигляді тез на XXX міжнародній науково-практичній конференції молодих науковців та студентів «Актуальні питання створення нових лікарських засобів», за результатами конференції було отримано Сертифікат учасника та Диплом II ступеню за участь у секційному засіданні студентського наукового товариства кафедри медичної хімії.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи. Кваліфікаційна робота складається із вступу, огляду літератури, розділу аналітико-дослідницької аргументації об'єктів та методів досліджень, розділу експериментальних досліджень, висновків, списку використаної літератури. Загальний обсяг роботи складає 52 сторінки. Робота ілюстрована 8 таблицями та 37 рисунками. Список використаної літератури складає 48 найменувань.

РОЗДІЛ 1. ІНГІБІТОРИ ДИПЕПТИДИЛ ПЕПТИДАЗИ 4 ЯК ЕФЕКТИВНІ ГІПОГЛІЦЕМІЧНІ АГЕНТИ: ЕВОЛЮЦІЯ СТВОРЕННЯ ТА ЇХ НОВІ СИНТЕТИЧНІ ГЕТЕРОЦИКЛІЧНІ АНАЛОГИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Інгібітори DPP-4 – це клас ліків від діабету 2 типу, які пригнічують фермент дипептидилпептидазу IV (DPP-4). Глюкагоноподібний пептид (GLP-1) і шлунковий інгібиторний поліпептид (GIP) є двома інкретиновими гормонами, що виробляються ендокринними L-клітинами в тонкому кишечнику. GLP-1 і GIP спонукають β -клітини в підшлунковій залозі виділенню інсуліну до стовбура крові та пригнічують вивільнення глюкагону, що спричиняє зниження рівня глюкози в крові. Проте нативний GLP-1 має дуже короткий період напіврозпаду в плазмі ($t_{1/2} = 90$ секунд) і період напіврозпаду GIP 7 хвилин [1]. Фермент дипептидилпептидаза IV (DPP-4) активно руйнував GLP-1, GIP та гормону інкретину при секреції [2, 3].

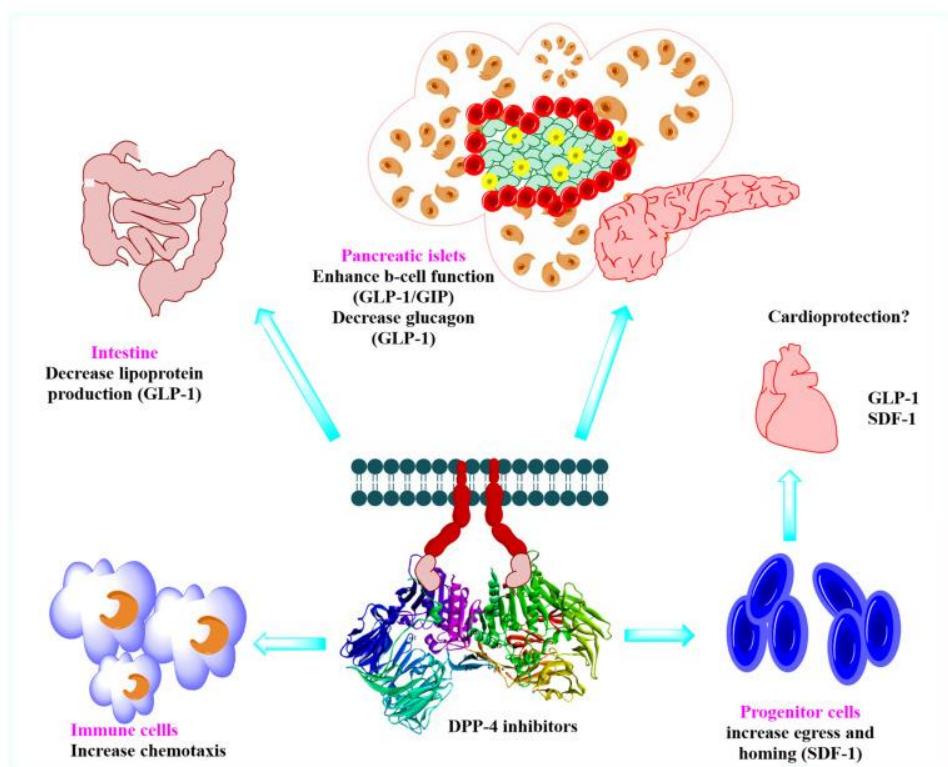


Рис. 1.1. Інгибування активності протеази DPP-4 (PDBID:1X70) за допомогою інгібіторів DPP-4, які також індукують різні біологічні дії в периферичних тканинах.

З цієї причини були синтезовані препарати – інгібітори DPP-4, щоб зупинити деградацію гормону інкретину GLP-1 та GIP, що стимулюватиме підшлункову залозу вивільняти інсулін у кров [4] (рис. 1.1).

Доступні наразі схвалені препарати інгібіторів DPP-4 (рис. 1.2) є алогліптин, гемігліптин, лінагліптин, саксагліптин, ситагліптин і вілдагліптин. Ситагліптин був основним схваленим DPP-4 інгібітором FDA у 2006 році. Вілдагліптин і саксагліптин були схвалені FDA у 2008 та 2009 роках відповідно. Усе це можна додати до інших класів препаратів, таких як метформін, піоглітазон, глібенкламід, воглібоз або інсулін, які підвищують ефективність цих лікарських препаратів. Алогліптин та лінагліптин були схвалені у 2010 та 2011 роках відповідно, тоді як гемігліптин був схвалений у Кореї в 2012 році.

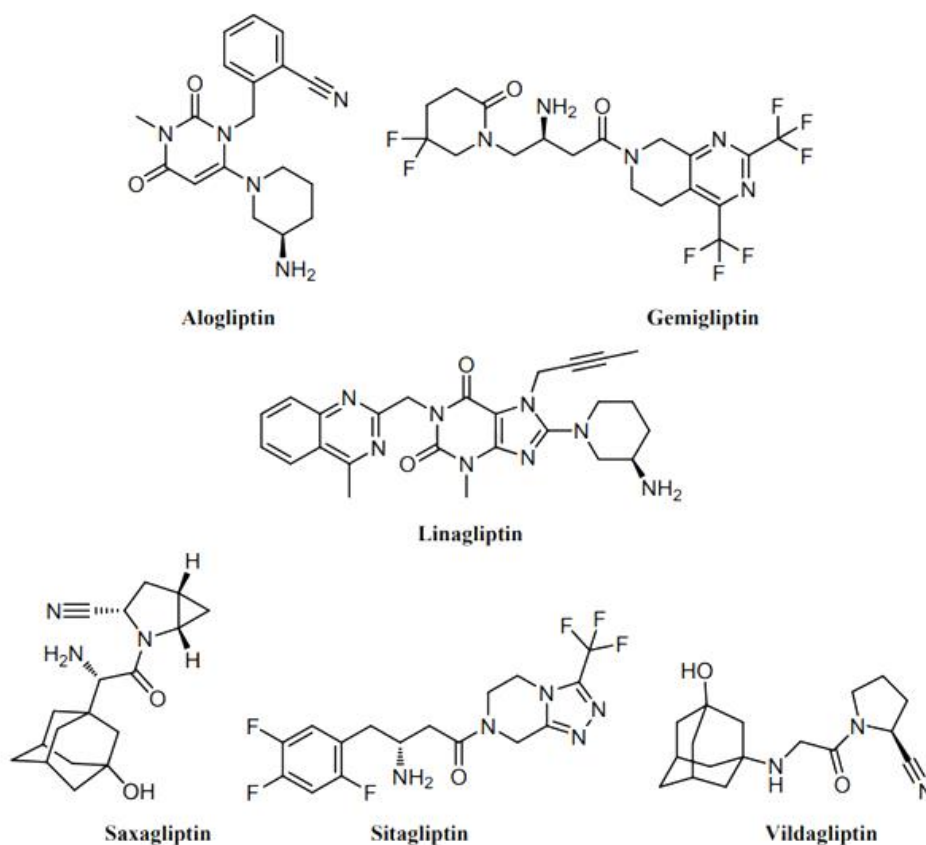


Рис. 1.2. Наявні на даний момент клінічно схвалені інгібітори DPP-4

Усі інгібітори DPP-4 зменшують гіпоглікемію, що викликає серйозне занепокоєння щодо інших класів ліків. Крім того, препарати-інгібітори DPP-4 мають залежну від глюкози подвійну дію на функції α - та β -клітин. Він вивільняє інсулін у кровотік і пригнічує вивільнення глюкагону, що спричиняє зниження рівня глюкози в крові [5]. Основними побічними ефектами цього класу препаратів є назофарингіт, головний біль, нудота, серцева недостатність, надмірна чутливість і шкірні реакції тощо.

Аналіз *in silico* показав, що всі ці стандартні препарати дуже добре зв'язуються із залишками ферменту DPP-4 і займають активний центр ферменту. Ключові взаємодії лінагліптину із залишками активного центру DPP-4 показано на рисунку 1.3, [6], де бут-2-іновий фрагмент імідазольного кільця займає кишеню S1 DPP-4. Крім того, 3-амінопіперидиновий фрагмент лінагліптину займає кишеню S2 ферменту. Лінагліптин утворює різні нековалентні взаємодії, такі як взаємодії водневих зв'язків і гідрофобні взаємодії з активним сайтом залишків DPP-4, як показано на рисунку 1.3.

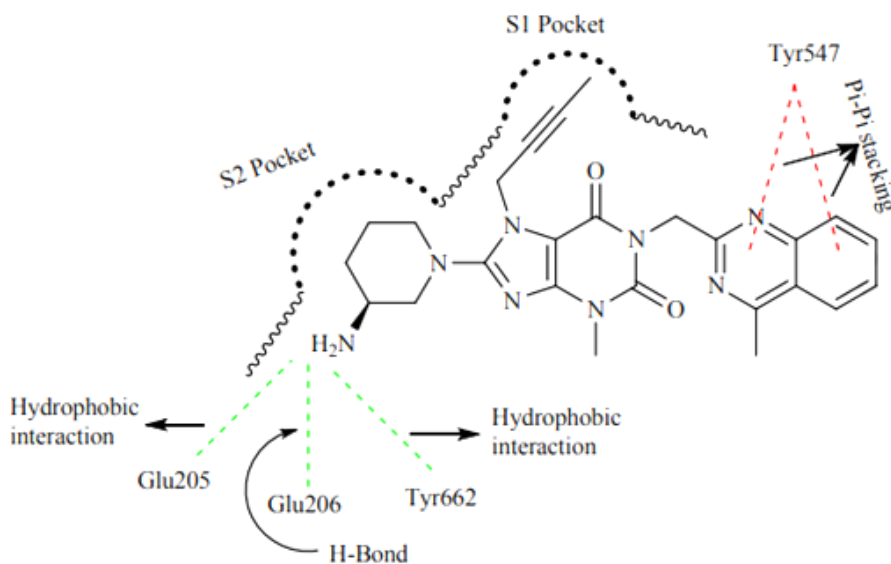


Рис. 1.3. Ключові взаємодії лінагліптину з активним центром DPP-4

Деякі інші інгібітори DPP-4 також доступні на ринку. Деякі з цих препаратів – тенелігліптин, омаригліптин, госогліптин, дутогліптин, евогліптин тощо. Тенелігліптин [7] (рис. 4) був схвалений для використання в Японії в 2012 році, де була завершена фаза 4 клінічних випробувань. Мерк

та інші [8] розробили ще один потужний препарат-інгібітор DPP-4, омаригліптин (рис. 1.4) (Фаза 4 клінічного випробування завершено), який був схвалений для використання в Японії в 2015 році. Евогліптин [9] (рис. 1.4) є іншим потужним препаратом-інгібітором DPP-4, який був схвалений для використання в Південній Кореї в 2015 році. Нещодавно було також завершено клінічне випробування фази 4 для цього препарату (клінічне дослідження ще не розпочало набір учасників). Дутогліптин [10] (рис. 1.4) є ще одним інгібітором DPP-4, про який повідомлялося, але його було припинено після фази 3 клінічних досліджень.

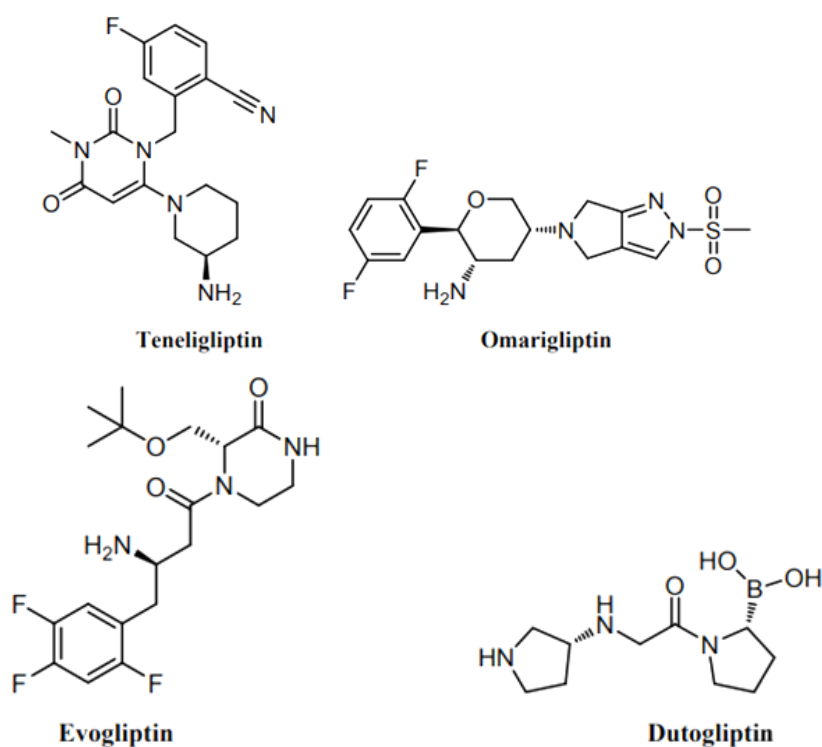


Рис. 1.4. Звітні клінічні агенти інгібітора DPP-4

В роботі [11] повідомили про інший потужний клінічний інгібітор DPP-4 CMD-05, який знаходиться на стадії клінічних випробувань. CMD-05 є структурним препаратом на основі вілдагліптину, значення IC_{50} щодо інгібуючої активності DPP-4 становить 12 нМ, тоді як значення IC_{50} вілдагліптину становить 3,5 нМ. CMD-05 має подібну *in vivo* активність з вілдагліптином і показав, що максимальна толерантна доза у мишей становить 2000 мг/кг; однак він має довший період напіврозпаду та нижчу

цитотоксичність, ніж вілдагліптин. Структура CMD-05 показана на рисунку 1.5, яка подібна до вілдагліптину.

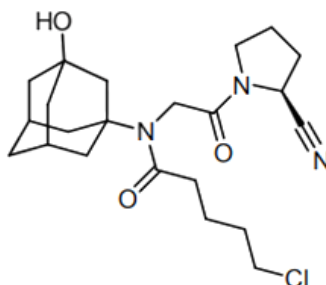


Рис. 1.5. Структура CMD-05

Синтетичні гетероциклічні аналоги як інгібітори DPP-4: похідні піролідину та піролу як потужні інгібітори дипептидилпептидази IV (DPP-IV). Повідомлялося, що піролідиновий каркас є важливим фармакофором для препаратів-інгібіторів DPP-4, а його похідні виявляють потужну інгібіторну дію на DPP-IV. Фукусіма та ін. [12] виявили потужний інгібітор DPP-IV **1.1** ($IC_{50}=4,6$ нМ) (рис. 1.6) з ряду 4-фтор-2-ціанопіролідинів. Дослідження рентгенівської кристалографії пояснили, що 2-гідрокси-1,1-диметилетиловий фрагмент сполуки **1.1** дуже добре вписується в серцевину ферменту, створеного його залишками Phe357, Arg358, Ser201, His126 і Arg358, щоб забезпечити високу спорідненість. У пероральному тесті на толерантність до глюкози у щурів сполука **1.1** значно знижувала рівень глюкози в плазмі при дозі 0,3 мг/кг і майже повністю інгібувала DPP-IV через 15 хвилин після навантаження глюкозою в обох дозах 0,1 і 0,3 мг/кг. Сіль бензолсульфонової кислоти **1.1**, тобто **TS-021**, є потужним і довготривалим інгібітором DPP-IV, а також обрана як кандидат для клінічної розробки ліків. Знову ж таки, Фукусіма та ін. [13] розробили серію 3- або 4-заміщених похідних 2-ціанопіролідинів і перевірені як інгібітори DPP-IV. SAR показало, що 4-фторпохідні були більш потужними, ніж 3-заміщені похідні, і дали позитивні результати тесту на толерантність до глюкози у щурів. Сполука **1.2a** (рис. 1.6) продемонструвала найбільш багатообіцяючу ефективність інгібування DPP-IV зі значенням IC_{50} 0,6 нМ.

Сполука **1.2a** додатково знижувала рівень глюкози в крові щурів Zucker fatty в оральному тесті на толерантність до глюкози. Це відкриття показало, що ця серія може бути представлена модельними сполуками для подальших досліджень як протидіабетичних препаратів.

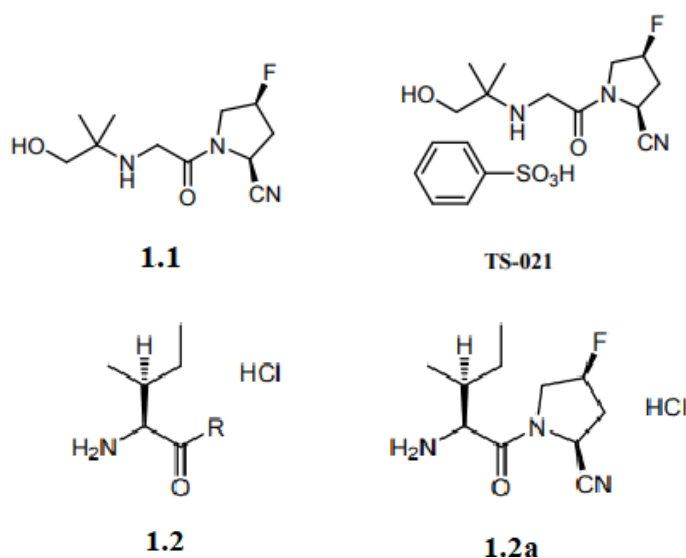


Рис. 1.6. Похідні 4-фтор-2-ціанопіролідину 1.1, TS-021 і 1.2a як потужні інгібітори DPP-IV

Хаффнер і його співробітники [14] виявили серію 2-ціано-4-фтортіоваліл-піролідінів і перевірили їх інгібіторну здатність проти DPP-IV. Сполука **1.3a** (рис. 1.7) виявилася найпотужнішою з серії, а також продемонструвала найдовшу тривалість активності як у щурів, так і собак. У сполуці **1.3a** спостерігається інгібування DPP-4 на рівні 84% при дозі 1 максимально припустимої концентрації (mpk) у щурів протягом 6 годин, а також триває більше 12 годин після дози, яка перевищує IC₅₀ у дозі 0,2 (mpk) у собак. Фармакокінетичний профіль **1.3a** виявився кращим, ніж у інших сполук серії, зі значенням K_i 53 нм. Тому найбільш перспективна сполука з серії **1.3a**, може бути виходом для пошуку нових протидіабетичних препаратів.

Іншу серію аналогів 3-аміно-2-ціанопіролідину синтезували та проаналізували на інгібіторну активність проти DPP-IV Corbett та ін. [15]. SAR продемонстрував, що серед них *m*-бензилзаміщені похідні виявляли потужну інгібуючу активність, де сполука **1.4a** (рис. 1.8) демонструвала

найвищу виміряну ефективність зі значенням IC_{50} 1,3 нМ. Крім того, з'єднання **1.4a** інгібує DPP-4 на 95% у щурів у дозі 5 мг/кг. Встановлено, що зв'язування **1.4a** з білками плазми крові щурів становить 34 %.

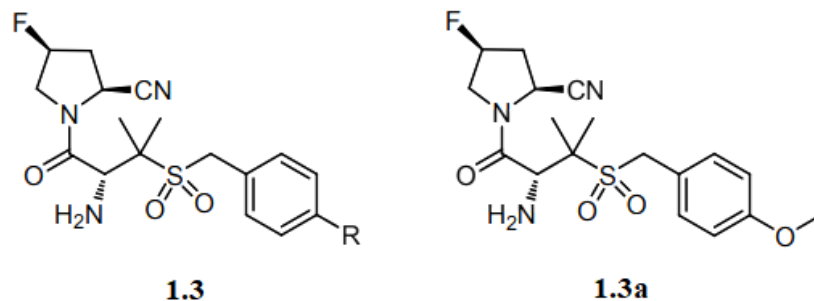


Рис. 1.7. Аналоги на основі тіоваліл-піролідину **1.3 та найпотужніший інгібітор ДПП-IV **1.3a****

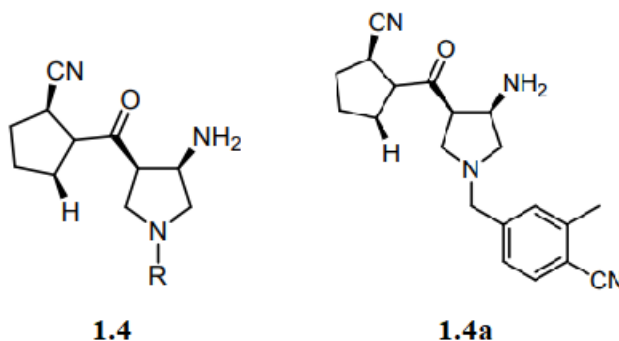


Рис. 1.8. 3-аміно-піролідин аналоги **1.4 і найпотужніший інгібітор ДПП-IV **1.4a****

Кондо та ін. [16] синтезували серію похідних L-пролілпіролідину та оцінили їх як інгібітори DPP-IV. SAR заявив, що сполука **1.5a** (рис. 1.9) діє як провідна сполука (IC_{50} =14 нМ для людського DPP-IV) із серії завдяки своїй сірковмісній гетероароматичній частині.

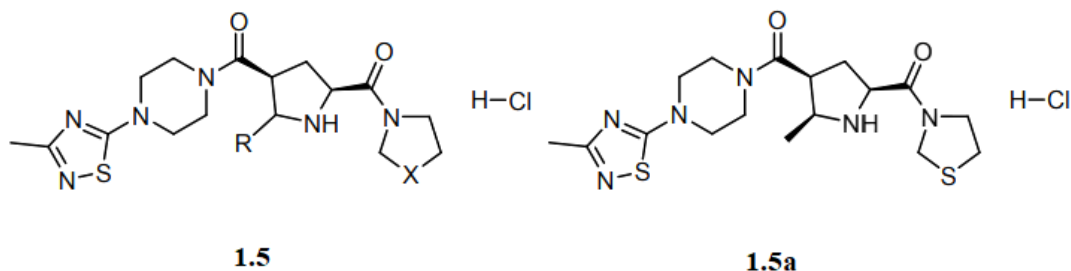


Рис. 1.9. Похідні L-пролілпіролідину **1.5 та найпотужніший інгібітор DPP-IV **1.5a****

Було встановлено, що інгібування DPP-IV у плазмі нормальних щурів для **1.5a** становить 95% при дозі 3 мг/кг протягом 30 хвилин. Сполука **1.5a** також виявилася сильною в плазмі людини, а також у плазмі щурів зі значеннями IC₅₀ 41 і 60 нМ відповідно. Подібним чином Wang та ін. [17] розробили іншу серію похідних імідазолін-2-ціанопіролідину та оцінили їх інгібіторну активність щодо DPP-IV. З цієї серії сполука **1.6a** (рис. 1.10) мала найвищу виміряну інгібіторну активність (IC₅₀=2,0 нМ). Дослідження SAR показали, що введення двох метоксизамісників у фенільному кільці призвело до більшої активності по відношенню до ферменту, як виявлено в сполуці **1.6a**. Потрібні подальші дослідження, щоб зрозуміти більше про цю серію.

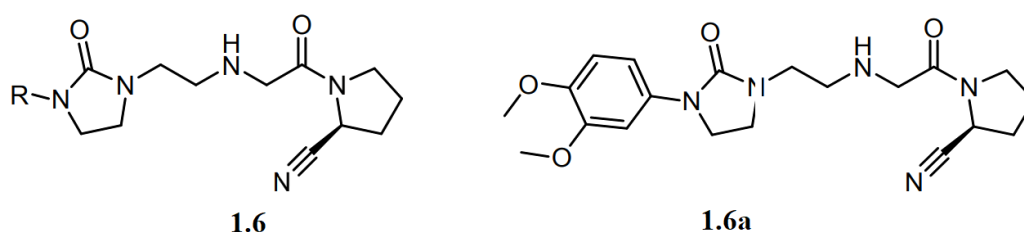


Рис. 1.10. Похідні на основі імідазоліну-2-ціанопіролідину 1.6 та найпотужніший інгібітор DPP-IV 1.6a

Серія гібридів на основі арилциклопропіламіну-2-ціанопіролідину була синтезована Tsai та ін., [18] і перевірена їх інгібуюча активність проти DPP-4. Сполука **1.7a** (рис. 1.11) показала найвищу виміряну ефективність інгібування серед серій (IC₅₀=0,15 мкМ). Дослідження SAR пояснили, що група фтору 2-ціанопіролідину (форма S) посилює ефективність і селективність сполуки **1.7a**.

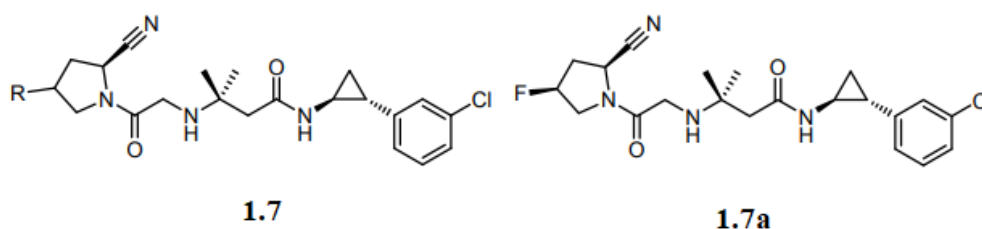


Рис. 1.11. Гібриди на основі арилциклопропіламіну-2-ціанопіролідину 1.7 та найпотужніший інгібітор DPP-IV 1.7a

Сполука **1.7a** також продемонструвала чудові фармакокінетичні профілі у щурів зі значним періодом напіврозпаду ($t_{1/2} = 4,8$ год) і помірною біодоступністю (42%). Дослідження *in vivo* показало, що в пероральному тесті на толерантність до глюкози у мишей **1.7a** значно знижував рівень глюкози в плазмі до 73% при дозі 10 мг/кг.

Синтезовано серію 3-аміно-4-заміщених похідних піролідину та їх інгібіторну активність щодо DPP-4 проаналізували Andrews та ін. [19]. Сполука **1.8a** (рис. 1.12) виявилася однією з найпотужніших серед серії зі значенням $IC_{50} 23 \pm 9$ нМ. SAR виявив, що введення гем-дифторгрупи до лактамної частини збільшило інгібуючу здатність сполуки **1.8a**. Фармакокінетичний параметр сполуки **1.8a** також вивчався при моделюванні дози для людини. Було виявлено, що сполука **1.8a** інгібує DPP-4 до >80% протягом 20 годин у людей у дозі 100 мг/кг. Таким чином, сполука **1.8a** підходить для розробки нових потужних протидіабетичних препаратів.

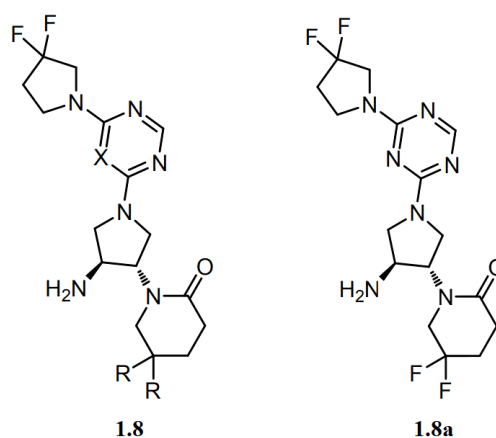


Рис. 1.12. Аналоги 3-аміно-валероктам-піролідинів 1.8 та найпотужніший інгібітор ДПП-IV 1.8a

Ліу та його співробітники [20] синтезували похідні (S)-фенілаланіну з 2-ціанопіролідиною частиною, які були оцінені як інгібітори DPP-4; майже всі похідні показали потужну інгібіторну активність і селективність. Серед серії сполука **1.9a** (рис. 1.13) з малим циклопропіловим кільцем продемонструвала найвищу виміряну ефективність ($IC_{50}=0,247$ мкМ), а також кращу селективність проти DPP-4. SAR заявив, що похідні

фенілаланіну показали кращу інгібіторну активність, ніж похідні аланіну. Крім того, розширення циклопропільного кільця до циклобутового кільця призвело до ефективної втрати активності. Моделювання молекулярного докінгу показало, що 2-ціанопіролідінове кільце **1.9a** займає гідрофобну кишеню S1 ферменту. Карбонільна та аміногрупа [5] утворює взаємодію Н-зв'язку із залишками Asn710, Glu205 та Glu206 відповідно. Атом азоту N-1 триазольного фрагмента **1.9a** утворив додатковий Н-зв'язок із залишком ферменту Arg358, що зробило з'єднання **1.9a** кращим і ефективнішим для інгібування DPP-4.

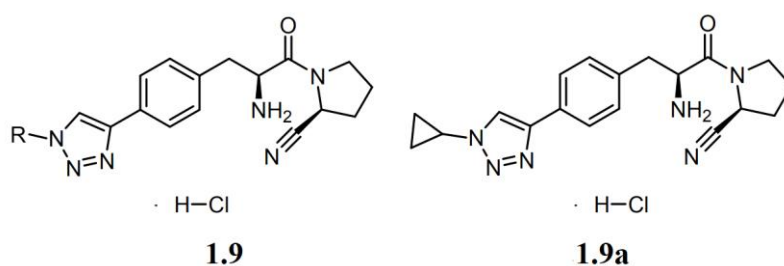


Рис. 1.13. (S)-похідні фенілаланіну з похідними 2-ціанопіролідіну **1.9 та найпотужнішим інгібітором DPP-IV **1.9a****

Лю та його команда [21] синтезували ще одну серію нових похідних бензилфенілаланіну з 2-ціанопіролідіновою частиною, які були оцінені як інгібітори DPP-4; майже всі похідні показали потужну інгібіторну активність і селективність. Серед серії сполука **1.10a** (рис. 1.14) продемонструвала найпотужнішу інгібіторну активність щодо DPP-4 зі значенням IC₅₀ 3,79 нМ, а також кращу селективність проти DPP-4. SAR виявив, що замісники в пара-положенні сполук бензильної групи виявляють більш сильну інгібіторну активність, ніж замісники в орто/мета-положенні. Сполука **1.10a** також значно знизила рівень глюкози в крові в оральному тесті на толерантність до глюкози нормальних щурів Sprague Dawley. Сполука **1.10a** інгібувала індуковане глюкозою підвищення рівня глюкози в крові на 28% при дозі 10 мг/кг. Подальший аналіз сполуки **1.10a** може виявити потенційні інгібітори DPP-4.

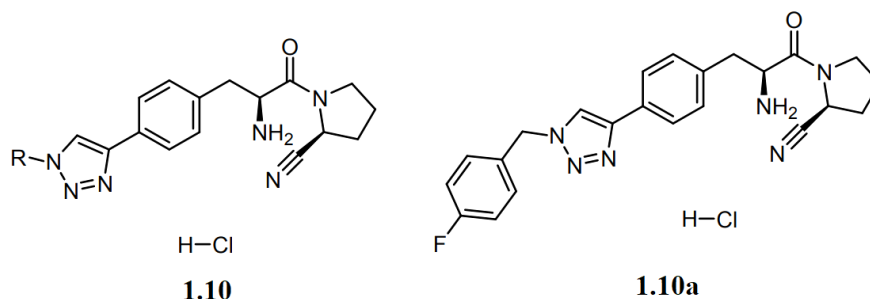


Рис. 1.14. Похідні бензил-фенілаланін-2-ціанопіролідину 1.10 та найпотужніший інгібітор DPP-IV 1.10a

Wang та ін. [22] повідомили про синтез нових карбонітрил-піролідин-2 і 4-аналогів фторпіролідину та вивчив їх інгібіторну здатність проти інгібіторів DPP-4. З цієї серії сполука **1.11a** (рис. 1.15) показала найактивнішу інгібіторну активність щодо DPP-4 ($IC_{50}=0,017$ мкМ), а також показала помірну селективність щодо DPP-4. Сполука **1.11a** додатково знижує рівень глюкози в плазмі до 27,57% при дозі 30 мг/кг у мишей ICR у тестах пероральної стійкості до глюкози. Дослідження SAR показують високу спорідненість зв'язування сполуки **1.11a** з ферментом, де 4-фторпіролідиновий фрагмент займає кишеню S1 ферменту, а атом фтору утворює водневий зв'язок із різними залишками ферменту. Однак введення багатих на електрони та електроноакцепторних груп у параположенні бензольного кільця показало кращу інгібуючу активність DPP-4, але показало низьку селективність щодо ферменту.

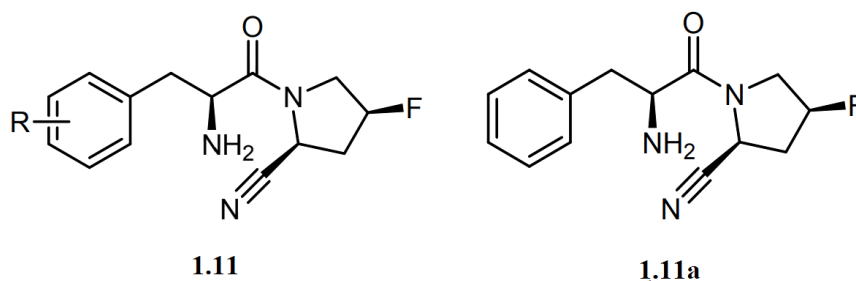


Рис. 1.15. Похідні карбонітрилу 4-фторпіролідину 1.11 та найпотужніший інгібітор DPP-IV 1.11a

В роботі [23] науковці розробили нові похідні α -амінопірол-2-карбонітрилу з гетероароматичними фрагментами та дослідили їх інгібіторну

активність щодо DPP-4. Сполуки **1.12a** і **1.12b** (рис. 1.16) були визначені як найпотужніші інгібітори серії (сполука **1.12a**, $IC_{50} = 0,004$ мкМ; сполука **1.12b**, $IC_{50} = 0,01$ мкМ). SAR заявив, що похідні п-фторпіролідін-2-карбонітрилу (сполука **1.12a** та **1.12b**) демонструють найвищу інгібуючу активність DPP-4. Пірольний 2-карбонітрильний фрагмент цих двох сполук займав гідрофобну кишеню, тоді як карбонільні та α -аміногрупи утворювали взаємодії Н-зв'язку із залишками ферменту. Атом фтору в пірол-2-карбонітрильному фрагменті двох згаданих сполук посилює інгібіторну активність DPP-4, яка може бути пов'язана з водневим зв'язком із залишком ферменту.

Нещодавно нова серія похідних ціанопіролідинів на основі камфори та цистину була синтезована та оцінена як інгібітор DPP-4 Курановим та ін. [24] SAR вказує, що лише ціанопіролідини на основі камфори виявляють інгібіторну активність проти DPP-4. Похідні ціанопіролідину на основі цитизина не показали ефекту ні *in vitro*, ні *in vivo*. З серії камфори сполука **1.13a** (рис. 1.16) продемонструвала найвищу ефективність інгібування зі значенням IC_{50} 1,27 мкМ.

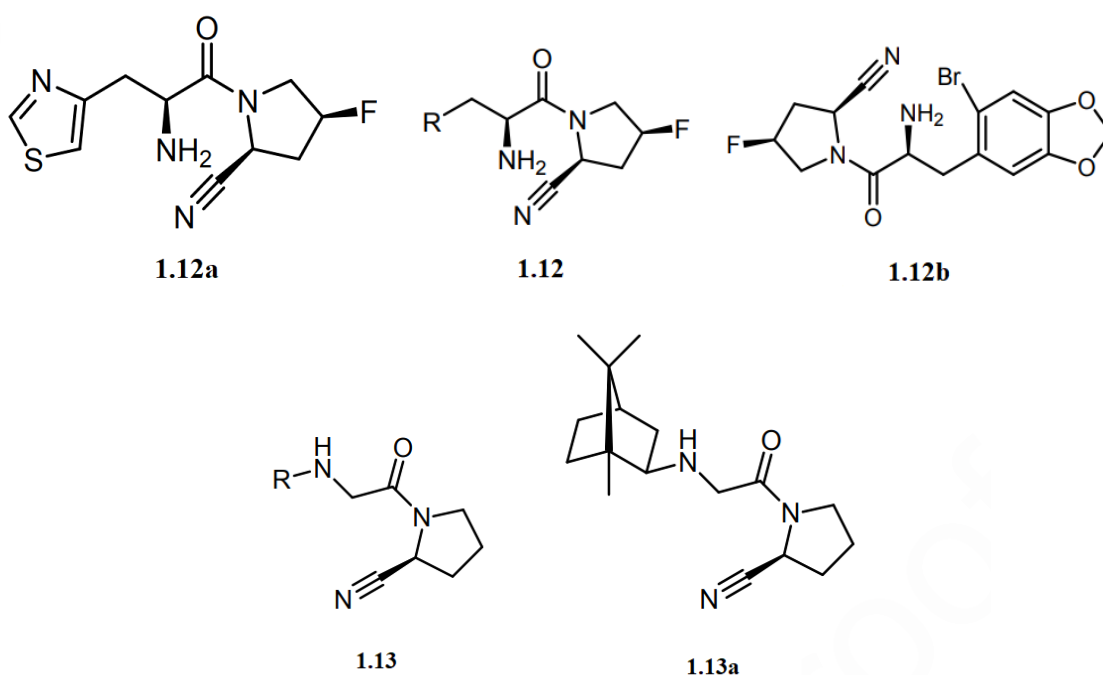


Рис. 1.16. Похідні ціанопіролідину на основі камфори (1.12 і 1.13) і найбільш потужні інгібітори DPP-IV 1.12a, 1.12b і 1.13a

Згідно з результатами *in vivo*, сполука **1.13a** ефективно знижувала рівень глюкози в крові в дозі 10 мг/кг у самців мишей-альбіносів. , що можна порівняти зі стандартним вілдагліптином. Аналіз *in silico* показує, що нітрильна частина сполуки **1.13a** ковалентно взаємодіє із залишками ферменту, тоді як вторинна аміногрупа сполуки **1.13a** утворює сольові містки з різними залишками ферменту. Через ці дві важливі взаємодії сполука **1.13a**, як повідомляється, є найактивнішим інгібітором DPP4 із серії.

Кокс і співавтори [25] створили дві нові серії похідних 5,6,5- і 5,5,6-трициклічних піролідинів проти ферменту DPP-4. Сполука **1.14a** (рис. 1.17), із серії 5,5,6-трициклічних піролідинів, продемонструвала найбільшу ефективність інгібування DPP-4 зі значенням IC₅₀ 0,12 нМ. SAR стверджував, що зміна X=H на X=F демонструє ефективне підвищення ефективності інгібування DDP-8.

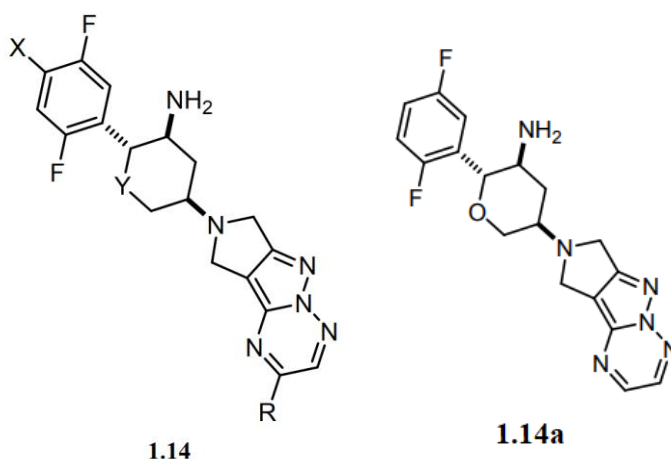


Рис. 1.17. Похідні трициклічного піролідину 1.14 та найпотужніший інгібітор DPP-IV 1.14a

Сполука **1.14a** показала відмінну селективність DPP-8 і FAP (> 250000 разів). Але фармакокінетичний профіль (PK) сполуки **1.14a** був незадовільним, тоді як стандартний омариліптин показав кращий фармакокінетичний профіль.

Іншу нову серію похідних β -амінопірол-2-карбонітрилу підготували та проаналізували Ji та ін. [26] для активності інгібування DPP-4. Сполука **1.15a** (рис. 1.18) з 2,4,5-трифтор групою показала найвищу ефективність серед

серій ($IC_{50}=0,01$ мкМ). Моделювання молекулярного докінгу пояснило, що атом фтору збільшує режими зв'язування сполук шляхом утворення водневого зв'язку із залишками ферменту Ser630. Октагідроциклопента[b]піррол 2-карбонітрильний фрагмент сполуки **1.15a** утворює гідрофобну взаємодію із залишками Phe357, Ser209, Arg125 і займає кишеню S2 ферменту, що підвищує інгібіторну активність сполуки **1.15a** проти DPP-4. Зв'язок-структура (SAR) показав, що похідні октагідроциклопента[b]піррол-2-карбонітрилу не проявляли жодної активності інгібування, коли електронодонорні групи заміщувалися в позиції пара відносно бензольного кільця. Додаткове дослідження цих структур може призвести до розробки потужних протидіабетичних препаратів.

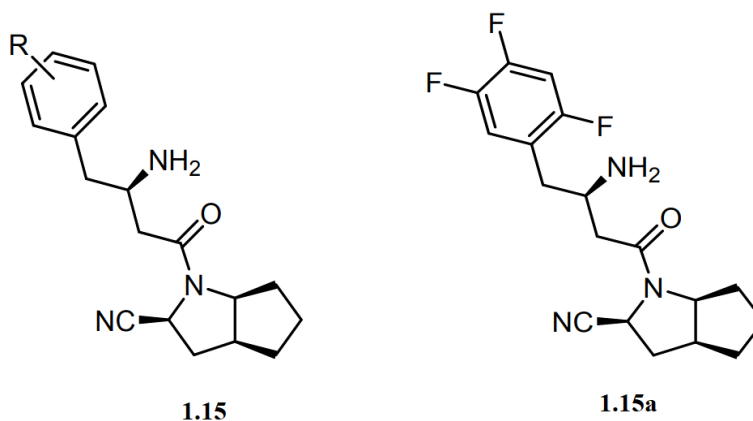


Рис. 1.18. Похідні октагідроциклопента[b]піррол-2-карбонітрилу 1.15 та найпотужніший інгібітор DPP-IV 1.15a

Нові аналоги піролопіримідину були розроблені та їх інгібуюча активність проти ферменту DPP-4 була оцінена в роботі [27]. З серії було показано, що сполука **1.16** (рис. 1.19) є найактивнішим інгібітором DPP-4 зі значенням IC_{50} 1,4 нМ. Сполука **1.16** також вважається потужним інгібітором DPP-8 і DPP-9. Подібним чином науковці [28] також синтезували інший піролопіримідиновий каркас як інгібітор DPP-4, [28] і було виявлено, що сполука **1.17a** (рис. 1.19) із β -заміщеним пірольним кільцем є потужним інгібітором DPP-4 ($IC_{50}=0,76$). нМ, $t_{1/2}$ (щур) = 7,89 год). Повідомляється, що β -заміщення збільшує спорідненість до DPP-4.

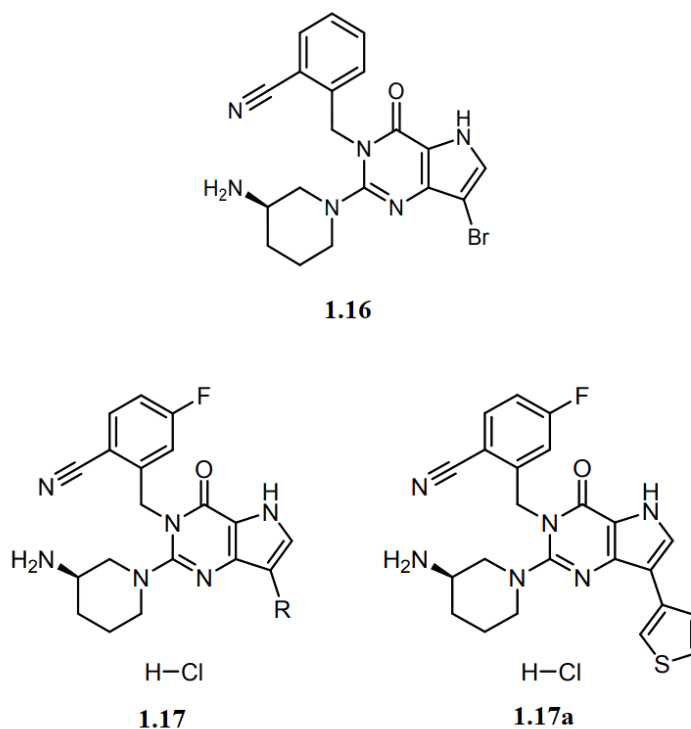
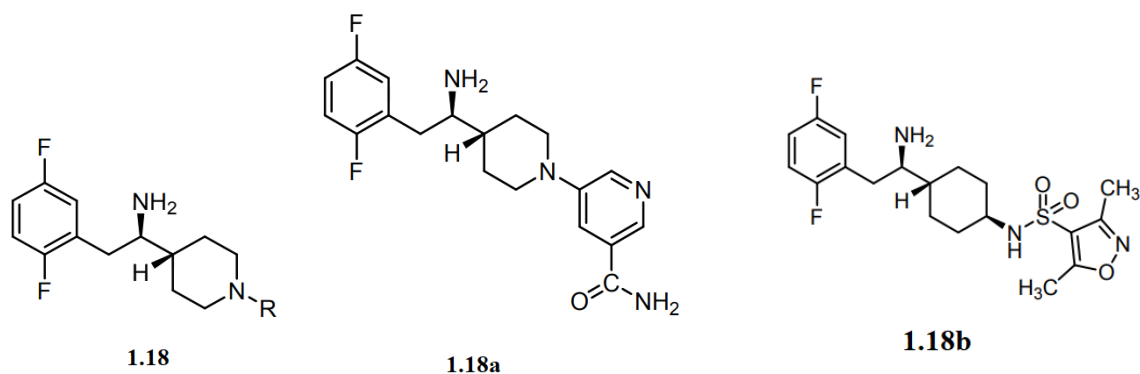


Рис. 1.19. Аналоги піропіримідину 1.16 і 1.17а як потужні інгібітори ДПП-IV

Дослідження SAR показали, що сполука **1.17a** утворює взаємодії водневих зв'язків, взаємодії π -стекингу тощо із залишком ферменту, що збільшує афінність зв'язування сполуки **1.17a** з ферментом. Дослідження *in vivo* показали, що **1.17a** демонструє 28,31% інгібування DPP-4 при дозі 3 мг/кг, тоді як стандартний трелагліптин демонструє 21,75% інгібування при тій же дозі у щурів. Подальше дослідження цих сполук може призвести до нових потужних протидіабетичних препаратів.

Піперидин і похідні на основі піримідину як потужні інгібітори DPP-4. Синтики [29] синтезували два ряди 4-заміщених похідних циклогексану та 4-заміщені похідні піперидину та вивчили їх інгібіторну активність щодо ДПП-4. SAR виявив, що з ряду 4-заміщених піперидинів похідна 3-(5-амінокарбонілпіридил) сполука **1.18a** (рис. 1.20) показала найсильнішу інгібуючу активність ($IC_{50}=0,018$ мкМ) порівняно зі стандартним ситагліптином ($IC_{50}=0,018$ мкМ).



**Рис. 1.20. Похідні піперидину 1.18 і найпотужніші інгібітори ДПП-IV
1.18a і 1.18b**

Амідна група сполуки **1.18a** посилює афінність зв'язування з ферментами. З аналогів циклогексану сполука **1.18b** (рис. 1.20) мала найвищу інгібуючу активність і селективність із значенням IC_{50} 0,055 мкМ. Фармакокінетичні дослідження показали, що сполука **1.18b** має помірний період напіввиведення (3,0 години) і біодоступність при пероральному прийомі (2,2 % F).

Сульфонамідні похідні піролідинового та піперидинового рядів синтезовані Sharma та ін. [30] як інгібітори DPP-4, а сполука **1.19a** (рис. 1.21) продемонструвала найбільшу інгібуючу дію зі значенням IC_{50} 41,17 нМ, що є більш потужним, ніж стандартний відагліптин. Силікоаналіз показав, що сполука **1.19a** має кращу афінність зв'язування (-7,4 ккал/моль) з ферментом DPP-4, ніж стандартний відагліптин (-6,7 ккал/моль). При концентрації 2 мкМ сполука **1.19a** продемонструвала 59,17 % інгібування DPP-4, тоді як стандартний відагліптин показав 93,62 %. SAR стверджував, що присутність нітрильної функціональної групи в ділянці P1 відповідає за потужну діяльність. З цього дослідження можна зробити висновок, що сульфонамідні похідні піролідину та піперидиновий ряд є потужними інгібіторами DPP-4; подальше дослідження цих каркасів може призвести до розробки нових потужних протидіабетичних препаратів.

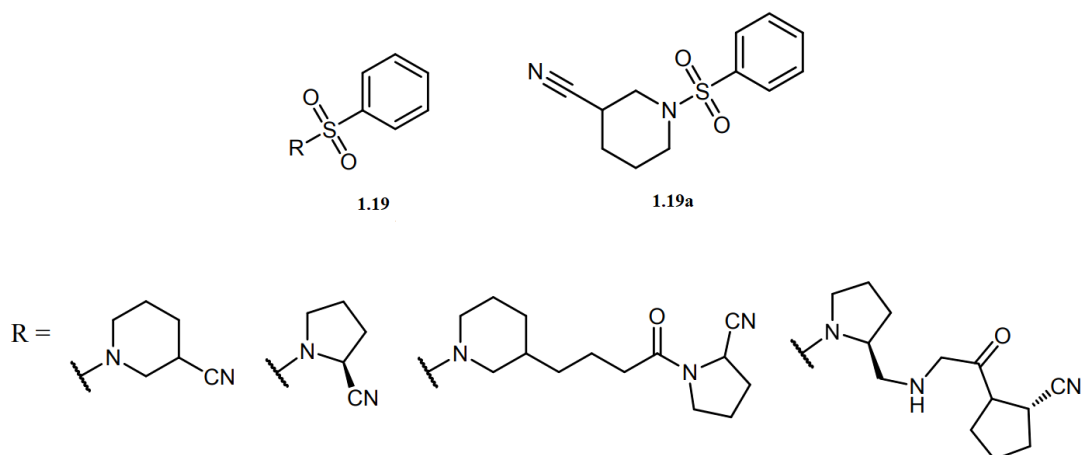


Рис 1.21. Похідні сульфонамідів-піперидину 1.19 та найпотужніший інгібітор DPP-IV 1.19a

Ряд похідних метил-пурин-2,6-діон-піперидину з карбоксибензильними та 2-хлоро/ціанобензильними замісниками були синтезовані як інгібітори DPP-4 Мо та ін.; [31] було виявлено, що сполука **1.20a** (рис. 1.22) дає інгібіторну активність ($IC_{50} = 36$ нМ), порівнянну зі стандартним препаратом ситагліптин. Дослідження SAR показали, що введення карбоксильної групи до фенільного кільця ядра 3-метил-3,7-дигідро-пурин-2,6-діону покращує активність сполуки **1.20a**. Дослідження *in vivo* показали, що сполука **1.20a** показала 82,2% інгібування DPP-4 у концентрації 10 мкМ.

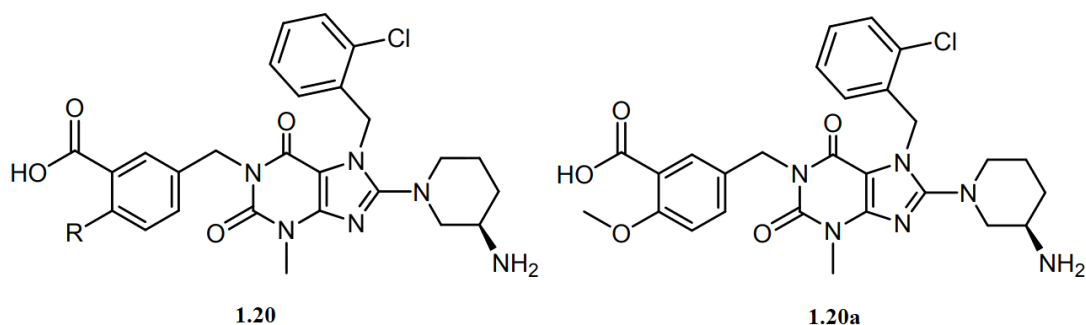


Рис. 1.22. Метил-пурин-2,6-діон-піперидинові похідні 1.20 та найпотужніший інгібітор DPP-IV 1.20a

В статті [32] описана розробка нової серії похідних піримідиндіону та вивчено їхню інгібіторну дію проти DPP-4. З цієї серії сполука **1.21a** (рис. 1.23) показав найпотужніше інгібування DPP-4 з IC_{50} 64,47 нМ.

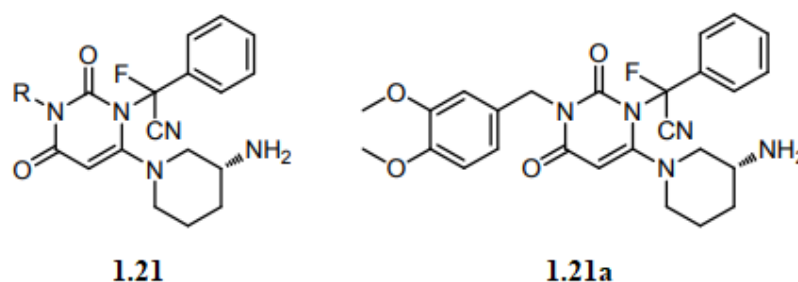


Рис. 1.23. Похідні піримідиніону 1.21 і найпотужніший інгібітор DPP-IV 1.21a

Дослідження SAR показали, що присутність фторціанобензильного фрагмента є дуже важливою для потужного інгібування, тоді як присутність атомів бром у на фенільному кільці призвела до зниження активності для цього класу сполук. Фторціанобензильний фрагмент також бере участь у водневому зв'язку з Arg125. π - π Стекінг-взаємодії також спостерігаються зі сполукою **1.21a**, що посилює афінність зв'язування з білком. Це дослідження показало, що **1.21a** є перспективним інгібітором DPP-4.

Скаффолди на основі тiazолідину як потужні інгібітори DPP-4. Повідомлялося, що каркаси на основі тiazолідину є важливими фармакофорами для інгібіторів DPP-4. Нові аналоги L-проліл піперазиніл-тiazолідинів, синтезовані Yoshida та ін. [33] було перевірено на інгібіторну здатність DPP-4. Сполука **1.22a** (рис. 1.24) продемонструвала найвищу інгібуючу дію ($IC_{50}=0,92$ нмоль/л у людини) у серії. Аналіз SAR також був проведений для цих сполук і показав, що 5-нітро-2-піридиновий фрагмент сполуки **1.22a** підходить для ефективного зв'язування з ферментом. Крім того, 4-ціаногрупа в піридиновому кільці також виявила потужну інгібіторну активність. Дослідження *in vivo* продемонстрували, що сполука **1.22a** показала 60% інгібування DPP-4 у плазмі у щурів Wistar при дозі 10 мкмоль/кг протягом 9 годин.

Знову ж таки, Yoshida та його колеги [34] повідомили про синтез іншої серії L-пролілтiazолідинів із конденсованим біциклічним гетероарилпіперазиновим замісником і оцінили їх як інгібітори DPP-4.

Сполука **1.23a** (рис. 1.24) продемонструвала найпотужніше та тривале інгібування ($IC_{50}=0,37$ нМ) серед серій. Аналіз *in vivo* показав, що сполука **1.23a** знижувала більш ніж 40% DPP-4 у плазмі при дозі 3 мкмоль/кг у щурів Вістар протягом 24 годин. SAR заявив, що аналоги 4-хінолілу показали кращу інгібіторну активність, ніж аналоги 2-хінолілу. Заміна трифторметильної групи на метильну показала втрату активності. Рентгенівська кристалічна структура пояснює, що сполука **1.23a** також утворює гідрофобні взаємодії, водневі зв'язки та взаємодії СН- π із залишком ферменту, що підвищує селективність, а також інгібіторну активність проти DPP-4. Таким чином, сполуки **1.22a** і **1.23a** можуть бути модельними сполуками для розробки потужних протидіабетичних препаратів.

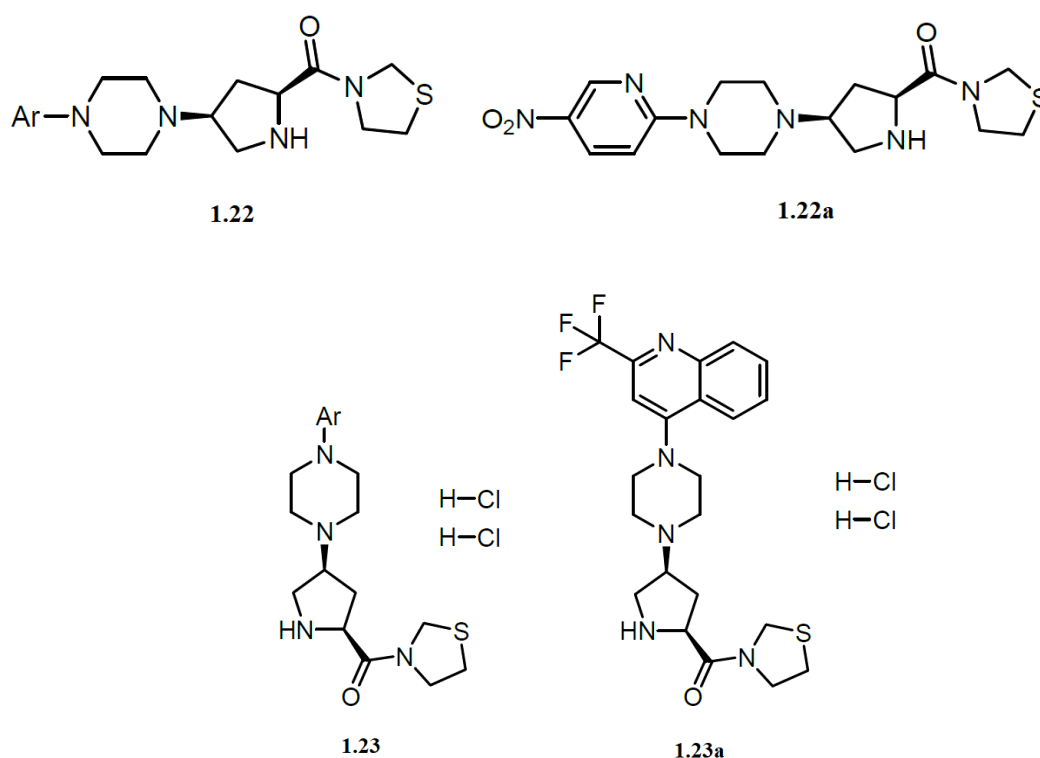


Рис. 1.24. похідні на основі L-пролілтіазолідину 1.22 і 1.23 і найпотужніші інгібітори DPP-IV 1.22a і 1.23a

Інше похідне L-пролілтіазолідину **тенелігліптин** (рис. 1.25) було синтезовано й інгібіторну активність DPP-4 для лікування діабету II типу Йошида та його командою [35]. **Тенелігліптин** продемонстрував ефективність інгібування зі значенням IC_{50} 0,37 нМ. Дослідження *in vivo*

показали, що доза 0,03 мг/кг **тенелігліптину** знижує рівень глюкози в плазмі до більш ніж 35% у щурів Zucker fatty. Рентгенівська кристалічна структура показала, що тiazолідиновий фрагмент **тенелігліптину** займає гідрофобну кишеню S1 ферменту. Аміногрупа пролінового фрагмента утворює взаємодії сольового містка із залишком Glu205, тоді як карбонільний фрагмент утворює водневі зв'язки із залишком Asp710. Піразолільне кільце утворювало СН- π взаємодії, а фенільне кільце на піразолільному фрагменті утворювало гідрофобні взаємодії із залишками ферменту Ser209 і Arg358. Усі ці результати показують, що **тенелігліптин** є потужним антидіабетичним засобом типу 2. Також повідомляється, що **тенелігліптин** використовується в Японії як ліки від діабету 2 типу

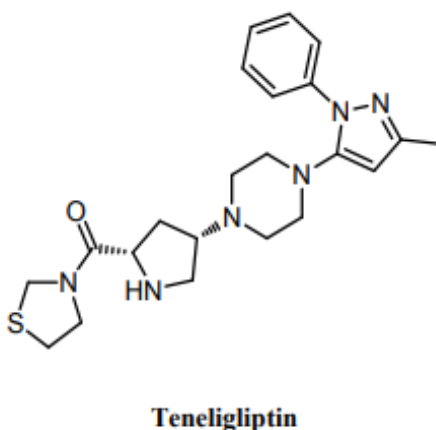


Рис. 1.25. Похідне L-пролілтіазолідину Тенелігліптин як потужний інгібітор DPP-4

Похідні на основі тριαзолу як потужні інгібітори DPP-4. Ряд похідних тριαзолотриазину був синтезований і випробуваний як інгібітори DPP-4 Пателем та його співробітниками [36]. Сполука **1.24a** (рис. 1.26) продемонструвала найбільшу інгібіторну активність щодо DPP-4 серед серій із значенням IC₅₀ 28,05 мкМ. SAR продемонстрував, що введення конденсованого гетероциклічного кільця (бензофурану) замість заміщеного фенільного кільця показало ефективне підвищення ефективності. Крім того, нафталінове кільце також підвищило інгібіторну активність, замінивши його заміщеним фенільним кільцем. Дослідження *in vitro* продемонстрували, що

сполука **1.24a** була менш сильною, демонструючи 53% інгібування в концентрації 100 мкМ, але продемонструвала хороші ефекти *in vivo*, зменшуючи AUC (площу під кривою) глюкози на 47,1% у мишей у дозі 3 мг/кг. . Для визначення повного механізму дії цієї сполуки необхідний подальший аналіз.

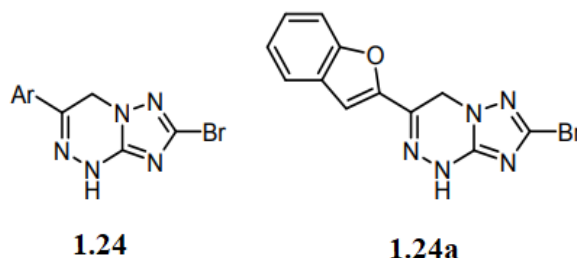


Рис. 1.26. Похідні триазолотриазину 1.24 та потужний інгібітор DPP-IV 1.24a

Deng та ін. [37] синтезували аналоги урацилу на основі триазолу та дослідили їх інгібіторну активність щодо DPP-4. З цієї серії сполука **1.25a** (рис. 1.27) показала найвищу виміряну інгібуючу дію зі значенням IC₅₀ 28,62 нМ.

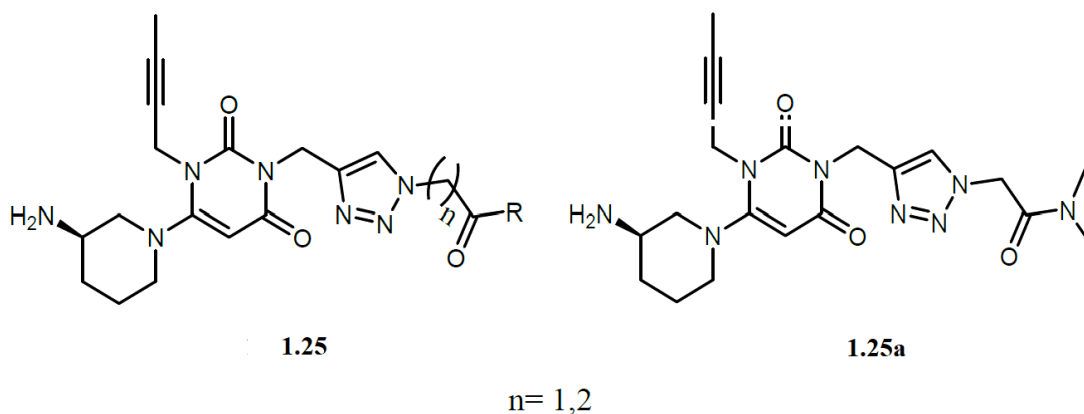


Рис. 1.27. Похідні урацилу на основі триазолу 1.25 та потужний інгібітор DPP-IV 1.25a

Докінг-дослідження та дослідження SAR продемонстрували, що сполука **1.25a** має сприятливе зв'язування з каталітичними центрами ферментних залишків і що введення фрагментів диметиламіну підвищило активність **1.25a**. Амінна група піперидинового кільця утворювала сильні взаємодії Н-зв'язків із залишками Glu205, Glu206 і Tyr662, тоді як триазольна частина утворювала π - π стекинги з Trp269. Сполука **1.25a** показала чудову

активність *in vivo* та *in vitro*, що робить її перспективним кандидатом як препарат проти діабету. Дослідження *in vivo* показали, що сполука **1.25a** знижувала рівень глюкози в плазмі на 34,2% у мишей у тесті OGT у дозі 3 мг/кг.

Аналоги на основі імідазолу як потужні інгібітори ДПП-4. Ряд похідних імідазохінолін-4(5H)-ону був синтезований як інгібітори DPP-4 Ікумою та ін. [38], і сполука **1.26a** (рис. 1.28) показала чудову селективність і найпотужнішу інгібіторну активність ($IC_{50}=6,0$ нМ). Подальші дослідження показали, що сполука з групою 5-метил-2-оксо-1,3-діоксол-4-іл метилового ефіру в положенні R демонструє найвищу інгібіторну здатність, ніж інші групи складного ефіру. Аналіз *in vivo* показав, що сполука 130a показала 87% і 64% інгібування активності DPP-4 у плазмі щурів SD у дозі 3 мг/кг через 1 і 10 годин відповідно, що перевищує стандартний ситагліптин. Ці результати свідчать про те, що **1.26a** може бути перспективним кандидатом для діабету 2 типу.

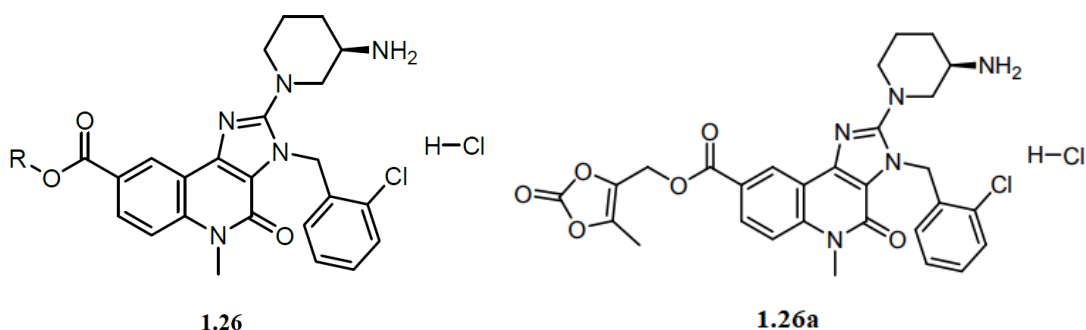


Рис. 1.28. Імідазо-хінолінові гібриди 1.26 та найпотужніші інгібітори DPP-IV 1.26a

Про нові похідні імідазопіразинону повідомили Zhu та ін. [39], які проаналізували інгібуючу активність цих сполук DPP-4. Сполука **1.27a** (рис. 1.29) виявилася найпотужнішим інгібітором ряду ($IC_{50}=78$ нМ). Моделювання молекулярного докінгу та SAR показало, що заміщена бензильна група підвищує активність інгібування сполуки **1.27a** ферменту. Зв'язуючі взаємодії сполуки **1.27a** показали, що 2,4,5-трифторфеніл утворює π - π складкові взаємодії із залишком Tyr662 і займає S1-кишеню ферменту.

Сполука також утворила три водневі зв'язки із залишками ферментів Glu205, Tyr662, Ser209 і Tyr585, що зробило сполуку **1.27a** більш придатною для зв'язування з ферментом.

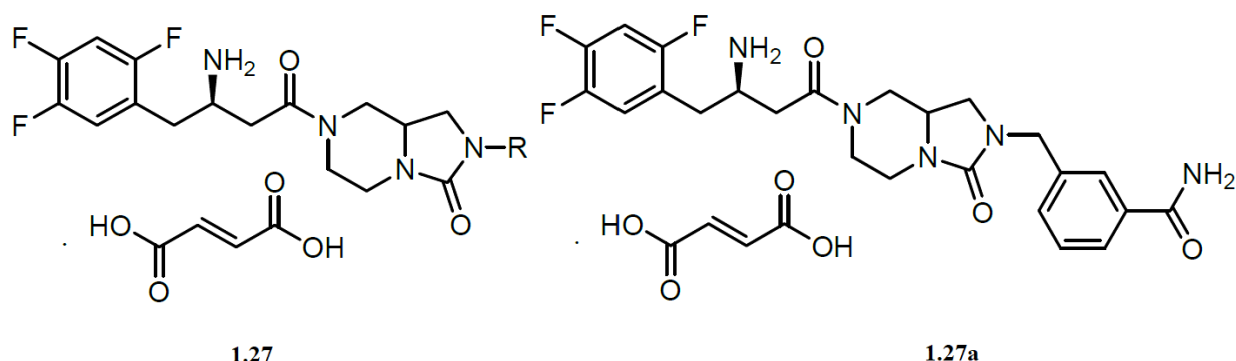


Рис. 1.29. Похідні імідазопіразинону 1.27 та найпотужніший інгібітор ДПП-IV 1.27a

Інша серія імідазо-піридазин-4-аналогів була розроблена Eckhardt та ін. [40] і перевірена на їх активність інгібування DPP-4. З серії R-конфігурація сполуки **1.28a** (рис. 1.30) показала найвищу силу інгібування ДПП-4 зі значенням IC₅₀ 1 нМ. SAR стверджує, що 4-метил-хіназолін-2-ілметил покращує ефективність, а також селективність сполуки **1.28a** для ферменту. Дослідження *in vivo* показали, що **1.28a** показало 71% інгібується ДПП-4 у плазмі крові у щурів при дозі 10 мг/кг через 24 год. Таким чином, сполука **1.28a** може бути перспективним кандидатом для лікування діабету 2 типу.

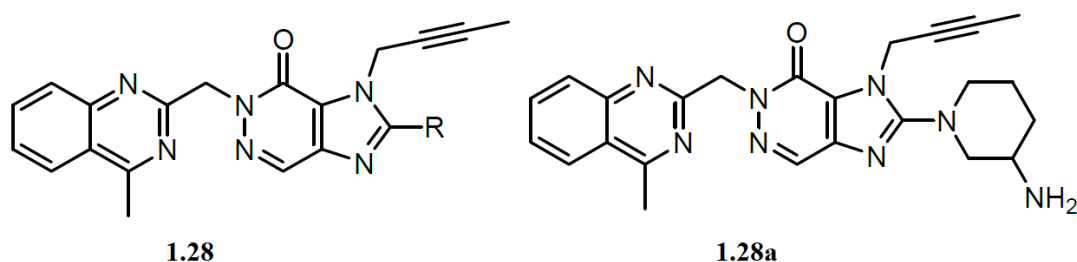


Рис. 1.30. Похідні імідазо-піридазин-4-онів 1.28 і найпотужніший інгібітор ДПП-IV 1.28a

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 1

1. Систематизовані, проаналізовані і узагальнені дані літературних джерел щодо сучасних синтетичних, фармакологічних досліджень та даних клінічних випробувань відомих і потенційних інгібіторів дипептидилпептидази-4 (DPP-4)
2. Проаналізовано результати досліджень нових класів анти діабетичних засобів з групи інгібіторів DPP-4 різної хімічної будови з метою визначення перспективного напрямку для оптимізації пошуку потенційних кандидатів для контролю діабету.
3. Завдяки багатообіцяючим властивостям та механізму дії, більшість обговорюваних агентів можуть стати в нагоді для проектування оптимальної хімічної структури нового ефективного інгібітора дипептидилпептидази-4.

РОЗДІЛ. 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ТА АРГУМЕНТАЦІЯ ВИБОРУ ОБ'ЄКТІВ І МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкти досліджень, характеристика структур

На сьогодні існує широка лінійка препаратів для контролю діабету 2 типу під загальною назвою «Гліптини», які здатні інгібувати дипептидилпептидазу-4 (DPP-4). Фермент дипептидилпептидазу 4 (DPP-4) активно розщеплює GLP-1 та GIP при секреції. З цієї причини були синтезовані препарати – інгібітори DPP-4, щоб зупинити деградацію GLP-1 та гормону інкретину GIP, які стимулюватимуть підшлункову залозу вивільняти інсулін у кров. На даний час доступні схвалені препарати-інгібітори DPP-4 такі, як Сітагліптин, Відагліптин, Саксагліптин, Анагліптин, Денагліптин, Евогліптин та інші (рис. 2.1) [41].

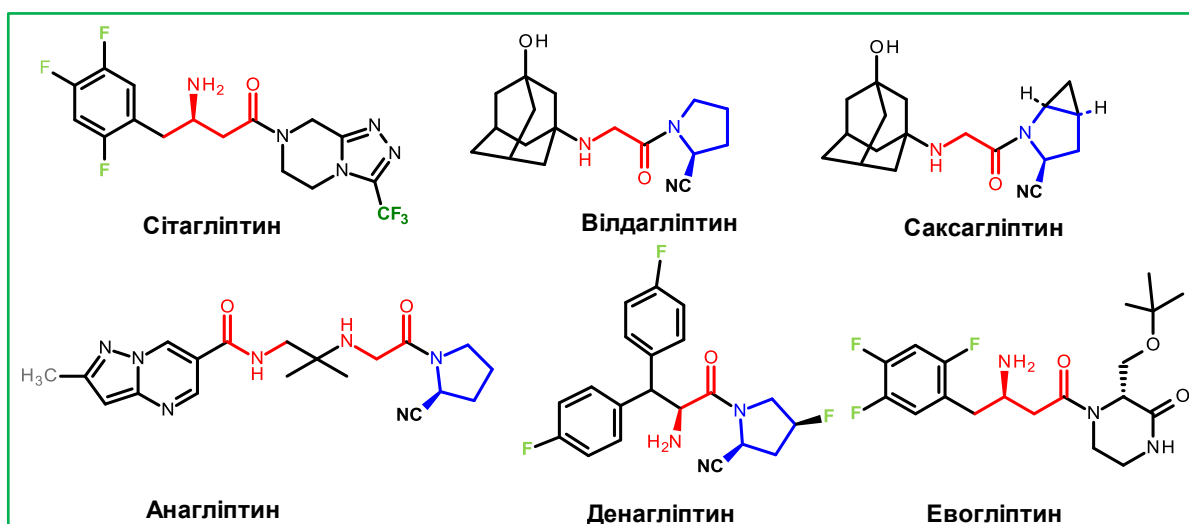


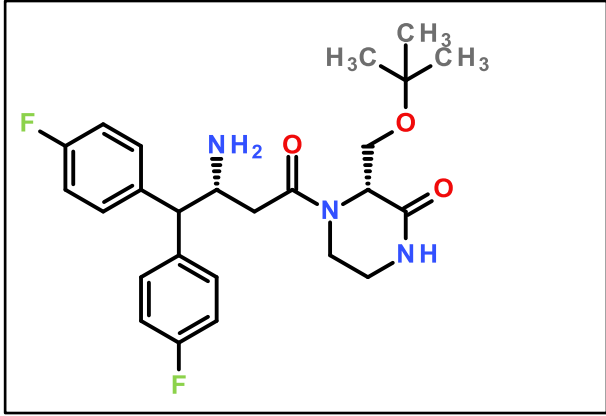
Рис. 2.1. Структурно-активні зв'язки відомих інгібіторів DPP4

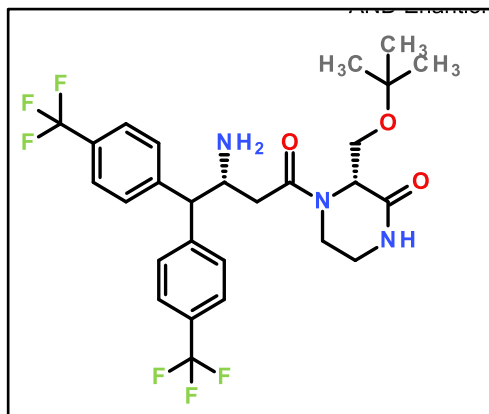
Лікарські засоби цієї групи містять відповідні фармакофорні каркаси, які відповідають за зв'язування молекул в обов'язкових субсайтах S1 і S2, так і в додаткових S2ext, S1' і S2' для покращення фармакокінетичних та фармакодинамічних властивостей. Такими фрагментами є β -аміноамідні групи, 5- і 6-членні гетероциклічні кільця (піперазин, піперидин, піразин, ксантин, піролідин, тiazолідин), арильні і диарильні кільця та адамантан. Розробка підходів на основі малих молекул, що з'являються для лікування діабету 2 типу, а саме, включення каркасу 2(S)-ціанопіролідину в молекулу,

часто використовувалась і стала ключовим проміжним продуктом для синтезу інгібіторів DPP-4 [42]. Нітрильну групу все частіше використовують як ефективний фармакофор при плануванні препаратів цього напрямку [43, 44].

Таким чином, було згенеровано 4 хімічних структури потенційних інгібіторів за допомогою хімічного редактора Marvin Sketch 20.5, які ґрунтуються на основі інгібіторної (R) β-аміноамідної групи, яка містила заміщену похідну піперазин-2-ону або (S)-піролідин-2-карбонітрильний фрагмент і заміщені дифенільні кільця в 4-му положенні β-аміноамідного ланцюга. Marvin Sketch - це модернізований хімічний редактор для побудови хімічних структур, реакцій та запитів. Він має великий список функцій, що поліпшує та прискорює роботу з хімічними структурами. В таблиці 2.1 Наведені структури конструйованих молекул, їх хімічні назви та формати «smile», які необхідні для роботи в он-лайн програмах для прогнозу фармакокінетики і токсичності.

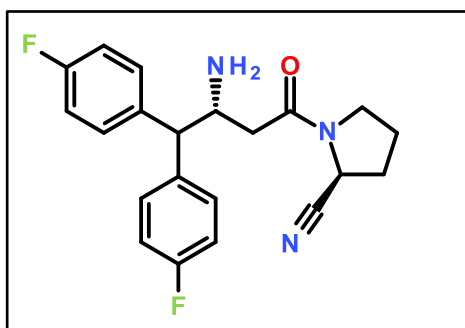
Таблиця 2.1. Хімічні структури конструйованих молекул

Хімічна структура	формат «smile» назва
	<chem>CC(C)(C)OC[C@H]1N(CCNC1=O)C(=O)C[C@@H](N)C(c2ccc(F)cc2)c3ccc(F)cc3</chem> <i>(3R)-3-(терт-бутоксиметил)-4-[(3R)-3-аміно-4,4-біс(4-флуорофеніл)бутаноїл]піперазин-2-он (1)</i>



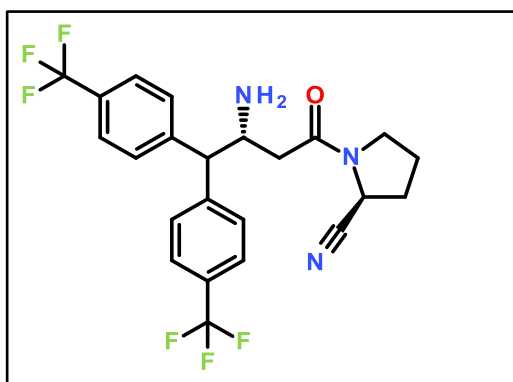
CC(C)(C)OC[C@H]1N(CCNC1=O)
C(=O)C[C@H](N)C(c2ccc(cc2)C(F)(F)F)c3ccc(cc3)C(F)(F)F

***(3R)-3-(терт-бутоксиметил)-4-
[(3R)-3-аміно-4,4-біс(4-
трифлуорометилфеніл)бутаноіл]
піперазин-2-он (2)***



N[C@H](CC(=O)N1CCC[C@H]1C#N)
C(c2ccc(F)cc2)c3ccc(F)cc3

***(2S)-1-[(3R)-3-аміно-4,4-біс(4-
флуорофеніл)бутаноіл]піролідин-
2-карбонітрил (3)***



N[C@H](CC(=O)N1CCC[C@H]1C#N)
C(c2ccc(cc2)C(F)(F)F)c3ccc(cc3)C(F)(F)F

***(2S)-1-[(3R)-3-аміно-4,4-біс(4-
трифлуорометилфеніл)бутаноіл]
піролідин-2-карбонітрил (4)***

2.2. Обґрунтування вибору *in silico* методів для оптимізації пошуку нових структур та кристалографічної моделі для докінгу

За допомогою програми pkCSM для конструйованих молекул планується обчислити параметри «лікоподібності» на відповідність правилу Ліпінські та піддати всі досліджувані сполуки прогнозованому аналізу ADME, що означає абсорбція, розподіл, метаболізм та виведення. PkCSM – це інноваційна платформа, що використовує машинне навчання для прогнозування фармакокінетичних властивостей малих молекул. Ця програма базується на особливостях відстані та фармакофору, які представлені у вигляді графічних сигнатур. Ця платформа має 28 моделей регресії та класифікації, які були розроблені та протестовані на різних експериментальних наборах даних [45]. В таблиці 2.2 наведені основні параметри ADME, їх визначення і оцінка результату.

Таблиця 2.2. Визначення параметрів ADME і оцінка результату (pkCSM програма)

Параметр	Визначення	Оцінка результату
Розчинність у воді	Розчинність сполуки у воді (logS) демонструє розчинність молекули при 25°C. Ліпідорозчинні препарати всмоктуються гірше, ніж водорозчинні, особливо при ентеральному введенні. Ця модель побудована з використанням експериментальних вимірювань розчинності у воді 1708 молекул [45].	Прогнозована розчинність сполуки у воді подається у вигляді логарифму молярної концентрації (log mol/L).
Всмоктування в кишечнику (людина)	Переважаючим місцем для всмоктування лікарського засобу з розчину для перорального введення. Цей метод використовують для прогнозування частки сполук, які всмоктуються через тонкий кишечник людини [45].	Для даної сполуки передбачений відсоток, який буде всмоктуватися через кишечник людини. Молекула, що всмоктується менше ніж 30% вважається погано

		поглиненою.
<i>P-глікопротеїновий субстрат</i>	P-глікопротеїн є АТФ-зв'язуючим касетним транспортером (ABC). Він функціонує як біологічний бар'єр, витісняючи токсини та ксенобіотики з клітин. Скринінг транспорту P-глікопротеїну виконується з використанням трансгенних мишей з нокаутом MDR та клітинних систем <i>in vitro</i> . Цю модель було розроблено з використанням 332 сполук, які характеризувалися за здатністю транспортуватися за допомогою Pgp [45].	Модель передбачає, чи є певна сполука субстратом Pgp чи ні.
<i>Інгібітори P-глікопротеїну I і II</i>	Модуляція транспорту, опосередкованого P-глікопротеїном, має значні фармакокінетичні наслідки для субстратів Pgp, які можуть бути застосовані для отримання певних терапевтичних переваг або призвести до протипоказань. Ці прогностичні моделі були побудовані з використанням сполук 1273 і 1275, які були охарактеризовані за їхню здатність інгібувати транспорт P-глікопротеїну I і P-глікопротеїну II відповідно [45].	Провісник визначить, чи ймовірно дана сполука є інгібітором P-глікопротеїну I/II.
<i>VDss (людина)</i>	Об'єм розподілу в стані сталості (VDss) - це важливий фармакокінетичний параметр, який використовується для опису того, як лікарський засіб розподіляється в організмі людини в стані рівноваги. Чим вищий VD, тим більше препарату розподіляється та накопичується в тканинах людини, а не залишається в плазмі. На нього можуть вплинути зневоднення та	VDss вважається низьким, якщо нижче 0,71 л/кг ($\log VDss < -0,15$), і високим, якщо вище 2,81 л/кг ($\log VDss > 0,45$).

	ниркова недостатність. Цю прогностичну модель було побудовано з використанням обчисленого рівноважного об'єму розподілу (VDss) у людей для 670 препаратів. Прогнозований логарифм VDss даної сполуки подається як $\log L/\text{кг}$ [45].	
Частка без зв'язку (людина)	Більшість лікарських засобів у плазмі існуватимуть у стані рівноваги або у незв'язаному стані, або у зв'язаному стані з білками сироватки. На ефективність певного препарату може вплинути ступінь до якого він зв'язує білки в крові, оскільки лише незв'язана (вільна) фракція препарату може проникати через біологічні мембрани, взаємодіяти з рецепторами або метаболізуватися. Ця прогностична модель була побудована з використанням вимірної вільної частки 552 сполук у крові людини (F_u) [45].	Для даної сполуки буде розраховано передбачувану фракцію, яка буде незв'язаною в плазмі.
Проникність BBB	Мозок захищений від екзогенних сполук гематоенцефалічним бар'єром (ГЕБ). Здатність препарату проникати в мозок є важливим параметром, який слід враховувати, щоб допомогти зменшити побічні ефекти та токсичність. Проникність крові та мозку вимірюється <i>in vivo</i> на тваринних моделях як $\log BB$, логарифмічне відношення концентрації препарату в мозку до плазми. Ця прогностична модель була побудована з використанням 320 сполук, $\log BB$ яких було експериментально виміряно [45].	Для даної сполуки $\log BB > 0,3$ вважається таким, що легко долає гематоенцефалічний бар'єр, тоді як молекули з $\log BB < -1$ погано поширюється в мозку.
Проникність	Вимірювання проникності крові в	Вважається, що

ЦНС	мозок може бути складним через змішуючі фактори. Добуток проникності крові та мозку на площу поверхні (logPS) є більш прямим вимірюванням. Його отримують з перфузії мозку <i>in situ</i> із з'єднанням, яке безпосередньо вводять у сонну артерію. При цьому відсутні системні ефекти розподілу, які можуть погіршити проникнення в мозок. Ця прогностична модель була побудована з використанням 153 сполук, logPS яких було експериментально виміряно [45].	сполуки з $\log PS > -2$ проникають у центральну нервову систему (ЦНС), тоді як сполуки з $\log PS < -3$ вважаються такими, що не можуть проникнути в ЦНС.
Субстрат CYP3A4	Цитохром P450 грає ключову роль у метаболізмі багатьох лікарських засобів та інших сполук у печінці. Однак інгібітори P450 можуть різко змінити фармакокінетику цих препаратів. Тому важливо оцінити, чи ймовірно дана сполука є субстратом цитохрому P450. Дві основні ізоформи, відповідальні за метаболізм ліків, - це 2D6 і 3A4. Ці моделі були побудовані з використанням 671 сполуки, метаболізм якої вимірювали кожною ізоформою цитохрому P450 [45].	Прогноз оцінить, чи ймовірно, що дана молекула метаболізується одним із P450.
Нирковий субстрат OCT2	Органічний транспортер катіонів 2 – це транспортер поглинання нирками, який відіграє важливу роль у розподілі та виведенні лікарських засобів, метаболітів та ендогенних сполук нирками. Субстрати OCT2 також мають потенціал для несприятливої взаємодії з інгібіторами OCT2, що вводяться одночасно. Оцінка потенціалу кандидатів для транспортування за допомогою OCT2 надає корисну інформацію	Прогноз оцінить, чи ймовірно дана молекула є субстратом OCT2.

	щодо не лише дозволу, але й потенційних протипоказань. Ця модель була побудована з використанням 906 сполук, транспортування яких за допомогою ОСТ2 було експериментально виміряно [45].	
Загальний кліренс	Кліренс препарату вимірюється константою пропорційності CL_{tot} і виникає в основному як комбінація печінкового кліренсу (метаболізм у печінці та жовчний кліренс) і ниркового кліренсу (виведення через нирки). Це пов'язано з біодоступністю та є важливим для визначення швидкості дозування для досягнення рівноважних концентрацій. Цей предиктор був створений з використанням даних про загальний кліренс для 398 сполук [45].	Прогнозований загальний кліренс $\log(CL_{tot})$ даної сполуки надається в $\log(\text{мл/хв/кг})$.

На наступному етапі, крім ADME планується визначити токсичність за допомогою програм pkCSM і ProTox та встановити клас для кожної сполуки. ProTox це віртуальна лабораторія для прогнозування токсичності молекул, що включає схильність до фрагментів, молекулярну подібність, найпоширеніші ознаки та машинне навчання на основі 61 моделі для прогнозування кінцевих точок токсичності, таких як: гостра токсичність, токсикологічні кінцеві точки, токсичність для органів, молекулярні початкові події, метаболізм та несприятливі наслідки [46].

Токсичні дози в більшості випадках подаються як значення LD_{50} у мг/кг маси тіла. LD_{50} – це середня летальна доза, що означає дозу, при якій 50% досліджуваних суб'єктів помирають під час впливу сполуки. Класи токсичності визначаються відповідно до глобальної гармонізованої системи класифікації маркування хімічних речовин (GHS). Значення LD_{50} наведені в

[мг/кг]: клас I – смертельно при проковтуванні ($LD_{50} \leq 5$); клас II – смертельно при проковтуванні ($5 < LD_{50} \leq 50$); клас III – токсичний при ковтанні ($50 < LD_{50} \leq 300$); клас IV – шкідливий при ковтанні ($300 < LD_{50} \leq 2000$); клас V – може бути шкідливим при проковтуванні ($2000 < LD_{50} \leq 5000$); клас VI – нетоксичний ($LD_{50} > 5000$) [46].

Одним із сучасних методів *in silico* є молекулярний докінг, що дозволяє проводити швидко і відносно недороге дослідження, які використовується для передбачення взаємодії між молекулами, такими як ліганди та білки. Це дозволяє вивчати взаємодії між молекулами за допомогою комп'ютерного моделювання, не вдаючись до експериментів *in vitro* або *in vivo*.

Для докінгових досліджень нами був використаний набір автоматизованих інструментів для докінгу Autodock 4.2, який досліджує можливі конформації ліганду під час зв'язування з рецептором та використовує для цього різні алгоритми пошуку. Цей інструмент враховує водневі зв'язки, ван-дер-ваальсові взаємодії та інші електростатичні сили. Через його гнучкість і можливість обробляти широкий спектр сценаріїв докінгу, його можна застосовувати в багатьох академічних дослідженнях і комерційних проєктах розробки лікарських засобів [47].

Для процедури докінгу основними вимогами є структура рецептора та лігандів. Тривимірну структуру рецептора можна отримати у спеціальній базі PROTEIN DATA BANK, яка знаходиться у вільному доступі для користувачів онлайн. Тривимірну структуру лігандів (досліджуваних молекул) можна отримати з хімічних баз даних або за допомогою програмного забезпечення, такого як ChemDraw або BioviaDraw з подальшим перетворенням на спеціальний формат pdb за допомогою програм Avogadro або Babel [47]. Для докінгу було обрано кристалографічну модель рецептора дипептидилпептидази-4, спів кристалізованої з Евогліптином (PDB ID: 5Y7J) [48]. Евогліптин ((R)-4-((R)-3-аміно-4-(2,4,5-трифторфеніл)бутаноїл)-3-(трет-бутоксиметил)піперазин-2-он) є

високоєфективним селективним інгібітором дипептидилпептидази IV (DPP4), схвалений для лікування діабету 2 типу в Південній Кореї. Аналіз кристалічних структур евогліптину, DA-12166 і DA-12228 (S,R діастереомер евогліптину), так і інгібіторної активності свідчить про те, що зв'язування трифторфенільного фрагмента в кишені S1 і фрагмента піперазин-2-ону має гідрофобну взаємодію з Phe357 у великому субсайті S2, а також те, що множинні водневі зв'язки, створені за допомогою (R)- β -амінова група в кишені S2 і контакти (R)-трет-бутильної групи з Arg125 сприяють високій активності, що спостерігається для Евогліптину [48]. Візуалізація моделі показана на рис 2.2.

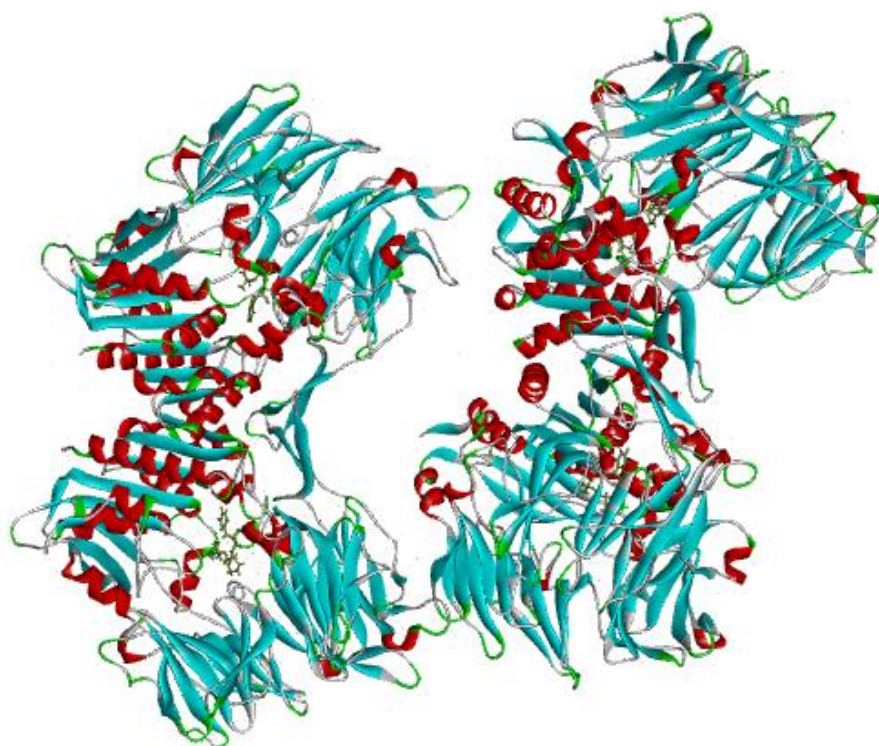


Рис. 2.2. Візуалізація кристалографічної моделі дипептидилпептидази-4 (PDB ID: 5Y7J).

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 2

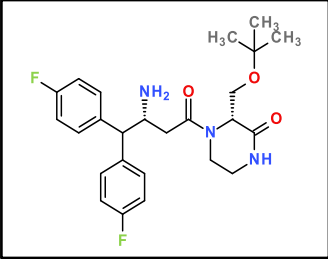
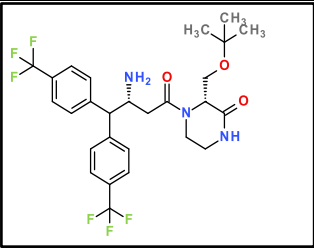
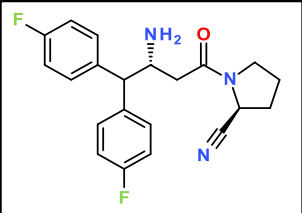
1. Для проектування нових молекул був використаний аналіз структурно-активних зв'язків відомих інгібіторів DPP-4. Таким чином було згенеровано 4 хімічні структури на основі інгібіторної (R) β -аміноамідної групи, яка містила заміщену похідну піперазин-2-ону або (S)-піролідин-2-карбонітрильний фрагмент і заміщені дифенільні кільця в 4-му положенні β -аміноамідного ланцюга.
2. *In silico* технології у розробці ліків є сучасними методами виявлення фармакокінетичних властивостей, токсичності та ідентифікації «молекул-мішеней». Комплексне вивчення фармакокінетики, токсичності та активності може бути корисним для подальших експериментальних досліджень та молекулярного дизайну потенційних кандидатів у лікарські засоби.

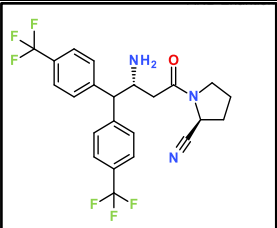
РОЗДІЛ 3. ВИКОРИСТАННЯ *IN SILICO* ТЕХНОЛОГІЙ ДЛЯ ОПТИМІЗАЦІЇ ПОШУКУ НОВИХ ІНГІБІТОРІВ ДИПЕПТИДИЛ ПЕПТИДАЗИ-4 (DPP4)

3.1. Розрахунок параметрів «лікоподібності» і ADMET конструйованих структур

На першому етапі *in silico* дослідження заплановані речовини (1-4) були піддані на відповідність правилу Ліпінські. Правило 5 Ліпінські вимагає, щоб сполука мала молекулярну масу не більше 500, не повинна створювати більше п'яти водневих зв'язків і не повинна приймати більше десяти водневих зв'язків, а коефіцієнт logP має бути менше 5,0. В таблиці 3.1 наведені розрахункові значення, обчислені за допомогою он-лайн інструменту pkCSM.

Таблиця 3.1. Обчисленні параметри «лікоподібності» для потенційних інгібіторів DPP4 (1-4) (он-лайн програма pkCSM)

Сполука	Структурна формула	Log P	Молекулярна маса	Донори водневого зв'язку	Акцептори водневого зв'язку
1		2.95	459.5	2	4
2		4.71	559.5	2	4
3		3.32	369.4	1	3

4		5.08	469.4	1	3
---	---	------	-------	---	---

По результатам ми можемо побачити, що молекулярна маса сполуки 2 трохи перевищує встановлені критерії ($559.5 > 500$). Ця молекула ймовірно може мати труднощі в проникненні через біологічні мембрани, що можливо ускладнюватиме всмоктування в організмі людини, тому ми піддали всі досліджувані сполуки прогнозованому аналізу ADME (абсорбція-розподіл-метаболізм-виведення) з метою оцінки їх ймовірної фармакокінетики за допомогою програми pkCSM.

Для оцінки параметрів абсорбції були обчислені відповідні значення розчинності у воді, проникності Caco-2, всмоктування в кишечнику, субстратності або інгібування Р-глікопротеїну (табл. 3.2).

Таблиця 3.2. Обчислені значення параметрів абсорбції

Назва параметру	Прогнозовані значення			
	Сполука 1	Сполука 2	Сполука 3	Сполука 4
Розчинність у воді, log mol/L	-4.759	-4.766	-4.611	-5.741
проникність Caco-2, log Papp 10^{-6} см/с	1.017	0.99	1.072	0.55
Всмоктування в кишечнику, %	96.476	90.996	93.365	87.878
Р-глікопротеїн субстрат, (так/ні)	Так	Так	Так	Так
Р-глікопротеїн I/II інгібітор (так/ні)	Так/Так	Так/Так	Так/Так	Так/Так

Згідно обчислених значень 4 сполуки мають помірну розчинність у воді (від 0 до -8), мають середні показники проникності Сасо-2, добре всмоктуються в кишечнику. Р-глікопротеїн (Р-гр) є членом сімейства АТФ-залежних касетних транспортерів (АВС), які використовують енергію АТФ для перенесення молекул через клітинну мембрану. Він функціонує як біологічний бар'єр, який забезпечує клітинний захист, шляхом витіснення токсинів та ксенобіотиків. Згідно обчислених даних досліджувані молекули є субстратом, що може призвести до проблем з біодоступністю та ефективністю, також молекули є інгібіторами, що може призвести до підвищення ефективності деяких препаратів та може збільшити ризик взаємодії та токсичності. Це вимагає додаткового вивчення та тестування молекул.

Як видно з результатів прогнозування параметрів розподілу (табл. 3.3) обчислені об'єми розподілу цих сполук мали оптимальні значення. Рівень передбачуваної фракції, яка буде незв'язаною в плазмі, параметри можливого проникнення через ГЕБ і ЦНС свідчать, що всі молекули в більшій мірі мають середні показники проникнення та розподілу.

Таблиця 3.3. Обчислені значення параметрів розподілу

Назва параметру	Прогнозовані значення			
	Сполука 1	Сполука 2	Сполука 3	Сполука 4
VDss об'єм розподілу log L/kg	0.79	0.671	0.766	0.997
Не зв'язана фракція	0.102	0.061	0.11	0.10
BBB (ГЕБ) проникнення log BB	-0.962	-1.134	-0.187	-0.557
CNS (ЦНС) проникнення log PS	-2.615	-2.175	-2.325	-1.874

Субстрати глікопротеїну-Р, а також субстрати СYP3A4 лікарських засобів, і ці дві системи (транспорту та метаболізму лікарських засобів) працюють узгоджено. Жодна зі сполук не є субстратом для СYP2C9. Інгібування СYP3A4 може підвищити концентрацію інших препаратів, тому треба бути обережним при призначенні лікарських засобів. Що стосується субстратної активності до ОСТ2, то тільки сполука 1 можливо матиме потенційну лікарську взаємодію, всі інші сполуки не проявляли такої можливості. Всі досліджувані сполуки мають позитивне значення кліренсу, що означає швидке виведення з організму, що зменшує ризик накопичення сполуки в організмі та знижує ймовірність токсичності. Результати прогнозу метаболізму і виведення наведені в таблиці 3.4.

Таблиця 3.4. Обчислені значення параметрів метаболізму і виведення

Назва параметру	Прогнозовані значення			
	Сполука 1	Сполука 2	Сполука 3	Сполука 4
СYP3A4 субстрат (Так/Ні)	Так	Так	Так	Так
СYP2C9 інгібітор (Так/Ні)	Ні	Ні	Ні	Ні
СYP3A4 інгібітор (Так/Ні)	Так	Так	Так	Так
Загальний кліренс log CLTOT, log ml/min/kg	0.543	0.279	0.567	0.309
Нирковий субстрат ОСТ2 (Так/Ні)	Так	Ні	Ні	Ні

На наступному етапі ми оцінили токсичні ефекти перевірених молекул за допомогою інструментів pkCSM і ProTox та визначали клас для кожної сполуки (табл.. 3.5).

Таблиця 3.5. Результати прогнозування токсичності

Сполука	pkCSM		ProTox 3.0	
	LD50 mol/kg	LOAEL log mg/kg	LD50 mg/kg	Клас токсичності
1	3,338	1,193	2973	5
2	3.251	0.909	2973	5
3	2,606	1,412	1850	4
4	3.016	0.932	326	4

Згідно прогнозу токсичності, обчислені значення гострої та хронічної токсичності для всіх тестованих сполук є прийнятними. За допомогою інструменту ProTox було визначено клас токсичності для кожної сполуки. Згідно класифікації маркування хімічних речовин (GHS), яка лежить в основі визначення класів токсичності, смертельний препарат класифікується як клас 1, а найменш токсична або сприятлива сполука – клас 6. На основі цих властивостей ми виявили, що сполуки 1-2 належать до класу 5, а всі інші до 6 класу, що означає, що сполуки є майже не токсичними речовинами.

3.2. Молекулярний докінг потенційних інгібіторів дипептидилпептидази-4 (DPP4)

Наступним кроком комп'ютерної оцінки, який би дозволив відібрати найбільш перспективні сполуки для подальших експериментальних досліджень, є метод обчислювального молекулярного аналізу для опису ефективності та афінності зв'язування (молекулярний докінг).

За результатами молекулярного докінгу були розраховані скорингова функція (Affinity DG), величина вільної енергії зв'язування та константи зв'язування (EDoc і Ki) для кращих конформаційних положень

досліджуваних сполук (рис. 3.1, табл. 3.6). В якості препарату порівняння обрано Евогліптин, так як він є співкристалізований відносно обраної мішені, а одержані в результати редокінгу були використані як стандартні.

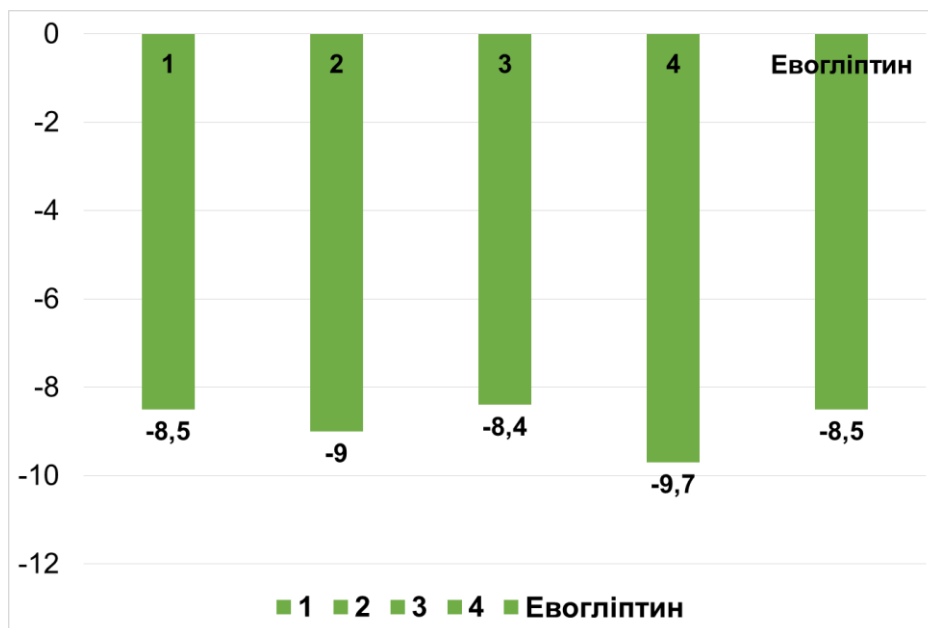


Рис. 3.1. Значення скорингової функції (Affinity DG) досліджуваних сполук відносно дипептидилпептидази-4

Таблиця 3.6. Значення вільної енергії (EDoc) та константи (Ki) зв'язування досліджуваних сполук відносно дипептидилпептидази-4

Сполука	Оціночні значення	
	EDoc ккал/моль	Ki uM (мікромоль)
Сполука 1	-5.62	75.64
Сполука 2	-4.87	270.34
Сполука 3	-6.72	11.81
Сполука 4	-7.32	4.34
Евогліптин	-5.53	88.17

Досліджувані молекули згідно оціночних значень (рис. 3.1) мали найкращі енергетичні позиції з помірними значеннями скорингової функції, окрім молекул 2 і 4, які мали абсолютні значення афінітету вищі за такі значення Евогліптину. В свою чергу сполука 4 за значеннями вільної енергії та константи зв'язування мала кращій результат порівнянно з референтними показниками (табл. 3.6).

Для оцінки режимів зв'язування нових молекул відносно сайту зв'язування DPP4 було проведено детальний аналіз геометричного розташування енергетично вигідних позицій та проаналізовані всі утворені комплекси з ферментом.

Сполуки 1 та 2 мали не характерний для інгібіторів DPP4 режим зв'язування. Згідно детального аналізу локації цих молекул було виявлено, що взаємодія з сайтом відбувається за рахунок заміщених дифенільних кілець, які взаємодіють з відповідними ланцюгами амінокислот сайтів S1 і S2, а інгібіторна (R)- β -амінова група та заміщена частина піперазин-2ону не має характерного зв'язування з амінокислотами в добре задукоментованих ділянках. Це свідчить, що дані сполуки ймовірно не зможуть інгібувати каталітичну активність DPP4, незважаючи на досить не погані обчислені значення докінгу, тому не рекомендовані для подальших досліджень (рис. 3.2).

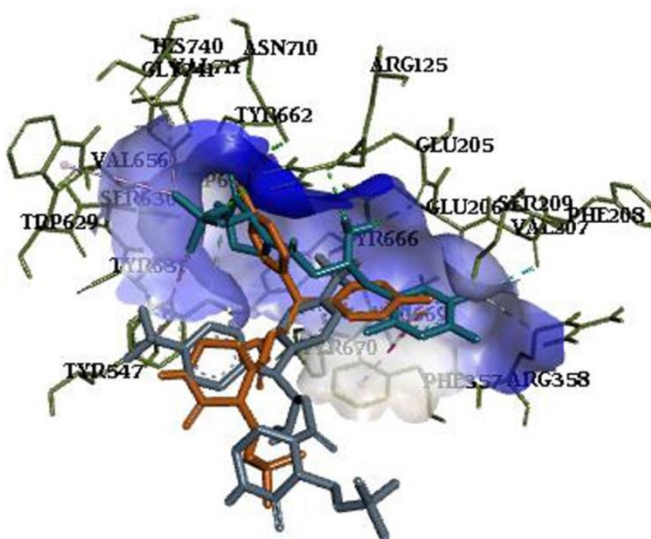


Рис. 3.2. Суперпозиції сполук 1 (оранжева) і 2 (сіра) в порівнянні з Евогліптином (синій) в сайті DPP-4

Спосіб зв'язування сполук 3 і 4 подібний до класичних інгібіторів. Слід зазначити, що сполуки 3 і 4, які мають заміщені дифенільні кільця при (R)- β -аміновій групі сприяли зануренню молекул як в гідрофобну кишеню S1, так і сайту S2 з утворенням широких взаємодій з відповідними ланцюгами амінокислот. Суперпозиції сполук 3 і 4 наведені на рис. 3.3.

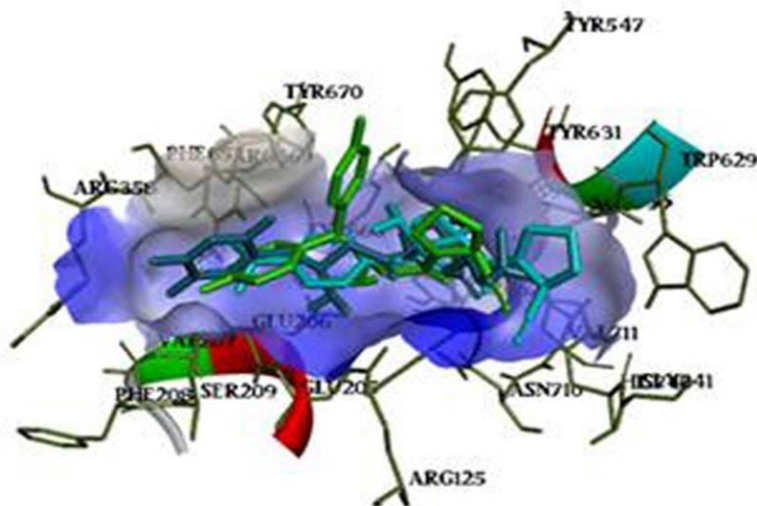


Рис. 3.3. Суперпозиції сполук 3 (зелена) і 4 (блакитна) в порівнянні з Евогліптином (сірий) в сайті DPP-4

Детальний аналіз геометричного розташування в сайті дипептидилпептидази-4 встановив, що в утворенні комплексу зі сполукою 3 можлива несприятлива взаємодія donor–donor з залишком Tyr662 за участі (R)- β -амінова частина бутаноїльної групи (рис 3.4).

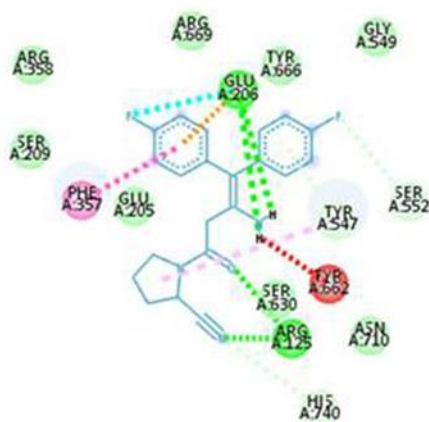


Рис. 3.4. Діаграма міжмолекулярних взаємодій сполуки 3 в комплексі з DPP-4

Такий вид взаємодії може призвести до невеличання ефективності, тому сполука 3 не рекомендована до подальших досліджень. Що стосується сполуки 4, в утворенні комплексу беруть участь сприятливі взаємодії (рис. 3.5) і це добре корелює з обчисленими значеннями докінгу.

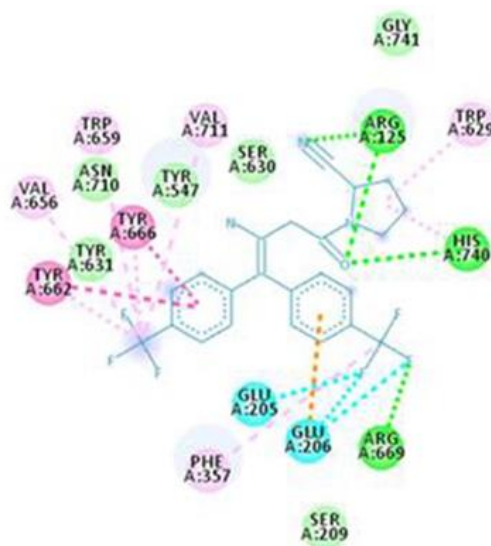


Рис. 3.5. Діаграма міжмолекулярних взаємодій сполуки 4 в комплексі з DPP-4

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3

1. *In silico* оцінка «лікоподібності» і фармакокінетичного профілю досліджуваної групи сполук показала, що вони можливо є субстратами/інгібіторами р-глікопротеїну та ізоферменту CYP3A4, що може призвести до проблем з біодоступністю, підвищення ефективності деяких препаратів та може збільшити ризик взаємодії та токсичності. За всіма іншими фармакокінетичними параметрами сполуки мали помірні/середні значення, отже були рекомендовані для подальшого молекулярного докінгу.
2. Згідно прогнозу токсичності, обчислені значення гострої та хронічної токсичності для всіх тестованих сполук є прийнятними, а визначені класи токсичності – 4 і 5, свідчать, що досліджувані молекули є практично не токсичними речовинами.
3. За результатами докінгу досліджувані молекули мали помірну та високу спорідненість до дипептидилпептидази-4. Детальний аналіз утворених комплексів виявив сполуки, які мали спосіб зв'язування, подібний до класичних інгібіторів.
4. Відповідно до розрахункового масиву значень та аналізу результатів докінгу сполуку 4 було визнано перспективним інгібітором для подальших експериментальних досліджень.

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

1. Систематизовані, проаналізовані і узагальнені дані літературних джерел щодо сучасних синтетичних, фармакологічних досліджень та даних клінічних випробувань відомих і потенційних інгібіторів дипептидилпептидази-4 (DPP-4). Завдяки багатообіцяючим властивостям та механізму дії, більшість обговорюваних агентів можуть стати в нагоді для проектування оптимальної хімічної структури нового ефективного інгібітора дипептидилпептидази-4.
2. Для проектування нових молекул був використаний аналіз структурно-активних зв'язків відомих інгібіторів DPP-4. Таким чином було згенеровано 4 хімічні структури на основі інгібіторної (R) β -аміноамідної групи, яка містила заміщену похідну піперазин-2-ону або (S)-піролідин-2-карбонітрильний фрагмент і заміщені дифенільні кільця в 4-му положенні β -аміноамідного ланцюга.
3. *In silico* оцінка «лікоподібності» і фармакокінетичного профілю досліджуваної групи сполук показала, що вони можливо є субстратами/інгібіторами р-глікопротеїну та ізоферменту CYP3A4, що може призвести до проблем з біодоступністю, підвищення ефективності деяких препаратів та може збільшити ризик взаємодії та токсичності. За всіма іншими фармакокінетичними параметрами сполуки мали помірні/середні значення, отже були рекомендовані для подальшого молекулярного докінгу.
4. Згідно прогнозу токсичності, обчислені значення гострої та хронічної токсичності для всіх тестованих сполук є прийнятними, а визначені класи токсичності – 4 і 5, свідчать, що досліджувані молекули є практично не токсичними речовинами.
5. За результатами докінгу досліджувані молекули мали помірну та високу спорідненість до дипептидилпептидази-4. Детальний аналіз

утворених комплексів виявив сполуки, які мали спосіб зв'язування, подібний до класичних інгібіторів.

6. Відповідно до розрахункового масиву значень та аналізу результатів докінгу, сполуку 4 було визнано перспективним інгібітором для подальших експериментальних досліджень.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Dailey M. J., Moran T. H. Glucagon-like peptide 1 and appetite. *Trends Endocrinol. Metab.* 2013. Vol. 24. P. 85–91. DOI: 10.1016/j.tem.2012.11.008 (Date of access: 30.04.2024).
2. An Update in Incretin-Based Therapy: A Focus on Glucagon-Like Peptide–1 Receptor Agonists / K. L. Edwards et al. *Diabetes Technol. Ther.* 2012. Vol. 14. P. 951–67. DOI: doi.org/10.1089/dia.2012.0098.edw (Date of access: 30.04.2024).
3. Stonehouse A. H., Darsow T., Maggs D. G. Incretin-based therapies. *J. Diabetes.* 2012. Vol. 4. P. 55–67. DOI: 10.1111/j.1753- 0407.2011.00143.x (Date of access: 30.04.2024).
4. Russell S. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus: a review of direct comparisons of efficacy, safety and patient satisfaction. *Int. J. Clin. Pharm.* 2013. Vol. 35. P. 159–172. DOI: 10.1007/s11096-012-9729-9 (Date of access: 30.04.2024).
5. Overview of clinically approved oral antidiabetic agents for the treatment of type 2 diabetes mellitus / Z. He et al. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2015. Vol. 42. P. 125–138. DOI: 10.1111/1440-1681.12332 (Date of access: 30.04.2024).
6. Design of New Inhibitors of Dipeptidyl Peptidase-4 in Type 2 Diabetes by Computer Simulations / H. Ayachi et al. *Der Pharma Chem.* 2017. Vol. 9. P. 17–29. DOI: 10.3390/ijms17060920 (Date of access: 30.04.2024).
7. Chapter Twenty-Eight—To Market, To Market—2012 / J. Bronson et al. *Annu. Rep. in Med. Chem.* 2013. Vol. 48. P. 471–546. DOI: 10.1016/B978-0-12-417150-3.00028-4 (Date of access: 30.04.2024).
8. Burness C. B. Omarigliptin: first global approval. *Drugs.* 2015. Vol. 75. P. 1947–1952. DOI: 10.1007/s40265-015-0493-8 (Date of access: 30.04.2024).
9. Efficacy and safety of evogliptin monotherapy in patients with type 2 diabetes and moderately elevated glycated haemoglobin levels after diet and

- exercise / J. Park et al. *Diabetes, Obes. Metab.* 2017. Vol. 19. P. 1681–1687. DOI: 10.1111/dom.12987 (Date of access: 30.04.2024).
10. U.S. National Library of Medicine Clinical Trials. gov. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?pg=1=cart=NCT00865592> (Date of access: 30.04.2024).
 11. CMD–05, a novel promising clinical anti-diabetic drug candidate, in vivo and vitro studies / J. Ma et al. *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7. P. 1–11. DOI: 10.1038/srep46628 (Date of access: 30.04.2024).
 12. Synthesis and structure–activity relationships of potent 4–fluoro-2–cyanopyrrolidine dipeptidyl peptidase IV inhibitors / H. Fukushima et al. *Bioorganic Med. Chem.* 2008. Vol. 16. P. 4093–4106. DOI: 10.1016/j.bmc.2008.01.016 (Date of access: 30.04.2024).
 13. Synthesis and structure–activity relationships of potent 3–or 4–substituted–2–cyanopyrrolidine dipeptidyl peptidase IV inhibitors / H. Fukushima et al. *Bioorganic Med. Chem.* 2004. Vol. 12. P. 6053–6061. DOI: 10.1016/j.bmc.2004.09.010 (Date of access: 30.04.2024).
 14. 2–Cyano–4–fluoro–1–thiovalylpyrrolidine analogues as potent inhibitors of DPP–IV / C. D. Haffner et al. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2005. Vol. 15. P. 5257–5261. DOI: 10.1016/j.bmcl.2005.08.050 (Date of access: 30.04.2024).
 15. Design and synthesis of potent amido- and benzyl-substituted *cis*-3-amino-4-(2-cyanopyrrolidide)pyrrolidiny1 DPP-IV inhibitors / J. W. Corbett et al. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2007. Vol. 17. P. 6707–6713. DOI: 10.1016/j.bmcl.2007.10.063 (Date of access: 30.04.2024).
 16. Design and synthesis of DPP-IV inhibitors lacking the electrophilic nitrile group / T. Kondo et al. *Bioorganic Med. Chem.* 2008. Vol. 16. P. 1613–1631. DOI: 10.1016/j.bmc.2007.11.031 (Date of access: 30.04.2024).

17. Anti-diabetic drugs recent approaches and advancements / L. Wang et al. *Eur. J. Med. Chem.* 2009. Vol. 44. P. 3318–3322. DOI: 10.1080/00397910902919522 (Date of access: 30.04.2024).
18. Novel *trans*-2-aryl-cyclopropylamine analogues as potent and selective dipeptidyl peptidase IV inhibitors / T. Y. Tsai et al. *Bioorganic Med. Chem.* 2009. Vol. 17. P. 2388–2399. DOI: 10.1016/j.bmc.2009.02.020 (Date of access: 30.04.2024).
19. 1-((3*S*,4*S*)-4-amino-1-(4-substituted-1,3,5-triazin-2-yl) pyrrolidin-3-yl)-5,5-difluoropiperidin-2-one inhibitors of DPP-4 for the treatment of type 2 diabetes / K. M. Andrews et al. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2011. Vol. 21. P. 1810–1814. DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.01.055 (Date of access: 30.04.2024).
20. Overview of clinically approved oral antidiabetic agents for the treatment of type 2 diabetes mellitus / Z. He et al. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2015. Vol. 42. P. 125–138. DOI: 10.1111/1440-1681.12332 (Date of access: 30.04.2024).
21. Design, Synthesis, Biological Evaluation, and Docking Studies of (*S*)-Phenylalanine Derivatives with a 2-Cyanopyrrolidine Moiety as Potent Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitors / Y. Liu et al. *Bioorg. Med. Chem.* 2013. Vol. 21. P. 5679–5687. DOI: 10.1111/cbdd.12139 (Date of access: 30.04.2024).
22. Synthesis and biological evaluation of pyrrolidine-2-carbonitrile and 4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile derivatives as dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes / J. Wang et al. *Bioorganic Med. Chem.* 2013. Vol. 21. P. 7418–7429. DOI: 10.1016/j.bmc.2013.09.048 (Date of access: 30.04.2024).
23. Design, synthesis and biological evaluation of hetero-aromatic moieties substituted pyrrole-2-carbonitrile derivatives as dipeptidyl peptidase IV inhibitors / X. Ji et al. *J. Med. Chem.* 2014. Vol. 75. P. 111–122. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.01.021 (Date of access: 30.04.2024).

24. Synthesis and evaluation of camphor and cytosine-based cyanopyrrolidines as DPP-IV inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus / S. O. Kuranov et al. *Bioorganic Med. Chem.* 2018. Vol. 26. P. 4402–4409. DOI: 10.1016/j.bmc.2018.07.018 (Date of access: 30.04.2024).
25. The discovery of novel 5,6,5- and 5,5,6-tricyclic pyrrolidines as potent and selective DPP-4 inhibitor / J. M. Cox et al. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2016. Vol. 26. P. 2622–2626. DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.04.020 (Date of access: 30.04.2024).
26. Design, synthesis and biological evaluation of 4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile and octahydrocyclopenta[*b*]pyrrole-2-carbonitrile derivatives as dipeptidyl peptidase IV inhibitors / X. Ji et al. *Eur. J. Med. Chem.* 2014. Vol. 86. P. 242–256. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.08.059 (Date of access: 30.04.2024).
27. Novel pyrrolopyrimidine analogues as potent dipeptidyl peptidase IV inhibitors based on pharmacokinetic property-driven optimization / H. Xie et al. *Eur. J. Med. Chem.* 2012. Vol. 52. P. 205–212. DOI: 10.1016/j.ejmech.2012.03.015 (Date of access: 30.04.2024).
28. Rapid generation of a novel DPP-4 inhibitor with long-acting properties: SAR study and PK/PD evaluation / H. Xie et al. *Eur. J. Med. Chem.* 2017. Vol. 141. P. 519–529. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.10.029 (Date of access: 30.04.2024).
29. Synthesis and evaluation of [(1*R*)-1-amino-2-(2,5-difluorophenyl)ethyl]cyclohexanes and 4-[(1*R*)-1-amino-2-(2,5-difluorophenyl)ethyl]piperidines as DPP-4 inhibitors / P. Chen et al. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2011. Vol. 21. P. 1880–1886. DOI: 10.1016/j.bmcl.2010.12.060 (Date of access: 30.04.2024).
30. Sharma R., Soman S. S. Design and synthesis of sulfonamide derivatives of pyrrolidine and piperidine as anti-diabetic agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2015. Vol. 90. P. 342–350. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.11.041 (Date of access: 30.04.2024).

31. Synthesis and potent inhibitory activities of carboxybenzyl-substituted 8-(3-(R)-aminopiperidin-1-yl)-7-(2-chloro/cyanobenzyl)-3-methyl-3,7-dihydro-purine-2,6-diones as dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitors / D. W. Mo et al. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2015. Vol. 25. P. 1872–1875. DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.03.048 (Date of access: 30.04.2024).
32. Design, synthesis and biological evaluation of novel pyrimidinedione derivatives as DPP-4 inhibitors / N. Li et al. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2018. Vol. 28. P. 2131–2135. DOI: 10.1016/j.bmcl.2018.05.022 (Date of access: 30.04.2024).
33. [(S)-gamma-(4-Aryl-1-piperazinyl)-1-prolyl]thiazolidines as a novel series of highly potent and long-lasting DPP-IV inhibitors / T. Yoshida et al. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2007. Vol. 17. P. 2618–2621. DOI: 10.1016/j.bmcl.2007.01.110 (Date of access: 30.04.2024).
34. Fused bicyclic heteroaryl piperazine-substituted L-prolylthiazolidines as highly potent DPP-4 inhibitors lacking the electrophilic nitrile group / T. Yoshida et al. *Bioorganic Med. Chem.* 2012. Vol. 20. P. 5033–5041. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.06.033 (Date of access: 30.04.2024).
35. Discovery and preclinical profile of teneligliptin (3-[(2S,4S)-4-[4-(3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-5-yl)piperazin-1-yl]pyrrolidin-2-ylcarbonyl]thiazolidine): A highly potent, selective, long-lasting and orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes / T. Yoshida et al. *Bioorganic Med. Chem.* 2012. Vol. 20. P. 5705–5719. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.08.012 (Date of access: 30.04.2024).
36. Patel B. D., Bhadada S. V., Ghate M. D. Design, synthesis and anti-diabetic activity of triazolotriazine derivatives as dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors. *Bioorg. Chem.* 2017. Vol. 72. P. 345–358. DOI: 10.1016/j.bioorg.2017.03.004 (Date of access: 30.04.2024).
37. Discovery of triazole-based uracil derivatives bearing amide moieties as novel dipeptidyl peptidase-IV inhibitors / X. Deng et al. *Bioorg. Chem.*

2017. Vol. 75. P. 357–367. DOI: 10.1016/j.bioorg.2017.10.010 (Date of access: 30.04.2024).
38. Discovery of 3H-imidazo[4,5-c]quinolin-4(5H)-ones as potent and selective dipeptidyl peptidase IV (DPP-4) inhibitors: use of a carboxylate prodrug to improve bioavailability / Y. Ikuma et al. *Bioorg. Med. Chem.* 2015. Vol. 23. P. 779–790. DOI: 10.1016/j.bmc.2014.12.051 (Date of access: 30.04.2024).
39. Synthesis, biological assay *in vitro* and molecular docking studies of new imidazopyrazinone derivatives as potential dipeptidyl peptidase IV inhibitors / Y. Zhu et al. *Eur. J. Med. Chem.* 2010. Vol. 45. P. 4953–4962. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.09.009 (Date of access: 30.04.2024).
40. 3,5-Dihydro-imidazo[4,5-d]pyridazin-4-ones: a class of potent DPP-4 inhibitors / M. Eckhardt et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008. Vol. 18. P. 3158–3162. DOI: 10.1016/j.bmcl.2008.04.075 (Date of access: 30.04.2024).
41. Synthesis and biological evaluation of pyrazoline analogues with beta-amino acyl group as dipeptidyl peptidase IV inhibitors / M. A. Jun et al. *Eur. J. Med. Chem.* 2008. Vol. 43. P. 1889–1902. DOI: 10.1016/j.ejmech.2007.11.029 (Date of access: 30.04.2024).
42. Singh S. K., Manne N., Pal M. Synthesis of (s)-1-(2-chloroacetyl)pyrrolidine-2-carbonitrile: A key intermediate for dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Beilstein. J. Org. Chem.* 2008. Vol. 4. P. 20. DOI: 10.3762/bjoc.4.20 (Date of access: 30.04.2024).
43. Hydrolytic metabolism of cyanopyrrolidine DPP-4 inhibitors mediated by dipeptidyl peptidases / F. Kong et al. *Drug Metab. Dispos.* 2019. Vol. 47. P. 238–248. DOI: 10.1124/dmd.118.084640 (Date of access: 30.04.2024).
44. Pellegatti L., Sedelmeier J. Synthesis of vildagliptin utilizing continuous flow and batch technologies. *Org. Proc. Res. Dev.* 2015. Vol. 19. P. 551–554. DOI: 10.1021/acs.oprd.5b00058 (Date of access: 30.04.2024).

45. Pires D. E., Blundell T. L., Ascher D. B. PkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *J. Med. Chem.* 2015. Vol. 58(9). P. 4066–4072. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104> (Date of access: 30.04.2024).
46. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals / P. Banerjee et al. *Nucleic Acids Res.* 2018. Vol. 46. P. 257–263. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gky318> (Date of access: 30.04.2024).
47. Molecular docking and structure-based drug design strategies / L. Ferreira et al. *Molecules.* 2015. Vol. 20(7). P. 13384–13421. DOI: [10.3390/molecules200713384](https://doi.org/10.3390/molecules200713384) (Date of access: 30.04.2024).
48. Unique binding mode of Evogliptin with human dipeptidyl peptidase IV / H. K. Lee et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. Vol. 494(3). P. 452–459. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.101> (Date of access: 30.04.2024).

ДОДАТКИ



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ДИПЛОМ II СТУПЕНЯ

нагороджується

Шекера Катерина

у секційному засіданні студентського наукового товариства кафедри
медичної хімії

XXX Міжнародна науково-практична
конференція молодих вчених та студентів
**"Актуальні питання створення нових
лікарських засобів"**

В.о. ректора
Національного фармацевтичного
університету



Алла КОТВИЦЬКА

17-19 квітня 2024 р.
м. Харків



