

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ УКРАИНЫ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
факультет по подготовке иностранных граждан
кафедра медицинской химии**

**КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
на тему: «ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ВОЗМОЖНЫХ ПУТЕЙ
МЕТАБОЛИЗМА ПОТЕНЦИАЛЬНОГО КАНДИДАТА В АФИ С
НЕЙРОТРОПНЫМИ СВОЙСТВАМИ»**

Выполнила: соискательница высшего образования
группы Фм19(4,10д)і-08

специальности: 226 Фармация, промышленная фармация
образовательной программы Фармация

Фатима Эззахра ЭЛЬ ГАМХ

Руководитель: профессор заведения высшего образования
кафедры медицинской химии, д.фарм.н., профессор
Илья ПОДОЛЬСКИЙ

Рецензент: профессор заведения высшего образования
кафедры фармацевтической химии, д.фарм.н., профессор
Сергей ВЛАСОВ

Харьков – 2024 год

АННОТАЦИЯ

Проведено компьютерное прогнозирование возможных путей метаболизма потенциального ноотропа с психостимулирующими свойствами – этилового эфира 3-[(2-метил-4-оксо-1Н-хинолин-3-ил)метиламино]бензойной кислоты. Доказано, что молекула исследуемого вещества может интенсивно биотрансформироваться с участием ферментных систем цитохрома Р450. Наиболее вероятными путями биотрансформации являются гидролиз сложноэфирной группы с образованием соответствующей кислоты, ароматическое гидроксирование молекулы исследуемого вещества с участием атомов карбона как гетероциклической системы хинолона, так и фенильного фрагмента, а также окислительное дезаминирование аминометильного фрагмента с образованием соответствующего альдегида.

Ключевые слова: этиловый эфир 3-[(2-метил-4-оксо-1Н-хинолин-3-ил)метиламино]бензойной кислоты, метаболизм, биотрасформация, компьютерное прогнозирование.

ANNOTATION

Computer prediction of possible pathways of metabolism of a potential nootropic with psychostimulant properties - ethyl ester of 3-[(2-methyl-4-oxo-1H-quinolin-3-yl)methylamino]benzoic acid - has been carried out. It is proved that the molecule of the investigated substance can be intensively biotransformed with the participation of cytochrome P450 enzyme systems. The most probable pathways of biotransformation are hydrolysis of the ester group with formation of the corresponding acid, aromatic hydroxylation of the investigated substance molecule with participation of carbon atoms of both quinolone heterocyclic system and phenyl fragment, as well as oxidative deamination of aminomethyl fragment with formation of the corresponding aldehyde.

Key words: 3-[(2-methyl-4-oxo-1H-quinolin-3-yl)methylamino]benzoic acid ethyl ester, metabolism, biotransformation, computer prediction.

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
РАЗДЕЛ 1. НЕОБЫЧНЫЕ РЕАКЦИИ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И КАНДИДАТОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ (Обзор литературы)	7
1.1. Исследования биотрансформации при поиске и разработке лекарств	7
1.1.1. Методики изучения метаболизма лекарств	9
1.1.2. Необычные реакции биотрансформации	11
1.2. Краткий исторический обзор	12
1.3. Основные достижения последнего времени	15
1.3.1. Циклизация, димеризация, изомеризация	15
1.3.2. Восстановление	18
1.3.3. Другие необычные реакции биотрансформации	19
1.4. Современные проблемы и пробелы в знаниях	21
<i>Выводы к разделу 1</i>	24
РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	25
2.1. Синтез этилового эфира 3-[(2-метил-4-оксо-1Н-хинолин-3- ил)метиламино]бензойной кислоты	25
2.2. Фармакологические свойства этилового эфира 3-[(2-метил-4-оксо- 1Н-хинолин-3-ил)метиламино]бензойной кислоты	27
2.3. Использованные в работе онлайн-ресурсы компьютерного прогнозирования метаболизма	29
<i>Выводы к разделу 2</i>	34
РАЗДЕЛ 3. ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ВОЗМОЖНЫХ ПУТЕЙ МЕТАБОЛИЗМА ЭТИЛОВОГО ЭФИРА 3-[(2-МЕТИЛ-4-ОКСО- 1Н-ХИНОЛИН-3-ИЛ)МЕТИЛАМИНО]БЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ	36
<i>Выводы к разделу 3</i>	49
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	51
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	53
ПРИЛОЖЕНИЯ	61

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Квалификационная работа посвящена исследованию возможных путей метаболизма этилового эфира 3-[(2-метил-4-оксо-1Н-хинолин-3-ил)метиламино]бензойной кислоты как перспективного кандидата в АФИ с нейротропными свойствами.

С целью уменьшения рисков отзыва соединений-кандидатов в лекарства на стадии клинических испытаний в результате неблагоприятных метаболических характеристик молекул необходимы эффективные и надежные способы прогнозирования метаболизма молекулы биологически активного соединения *in silico*, *in vitro* и *in vivo*. Экспериментальные исследования возможных путей биотрансформации новых молекул *in vitro* и *in vivo* всегда являются нетривиальными и ресурсозатратными задачами. Именно поэтому применение компьютерного прогнозирования возможных путей метаболизма потенциального кандидата в лекарства на начальных этапах является вполне оправданным и эффективным подходом, который позволяет идентифицировать сайты метаболизма, прогнозировать структуры образующихся метаболитов, интенсивность метаболизма и специфичность субстратов к ферментам цитохрома Р450. Выбранная тематика квалификационной работы направлена на решение этих вопросов, что определяет ее актуальность.

Цель исследования. Прогнозирование возможных путей биотрансформации потенциального ноотропа с психостимулирующими свойствами – этилового эфира 3-[(2-метил-4-оксо-1Н-хинолин-3-ил)метиламино]бензойной кислоты.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести систематизацию и анализ научной литературы, посвященной метаболизму ксенобиотиков в организме человека, в частности, нетипичным реакциям биотрансформации лекарственных средств и кандидатов в лекарственные препараты.

2. Провести компьютерное прогнозирование возможных путей биотрансформации перспективного соединения – этилового эфира 3-[(2-метил-4-оксо-1Н-хинолин-3-ил)метиламино]бензойной кислоты (лабораторный шифр VAZ16_p05) с применением 5 онлайн-ресурсов,

находящиеся в свободном доступе.

3. На основе систематизации полученных результатов определить основные возможные пути метаболизма этилового эфира 3-[(2-метил-4-оксо-1Н-хинолин-3-ил)метиламино]бензойной кислоты.

4. На основе анализа совпадений и расхождений в результатах, полученных с помощью различных программных продуктов, определить соотнесенность основных трендов по биотрансформации.

Объект исследования. Перспективные биологически активные вещества ноотропного действия.

Предмет исследования. Возможные пути метаболизма этилового эфира 3-[(2-метил-4-оксо-1Н-хинолин-3-ил)метиламино]бензойной кислоты в организме человека.

Методы исследования:

1. Анализ и систематизация научной и патентной литературы.
2. *In silico* прогнозирование возможных путей биотрансформации ксенобиотиков в организме человека.
3. Методы экстраполяции и визуализации результатов прогнозирования возможных метаболитов.

Практическое значение получаемых результатов. Полученные результаты исследования расширяют знания о возможных путях метаболизма этилового эфира 3-[(2-метил-4-оксо-1Н-хинолин-3-ил)метиламино]бензойной кислоты, перспективного ноотропа с психостимулирующими свойствами. Полученные результаты могут значительно расширить и углубить понимание как фармакодинамических, так и фармакокинетических особенностей перспективного кандидата в АФИ при дальнейшем углубленном фармакологическом исследовании.

Элементы научных исследований. Впервые проведено компьютерное прогнозирование возможных путей биотрансформации перспективного кандидата в АФИ с нейротропными свойствами.

Апробация результатов исследования и публикации. Результаты выпускной квалификационной работы были представлены на секционном заседании кафедры медицинской химии в рамках XXX Международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов

«Актуальные вопросы создания новых лекарственных средств» (19 апреля 2024 г.).

Тезисы доклада опубликованы в сборнике конференции:

El Gamh Fatima Ezzahra, Podolsky Illya. Prediction of probable metabolic pathways of the potential candidate for an API with neurotropic properties. *Topical issues of new medicines development* : materials of XXX Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Students, Kharkiv, April 17-19 2024. Kharkiv : NUPh, 2024. P. 44–45.

Структура и объем квалификационной работы. Квалификационная работа состоит из введения, 3 разделов, общих выводов, списка использованных источников (63 наименования). Общий объем работы – 52 страницы. Работа содержит 1 схему и 15 рисунков.

РАЗДЕЛ 1. НЕОБЫЧНЫЕ РЕАКЦИИ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И КАНДИДАТОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ (Обзор литературы)

Биоконверсия ксенобиотиков была признана примерно 100 лет назад, и эти ранние исследования на животных и людях в основном касались малых молекул [1, 2]. Метаболизм лекарств начал привлекать внимание в 1950-х годах с особым акцентом на детоксикацию [3, 4] и взаимодействие лекарств с лекарствами [5].

В начале 1960-х годов были открыты цитохромы P450 (P450) как ферменты, метаболизирующие лекарственные препараты, а затем и другие оксидоредуктазы, не относящиеся к P450 [6]. Сегодня известно, что большинство лекарств на рынке метаболизируется P450, а альдегид-оксидаза (АО), UDP-глюкуронозилтрансферазы, сульфотрансферазы, N-ацетилтрансферазы вносят другой важный вклад [7]. Спустя сто лет после признания метаболизма лекарств исследования биотрансформации стали неотъемлемой частью исследований по открытию и разработке лекарств, что привело к значительному расширению коллективных знаний ученых в этой области. Прежде чем привести примеры некоторых из этих реакций биотрансформации, важно подчеркнуть важность исследований метаболизма для обеспечения пациентов безопасными и эффективными лекарствами.

1.1 Исследования биотрансформации при поиске и разработке лекарств

В процессе открытия и разработки лекарственных препаратов важно изучить и понять метаболизм лекарств и лекарственных кандидатов, чтобы оценить безопасность [8] и потенцию метаболитов лекарств [9], оценить потенциал лекарственного взаимодействия метаболитов [10], оптимизировать фармакокинетические свойства путем модуляции метаболических путей [11]

и минимизировать образование нежелательных метаболитов, таких как реактивные метаболиты [12].

Идентификация метаболитов и/или профилирование исследований, проводимых в ходе оптимизации лидеров и на ранних стадиях программ открытия лекарственных препаратов, могут сыграть важную роль в разработке новых химических соединений с улучшенными фармакокинетическими свойствами [13, 14]. Эти исследования обычно дополняются экспериментами по улавливанию метаболитов для оценки образования нежелательных реактивных метаболитов, которые из-за своей нестабильной природы не могут быть обнаружены в отсутствие улавливающих агентов и потенциально могут привести к неблагоприятным лекарственным реакциям у пациентов [15]. Основываясь на информации, полученной в ходе таких исследований, команды разработчиков лекарств могут оптимизировать структуру лекарственных кандидатов, чтобы блокировать пути, ведущие к образованию реактивных метаболитов, и/или ввести «мягкие места» в молекулу, чтобы перенаправить метаболические пути на образование стабильных метаболитов [16].

Для проверки безопасности метаболитов важно получить достаточную информацию как на доклиническом, так и на клиническом этапах, чтобы повысить уверенность в оценке человеческих (в частности, циркулирующих) метаболитов и обеспечить надлежащее тестирование этих метаболитов в доклинических токсикологических исследованиях, как указано в нормативных документах (Международная конференция по гармонизации, 2013; Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств, 2020). Хотя исследования *in vitro* и доклинические исследования *in vivo* дают значительные рекомендации в отношении потенциальных метаболитов человека, нередко в ходе клинических исследований возникают сюрпризы, связанные с образованием непропорционально большого количества метаболитов человека, что может потребовать синтеза таких метаболитов и их тестирования на безопасность в доклинических

токсикологических исследованиях при адекватных уровнях воздействия [8, 17].

1.1.1 Методики изучения метаболизма лекарств

Для изучения метаболизма новых химических веществ принято использовать доклинические виды, однако важно учитывать видовые различия в ферментативных путях, что может привести к недостоверной информации о метаболитах, образующихся у человека [18]. Поэтому на протяжении многих лет усилия были направлены на разработку систем *in vitro* с конечной целью повысить достоверность прогнозирования метаболитов у человека, определить ферменты, участвующие в метаболизме лекарственных препаратов, и свести к минимуму испытания на животных. В последние годы были достигнуты различные успехи в разработке таких систем *in vitro* для применения в исследованиях по профилированию и идентификации метаболитов [19]. Хотя в задачи данного обзора не входит составление полного перечня таких систем *in vitro*, вкратце упомянем несколько примеров.

Для изучения метаболизма, в частности, препаратов с низким клиренсом, было создано несколько систем *in vitro*, способных поддерживать метаболическую активность в течение длительного периода времени. Система кокультуры H9c1 и система микропаттернированной кокультуры HepatoPac – два примера таких систем, которые были успешно применены для изучения метаболизма лекарств [15]. В дополнение к этим 2D-системам, 3D-сфероиды печени были оценены на предмет их полезности в исследованиях биотрансформации [20], обеспечивая преимущество сохранения ферментативной активности в течение длительных периодов времени (>2 недель) [21]. Такие длительные инкубации дают возможность моделировать стабильные условия у человека с помощью «многократного дозирования» в системе, а также позволяют изучать малооборотные соединения и обнаруживать вторичные метаболиты. Использование 3D-сфероидов печени в сочетании с микрофизиологическими системами является альтернативным подходом, создающим еще более физиологически релевантную модель с

циркулирующей средой, имитирующей кровоток [22]. В таких системах «орган-на-чипе» комбинация нескольких отсеков, представляющих различные органы, может быть использована для изучения метаболизма с целью оценки путей образования и выведения различных метаболитов [23].

Хотя большинство моделей *in vitro* посвящено печеночному метаболизму, в настоящее время разрабатываются системы *in vitro* для изучения внепеченочного и, в частности, кишечного метаболизма, такие как криоконсервированные энтероциты, пермеабиллизированные криоконсервированные энтероциты человека (MetMax) и, совсем недавно, модель двенадцатиперстной кишки-чипа [15].

При обобщении методологий в инструментарии ученого, занимающегося биотрансформацией, невозможно обойтись без упоминания изотопного мечения, хотя этот подход не является новым. Стабильное изотопное или радиоизотопное мечение лекарств и лекарственных кандидатов – распространенная методология, помогающая всесторонне понять метаболические пути. Препараты, меченные радиоизотопами, позволяют обнаруживать метаболиты, которые не «видны» при других методах определения, и предоставляют количественную информацию [24]. С другой стороны, мечение стабильными изотопами может быть ценным для обнаружения неожиданных метаболитов, а также для понимания детального механизма реакций биотрансформации, и в нескольких примерах, представленных в этом обзоре, используется один или оба этих подхода к мечению (*vide ultra*).

Масс-спектрометрия используется в исследованиях биотрансформации уже более 50 лет, а с внедрением в систему жидкостной хроматографии жидкостная хромато-масс-спектрометрия стала стандартным аналитическим инструментом для анализа образцов, полученных в ходе исследований метаболизма, и постоянно развивается в направлении повышения чувствительности и эффективности обнаружения метаболитов, а также облегчения структурной идентификации. Масс-спектрометрия с циклической

ионной подвижностью, применяемая для разрешения изомерных ацилглюкуронидов, и онлайн-связь электромембранной экстракции с масс-спектрометрией для изучения метаболизма лекарств в сфероидах печени – вот два примера достижений, о которых недавно сообщалось в этой области [15]. Важно помнить, что жидкостная хроматография-масс-спектрометрия также может быть дополнительно объединена с ядерным магнитным резонансом (ЯМР), что позволяет эффективно определять однозначные характеристики метаболитов [25].

Нельзя недооценивать важность инструментов для прогнозирования *in silico* [26, 27] и автоматизированных (или полуавтоматических) пакетов идентификации метаболитов, помогающих ученым, занимающимся биотрансформацией, в их исследованиях по идентификации метаболитов [15]. Что касается ученых, занимающихся биотрансформацией, то по мере развития и совершенствования имеющихся инструментов и технологий роль ученых, занимающихся биотрансформацией, в открытии и разработке лекарственных препаратов остается и, скорее всего, будет оставаться важной, что недавно было подробно рассмотрено Kramlinger et al. [28].

1.1.2 Необычные реакции биотрансформации

Благодаря обширной работе, проделанной многими учеными, в частности, за последние 70 лет, наше понимание участия ферментов в метаболизме лекарств, кандидатов в лекарственные препараты и ксенобиотиков в целом значительно расширилось. Несмотря на эти обширные знания, ученые, работающие в области метаболизма лекарств, продолжают сообщать о необычных наблюдениях, приводящих к появлению неожиданных метаболитов или вовлечению ферментов, которые, как предполагается, не должны участвовать в метаболизме лекарств с определенными химическими мотивами. Чтобы повысить осведомленность и предупредить ученых, изучающих метаболизм лекарств, о таких неожиданных метаболитах, мы собрали ранее опубликованные (а в некоторых случаях и неопубликованные) необычные наблюдения и поделились ими с научным сообществом. Далее

представлены краткие сведения о предыдущих подборках, а также подборка недавних примеров.

1.2 Краткий исторический обзор

Хотя рассмотрение всего 200-летнего периода метаболизма лекарств, конечно, не входит в рамки данного обзора, важно помнить, что один из первых экспериментов по идентификации метаболитов был проведен Юстусом фон Либигом в 1829 году [15]. Ему удалось выделить гиппуровую кислоту из мочи лошадей. Промежуточный ацил-КоА-конъюгат бензойной кислоты в то время еще не был известен, но фон Либигу все же удалось продемонстрировать, что биоконверсия происходит *in vivo* (рис. 1). Возможно, в то время эта биоконверсия считалась необычной.

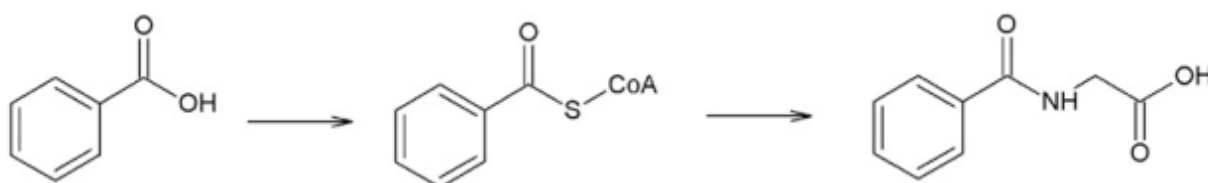


Рис. 1.1 Конверсия бензойной кислоты в гиппуровую кислоту у лошадей *in vivo*, о которой впервые сообщил Юстус фон Либиг в 1829 году

Спустя более 150 лет после этого исследования по идентификации метаболитов мне посчастливилось стать соавтором нескольких сборников необычных реакций биотрансформации, катализируемых ферментами P450 и не-P450, вместе с Ф. Питером Генгерихом, одним из основоположников метаболизирующих лекарственных препаратов. Несмотря на то, что мы называли эти реакции биотрансформации «необычными», в большинстве случаев начальный этап является довольно простым, катализируемым известным ферментом, метаболизирующим лекарственные препараты, например P450. Однако последующие химические шаги приводят к образованию неожиданного (отсюда и термин «необычный») конечного продукта-метаболита [15].

Химически обусловленные реакции внутримолекулярной перегруппировки могут приводить к расширению кольца, сужению кольца и даже образованию новых колец. К этой группе реакций, приводящих к образованию необычных метаболитов, можно добавить и димеризацию [15].

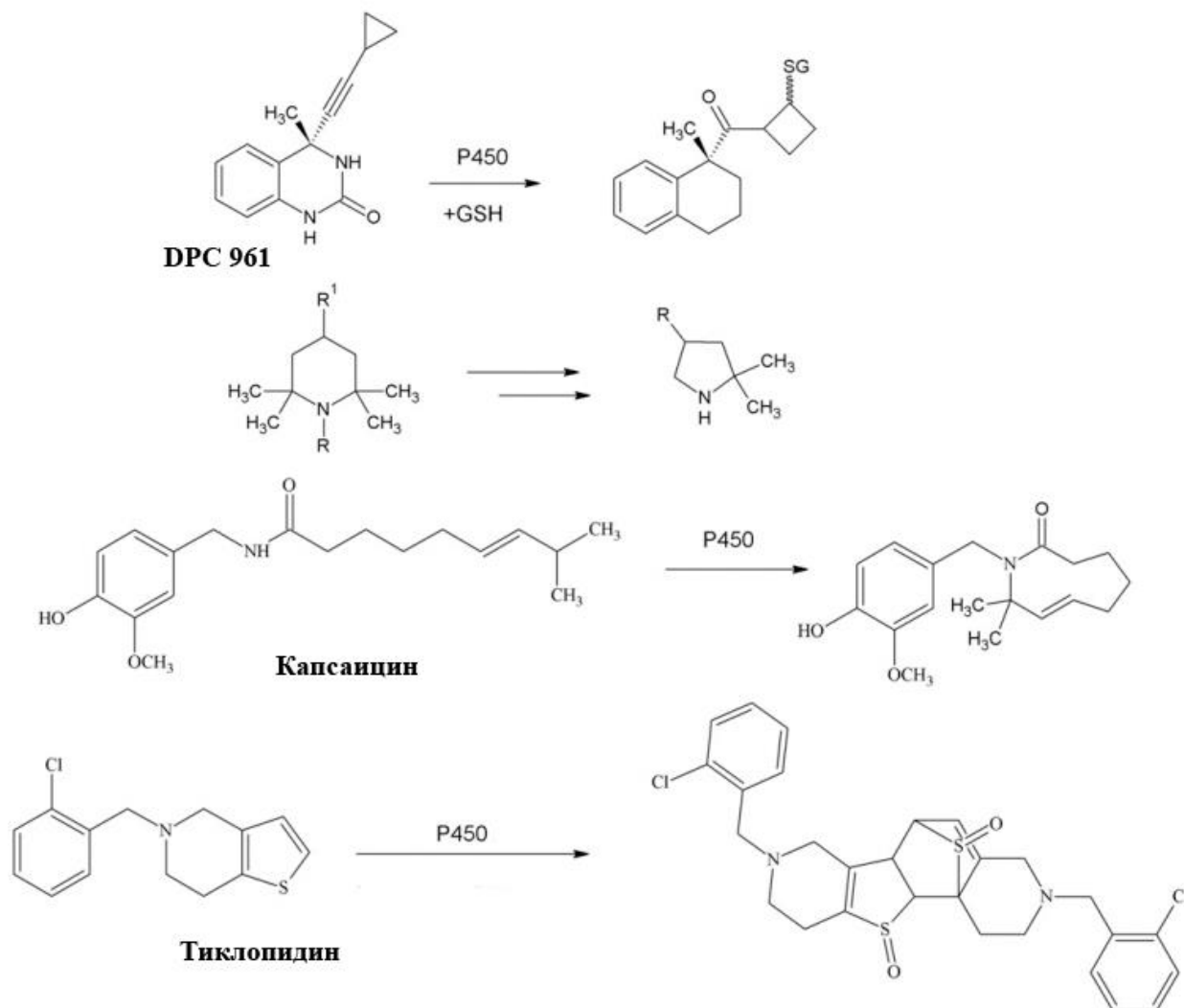


Рис. 1.2 Примеры реакций расширения, сужения и образования циклов, а также димеризации

В метаболизме лекарств часто встречаются реакции O- и N-деалкилирования, катализируемые в основном P450-опосредованным гидроксированием углерода альфа до гетероатома [29]. Однако из-за стабильной природы связи C-C деалкилирование C происходит довольно редко [30]. Двумя такими примерами реакций C-деалкилирования являются LC15-0133, ингибитор дипептидилпептидазы IV и аплидин, морской

природный продукт, оцениваемый на предмет его противоопухолевых и противовирусных свойств [15].

Хотя окислительный метаболизм является наиболее распространенным путем биотрансформации для представленных на рынке лекарств, способствуя выведению молекулы препарата из организма за счет увеличения гидрофильности, существуют и редкие примеры восстановительного метаболизма лекарств [15].

Было показано, что альдегид-оксидаза снижает уровень инсектицида имидаклоприда у лабораторных животных, а система N-гидроксиламин-редуктазы предположительно участвует в снижении уровня ингибитора тромбина ксимелагатрана, а впоследствии митохондриальный амидоксим-редуктазный компонент (mARC) был идентифицирован как недостающий компонент восстановительной системы [15].

Важно отметить, что реакции конъюгации также могут приводить к образованию необычных метаболитов. Преобразование ингибитора протонной помпы омепразола в пирдинилметилсульфеновую кислоту и имидазолиловый конъюгат глутатиона (GSH), как предполагается, инициируется ферментативной реакцией с GSH [31].

Сообщалось, что в метаболическом превращении (R)-флунаксопрофена в (S)-флуноксапрофен-1-O- β -глюкуронид участвует конъюгат ацил-КоА. В этом примере фермент эпимераза катализирует хиральную инверсию после образования тиоэфира ацил-КоА [32].

Метаболизм лекарственного препарата AZD6610 также включает промежуточное образование ацил-КоА-тиоэфира. В этом конкретном случае, по аналогии с метаболизмом жирных кислот, происходит укорочение 2-углеродной цепи, в результате чего образуется метаболит карбоновой кислоты [15].

1.3 Основные достижения последнего времени

Со времени публикации наших предыдущих обзоров на эту тему в литературе появилось множество других необычных метаболитов, и некоторые избранные примеры описаны далее. Некоторые подходы и технологии, использованные для выделения и определения характеристик этих необычных метаболитов, также упоминаются для некоторых, но не для всех примеров, чтобы избежать избыточности.

1.3.1 Циклизация, димеризация, изомеризация

Gu et al. сообщили о циклизации AZD7325, модулятора ГАМК_A2,3-рецепторов, в результате которой образуется долго циркулирующий метаболит [33]. α -Окисление углерода AZD7325 с последующей дегидратацией, как предполагается, приводит к образованию нестабильного промежуточного продукта, который подвергается окислительной циклизации с последующей ароматизацией с образованием метаболита M9. Интересно отметить, что M9 вместе с несколькими другими метаболитами либо не обнаруживались, либо обнаруживались как незначительные метаболиты в образцах плазмы после однократного приема человеком, в то время как эти метаболиты наблюдались как основные метаболиты после повторных доз. В этом исследовании авторы использовали диссоциацию, вызванную столкновением, в качестве метода ионизации в линейной ионной ловушке как часть системы жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии, используемой для идентификации метаболитов. Еще одна интересная реакция циклизации связана с образованием глутатионового аддукта вилдаглиптина, ингибитора дипептидилпептидазы-4, который, как сообщалось, вызвал идиосинкразическое повреждение печени у одного пациента в Японии [34]. Предполагаемый механизм образования тиазолинсодержащего метаболита M464 включает неферментативную химическую нуклеофильную атаку GSH на нитрильный мотив с последующим гидролизом и циклизацией аддукта GSH [35]. Также был обнаружен другой родственный метаболит M407, соответствующий цистеиновый аналог M464.

Эти два метаболита обнаруживаются в моче, кале и желчи крыс, и авторы предполагают, что вилдаглиптин может ковалентно реагировать с цистеиновыми остатками белков у человека, что могло сыграть роль в ранее зарегистрированном случае повреждения печени.

Еще одна такая реакция димеризации была недавно описана Такахаши и др. для GDC-0994, ингибитора киназ 1 и 2, регулируемых внеклеточным сигналом [36]. Образующиеся гомодимеры через связи C-C (M13) и C-N (M14) обнаруживаются в желчи и фекалиях, полученных в ходе исследований на крысах *in vivo*. На основании проведенной ими элегантной вычислительной работы авторы предположили, что образование димеров происходит путем tandemного поглощения N-H в активном сайте P450 3A4 с последующим радикальным соединением [37]. В данной работе для получения интересных метаболитов использовалась собственная система (BMO Production Kit, HepatoChem Inc., Beverly, MA) с применением металлоорганических катализаторов. После выделения метаболитов, помимо одномерной спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C , для однозначной характеристики метаболитов использовались двумерная корреляционная спектроскопия, гетероядерная спектроскопия корреляции одиночных квантов, гетероядерная спектроскопия корреляции кратных связей и спектроскопия эффекта Оверхаузера с вращающейся рамкой при комнатной температуре и при 335K. Повышение температуры помогло получить хорошо разрешенные спектры ЯМР, так как оба димерных метаболита при комнатной температуре давали широкие резонансы из-за ограниченного вращения связей. Для биотрансформации GDC-0575, ингибитора киназы контрольной точки 1, был предложен довольно сложный путь. Первым этапом метаболизма GDC-0575, как и во многих других случаях, является окисление, катализируемое ферментами P450. Образующийся эпоксид подвергается реакции циклизации, приводящей к промежуточному веществу 1, которое, в свою очередь, либо окисляется дальше, давая метаболит M12, либо вступает в реакцию с другой молекулой GDC-0575, давая димерный метаболит M17. Поскольку инкубации

с микросомами и экспрессированными Р450 не дали достаточного количества материала для характеристики интересующих метаболитов, авторы использовали подход химической деградации для получения М12 и М17 в количествах, недостаточных для структурной идентификации методом ЯМР [38].

Митрагинин – алкалоидный компонент травяной добавки, получаемой из листьев дерева *Mitragyna speciosa*, широко известной как крathom [39]. Одним из гидроксированных метаболитов митрагинина является 7-ОН митрагинин, который, как известно, обладает анальгетическим действием и, как предполагается, способствует привыканию к крathomу. Изучили стабильность и метаболизм 7-ОН митрагинина в плазме крови, пытаясь лучше понять фармакологические эффекты крathomа у людей. Было показано, что в плазме крови человека 7-ОН митрагинин превращается в метаболит, названный авторами псевдоиндоксилем митрагинина (рис. 3).

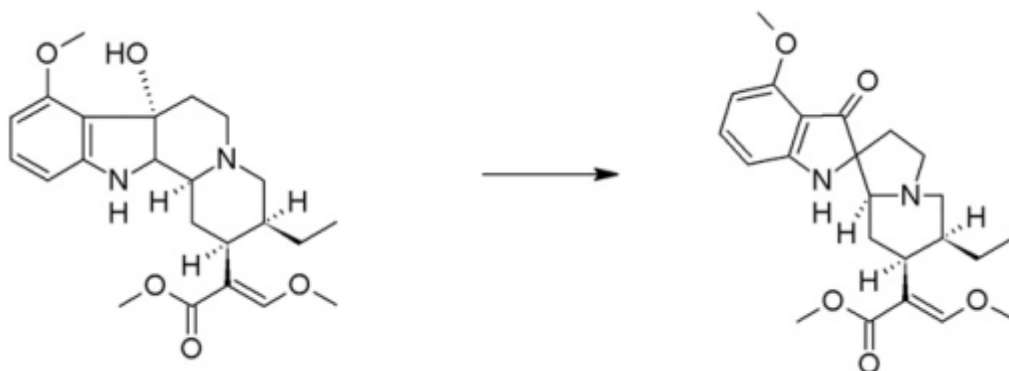


Рис. 1.3 Окисление 7-ОН митрагинина с последующей перегруппировкой с образованием метаболита митрагинина псевдоиндоксила

Этот метаболит был получен в результате инкубации 7-ОН митрагинина с плазмой крови человека с последующим выделением и очисткой с помощью препаративной тонкослойной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии для дальнейшей характеристики. Предполагается, что механизм реакции аналогичен перегруппировке семипинакола, о которой

ранее сообщалось в отношении митрагинина в грибах; однако природа ферментов плазмы, участвующих в этой реакции, неизвестна.

1.3.2 Восстановление

Как уже упоминалось, несмотря на то, что метаболизм большинства лекарств происходит по окислительным путям, в последние годы было зарегистрировано несколько примеров восстановительного метаболизма лекарств. Одним из таких примеров является восстановительное расщепление сульфаниламидного препарата SAM-760, антагониста серотониновых рецепторов подтипа 6, разрабатываемого для лечения болезни Альцгеймера [40]. Образование бензолсульфиновой кислоты (подтвержденное сравнением с аутентичным стандартом) как основного метаболита SAM-760 в гепатоцитах человека потенциально объясняется тиол-опосредованным восстановительным расщеплением арилсульфонамидного моетива из-за присутствия GSH или других тиолов, присутствующих в инкубации. Возможность нуклеофильного смещения арильного фрагмента была исключена на основании отсутствия каких-либо GSH или тиоловых аддуктов [40].

Микробиота кишечника может играть важную роль, в частности, в восстановительном метаболизме лекарств [41]. Недавний пример был представлен Guo et al. для такролимуса [42], широко используемого иммунодепрессанта для реципиентов почечного трансплантата. Метаболит M1, образующийся в результате восстановления кетонового молекула, был обнаружен в образцах стула как здоровых взрослых, так и реципиентов трансплантата почки и был оценен как гораздо менее мощный, чем такролимус. Авторы, основываясь на результатах бактериального скрининга, пришли к выводу, что большинство бактерий *Clostridiales* способны интенсивно метаболизировать такролимус, и этот восстановительный метаболизм в кишечнике может быть причиной низкой и изменчивой пероральной биодоступности такролимуса. Авторы получили M1 из инкубации с клетками *F. prausnitzii* (также принадлежащей к роду

Clostridiales). Помимо масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии, в данном исследовании использовалась инфракрасная спектроскопия, в частности, для подтверждения того, что M1 является продуктом карбонильного восстановления такролимуса. О вовлечении микробиоты кишечника в восстановительный метаболизм сообщалось и для LY3202626, ингибитора β -сайта белка-предшественника амилоида, расщепляющего фермент 1, который рассматривается в качестве потенциального средства для лечения ранней стадии болезни Альцгеймера [43]. LY3202626 превращается в M2, который вместе с M16 является наиболее распространенным метаболитом в кале и присутствует в качестве единственного источника радиоактивности в кале через 480 часов после введения LY3202626. Было показано, что метаболит M16 образуется при восстановлении M2 в гомогенатах фекалий в анаэробных условиях, и предполагается, что он реабсорбируется, что приводит к энтерогепатической рециркуляции. M16 переокисляется альдегид-оксидазой до M2 в печени, что может объяснить наблюдаемое медленное выведение радиоактивности в исследовании баланса массы тела, экскреции и метаболизма человека. В связи с участием альдегид-оксидазы в образовании M12 из M16, M16 инкубировали с цитозолем печени человека для выделения M2 для ЯМР-анализа.

Другой довольно редкий восстановительный путь включает mARC, и недавно было показано, что система mARC, упомянутая ранее в этом обзоре, может катализировать восстановление молекулы гидроксамовой кислоты до соответствующего амида для нескольких лекарств [44]. Одним из примеров такого пути восстановительного метаболизма является восстановление вориноната, ингибитора гистоновой деацетилазы [45].

1.3.3 Другие необычные реакции биотрансформации

Недавно Matsumoto et al. сообщили о редко наблюдаемом расщеплении связи C-C через окисление Бейера-Виллигера как ключевом этапе превращения нестероидного противовоспалительного препарата набуметона в его активный метаболит 6-метокси-2-нафтилуксусную кислоту [46]. В своем

исследовании авторы показали, что FMO5 участвует в биотрансформации 3-ОН набуметона в 6-метокси-2-нафтилуксусную кислоту через образование промежуточного альдегида 6-метоксинафталин-2-ил)ацетальдегида. Начальный окислительный этап до α -гидроксиметаболита (3-ОН-NAB) катализировался P450s 2B6, 2C18 и 3A4 [46]. Чтобы подтвердить промежуточность 6-метоксинафталин-2-ил)ацетальдегида, авторы провели эксперимент по захвату 3-ОН-NAB с человеческим FMO5 с последующим добавлением реагента для флуоресцентной маркировки, 4-(N,N-диметил-аминосульфонил)-7-гидразино-2,1,3-бензоксадиазола. Производное 4-(N,N-диметил-аминосульфонил)-7-гидразино-2,1,3-бензоксадиазола 3-ОН-NAB определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, соединенной с флуоресцентным детектором.

Было показано, что присоединение оксетанового молекула улучшает общие фармакокинетические и физико-химические свойства AZD1979 [47], антагониста рецептора 1 меланин-концентрирующего гормона. Хотя представленные метаболиты AZD1979 не являются необычными в структурном отношении, участие эпоксид-гидролазы и GST в образовании двух метаболитов, приводящих к раскрытию оксетанового и азетидинового колец соответственно, является довольно неожиданным. В качестве биокаталитической системы для синтеза M12 были выбраны фракции печени крысы S9 для дальнейшей характеристики, так как с помощью ультраэффективной жидкостной хроматографии с высоким разрешением масс-спектрометрии было показано, что одни и те же аддукты GSH образуются как во фракциях печени крысы S9, так и в гепатоцитах человека.

В ходе исследований I фазы с пимасертибом, ингибитором сигнальных белков MEK1 и 2 митоген-активируемого протеинкиназного пути, Scheible et al. обнаружили и зарегистрировали в общей сложности 14 различных метаболитов в образцах плазмы, мочи и кала при введении людям пимасертиба, меченного ^{14}C [48]. Один из этих метаболитов, M554, фосфоэтаноламиновый конъюгат пимасертиба, который обнаруживается в

качестве основного метаболита в плазме крови и моче, представляет особый интерес благодаря своей новой структуре. Авторам удалось идентифицировать структуру M554 с помощью ЯМР-спектроскопии после выделения и очистки из инкубации *in vitro* с клетками HepaRG, а также сравнения с химически синтезированным аутентичным стандартом предложенной структуры. Хотя точный механизм образования M554 неизвестен, одним из предполагаемых путей является вовлечение пимасертиба в липидный метаболизм, а точнее в путь Кеннеди, благодаря наличию пропандиолового фрагмента, структурно сходного с глицерином [49].

1.4 Современные проблемы и пробелы в знаниях

В течение многих лет усилия по поиску лекарственных средств и изучению биотрансформации были сосредоточены на «традиционных» перорально биодоступных малых молекулах, которые попадали в химическое пространство, описываемое правилом 5 Липински [50]. Однако по мере расширения разнообразия целей, представляющих интерес для фармацевтической промышленности, стало необходимо расширять как химическое пространство, так и разнообразие методов воздействия на цели, которые ранее считались не поддающимися лечению [15].

Расширение спектра лекарственных средств за пределы «традиционных» малых молекул требует разработки альтернативных систем *in vitro* для изучения свойств всасывания, распределения, метаболизма и выведения таких молекул, а также учета ферментативных путей, которые могут довольно сильно отличаться от тех, что участвуют в метаболизме малых молекул. Такие молекулы, как пептиды и пептидомиметики, терапевтические средства на основе олигонуклеотидов, белки и антитела, а также конъюгаты антитело-лекарство, метаболизируются (или катаболизируются) протеазами, пептидазами или нуклеазами. В недавних публикациях описаны различные подходы к изучению биотрансформации белковых терапевтических

препаратов [51], антисмысловых олигонуклеотидов, N-ацетилгалактозамин-конъюгированных малых интерферирующих РНК [15].

Конечно, продукты, образующиеся в результате деградации этих крупных молекул, можно прогнозировать, однако для проведения таких исследований биотрансформации требуются иные системы *in vitro*, аналитические подходы и знания ферментов и путей биотрансформации, чем для «традиционных» малых молекул, и поэтому в контексте данного обзора они могут рассматриваться как необычные. Например, все 10 антисмысловых олигонуклеотидов (АСО), одобренных на сегодняшний день Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, деградируют в основном под действием эндонуклеаз и экзонуклеаз в кровотоке и клетках-мишенях [52].

Фомивирсен – АСО первого поколения, разработанный в качестве противовирусного средства, по имеющимся данным, метаболизируется или, скорее, деградирует в сетчатке глаза путем расщепления фосфодиэфирных связей экзонуклеазами [15]. Мипомерсен – это АСО второго поколения, разработанный для лечения семейной гиперхолестеринемии и обладающий повышенной устойчивостью к деградации под действием нуклеаз по сравнению с АСО первого поколения [15].

Метаболизм мипомерсена включает деградацию сначала под действием эндонуклеаз, а затем экзонуклеаз, и метаболиты, как сообщается, выводятся с мочой [53]. Сообщалось, что эндонуклеазы и экзонуклеазы участвуют в метаболизме элуфорсена, разработанного для хронического ингаляционного лечения пациентов с муковисцидозом. Интересно, однако, что дополнительные метаболиты, образующиеся в результате окисления фосфодиэфирных связей элуфорсена, были также обнаружены в образцах легких мышей, полученных в ходе исследований *in vivo* [15].

К списку этих альтернативных методов можно также добавить таргетные белковые деграданты (химеры, нацеленные на протеолиз), которые

по своим физико-химическим свойствам довольно сильно отличаются от традиционных малых молекул [54].

В рамках усилий по оптимизации фармакокинетического профиля маломолекулярных лекарственных препаратов и минимизации потенциала лекарственного взаимодействия с жертвами метаболические пути все большего числа лекарственных кандидатов смещаются в сторону ферментов, не относящихся к P450, таких как АО. Хотя метаболиты, образующиеся под действием АО, во многих случаях предсказуемы, трудности с прогнозированием фармакокинетики препаратов, метаболизирующихся преимущественно под действием АО, заставили исследователей сосредоточиться на улучшении понимания метаболизма лекарств, опосредованного этими ферментами. Помимо АО, моноаминоксидаза и ксантиноксидоредуктаза являются другими ферментами, не относящимися к P450, которые необходимо учитывать при окислительном метаболизме лекарств [15]. Хотя об этом известно уже давно, важность участия микробиоты в метаболизме лекарств также получает все большее признание, и усилия направлены на разработку систем *in vitro* и лучшее понимание участия бактерий кишечника в метаболизме лекарств. В одной из недавних публикаций авторы сообщили о своих исследованиях метаболитов ресвератрола в кишечнике человека [55]. В этой работе были собраны образцы кала здоровых добровольцев и приготовлены фекальные суспензии. Интересующие соединения инкубировали в фекальных культурах в анаэробических условиях, а образцы анализировали с помощью ультраэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии и газовой хромато-масс-спектрометрии. Результаты идентификации метаболитов в системе *in vitro* подтвердили результаты исследований *in vivo*.

Прогресс в области прогностических подходов, основанных на искусственном интеллекте, в значительной степени зависит от наличия качественных, хорошо хранимых и пригодных для повторного использования данных, а сбор информации о путях биотрансформации и метаболитах в

структурно-поисковом виде – дело не простое. Внедрение специализированных корпоративных баз данных биотрансформации имеет решающее значение для максимизации ценности, которую можно извлечь из исследований биотрансформации, проводимых в течение многих лет в фармацевтической компании [15].

Выводы к разделу 1

1. Проведена систематизация и анализ научной литературы, посвященной метаболизму ксенобиотиков в организме человека, в частности, нетипичным реакциям биотрансформации лекарственных средств и кандидатов в лекарственные препараты.

2. Проведенный анализ подтверждает важность детального и исчерпывающего изучения биотрансформации перспективных кандидатов в лекарственные препараты на ранних этапах их разработки.

РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования является этиловый эфир 3-[(2-метил-4-оксо-1Н-хинолин-3-ил)метиламино]бензойной кислоты (лабораторный шифр VAZ16_p05), синтезированный доцентом кафедры медицинской химии, д. фарм. н. Зубковым В. А. (рис. 2.1).

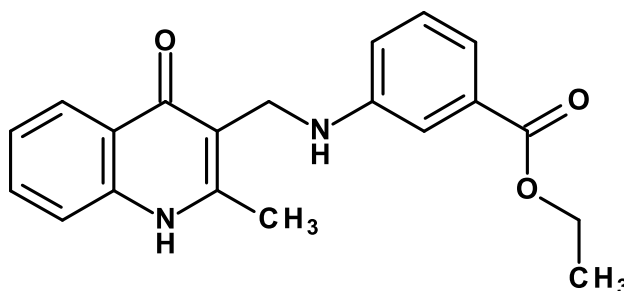


Рис. 2.1 Структурная формула этилового эфира 3-[(2-метил-4-оксо-1Н-хинолин-3-ил)метиламино]бензойной кислоты (VAZ16_p05)

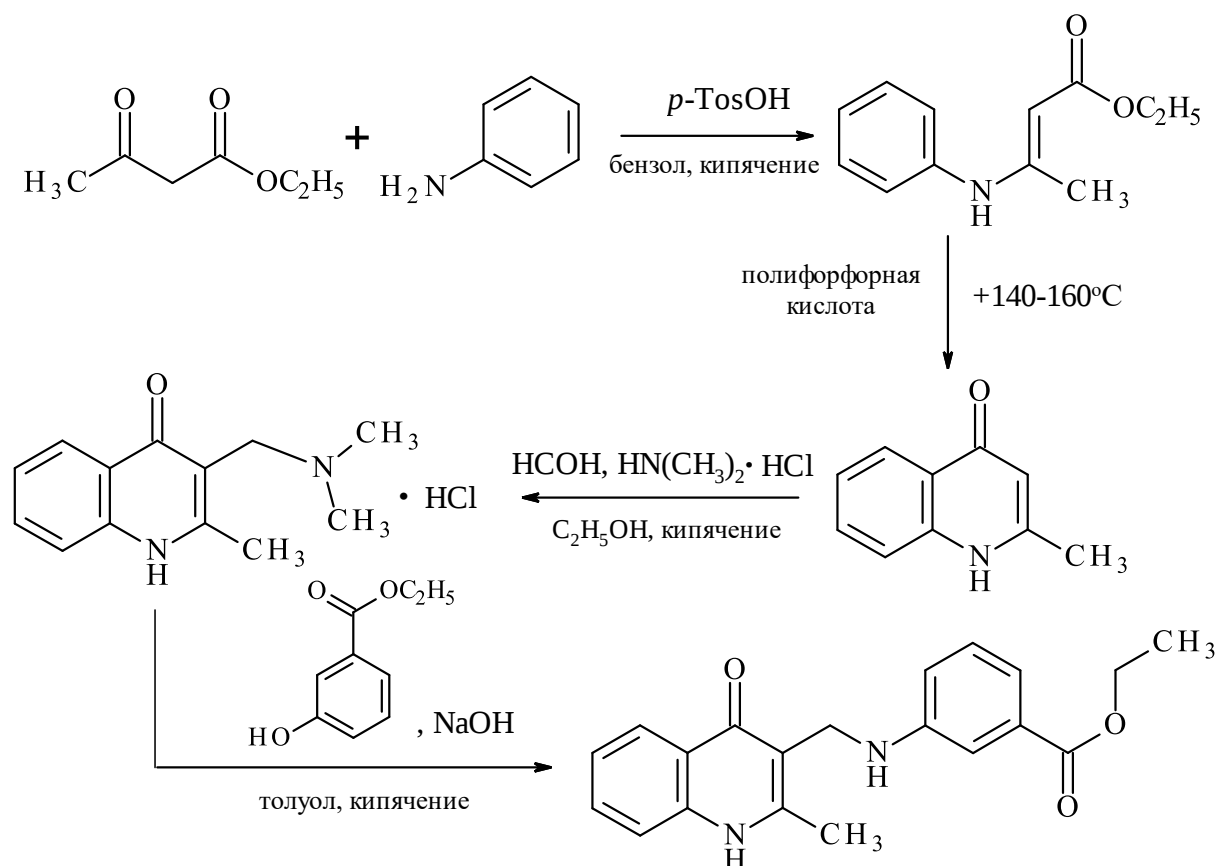
2.1 Синтез этилового эфира 3-[(2-метил-4-оксо-1Н-хинолин-3-ил)метиламино]бензойной кислоты

В качестве исходного соединения для синтеза использован 2-метил-1Н-хинолин-4-он, который аминометилировали в условиях реакции Манниха [56], а получено основание Манниха (3-диметиламинометил-2-метил-1Н-хинолин-4-она гидрохлорид) при переаминировании этиловым эфиром *м*-аминобензойной кислоты образует целевой этиловый эфир 3-[(2-метил-4-оксо-1Н-хинолин-3-ил)метиламино]бензойной кислоты (схема 2.1).

Известно, что безальтернативно реакция Манниха протекает только при использовании вторичных аминов, тогда как аммиак и первичные амины могут реагировать с заменой всех атомов водорода, стоящих у атома азота. Показано, что взаимодействие 2-метил-1Н-хинолин-4-она с первичными алифатическими аминами, анилинами, а также с диэтиламином в классических условиях реакции Манниха приводит к образованию главным образом побочных продуктов, нерастворимых в большинстве органических растворителей. Известно также, что основания Манниха могут быть

использованы в качестве алкилирующих агентов в реакциях с аминами и метиленактивными соединениями. Особенно легко алкилирование происходит в случае, если основание Манниха образовано амином, который в дальнейшем может легко отщепляться, например диметиламином [56].

Схема 2.1



Гидрохлорид 3-диметиламинометил-2-метил-1H-хинолин-4-она был получен двумя способами: кипячением в этаноле 2-метилхинолин-4-она с формальдегидом и гидрохлоридом диметиламина (способ А), а также аминометилированием 2-метил-1H-хинолин-4-она хлоридом N,N-диметилимония (способ Б) [56].

Гидрохлорид 3-диметиламинометил-2-метил-1H-хинолин-4-она при кипячении в присутствии порошкообразного NaOH в толуоле легко вступает в реакцию переаминирования с первичными алифатическими аминами, анилинами и диэтиламино, образуя целевые 3-NR-аминометильные производные хинолонов. Конец реакции определяют по окончании выделения диметиламина из реакционной среды [56].

Ключевой интермедиат можно получить при взаимодействии свободного основания с первичными аминами и диэтиламином в кипящем толуоле (способ Б). Однако суммарный выход конечных продуктов по этому способу в пересчете на гидрохлорид оказался значительно ниже выходов синтезов с использованием непосредственно самого гидрохлорида. Это, вероятно, связано с высокой растворимостью 3-диметиламинометил-2-метил-1Н-хинолин-4-она в воде и, как следствие, с потерями вещества на стадии получения свободного основания [56].

Структура и индивидуальность этилового эфира 3-[(2-метил-4-оксо-1Н-хинолин-3-ил)метиламино]бензойной кислоты подтверждены методами ^1H ЯМР спектроскопии и тонкослойной хроматографии.

2.2 Фармакологические свойства этилового эфира 3-[(2-метил-4-оксо-1Н-хинолин-3-ил)метиламино]бензойной кислоты

Перспективным объектом фармакологического изучения исследуемое вещество стало на основании результатов комплексного скринингового исследования его психо- и нейротропных свойств, проведенного профессором кафедры медицинской химии, д. фарм. н. Подольским И.Н.

Скрининг проведен на белых нелинейных мышах в дозах 10 и 100 мг/кг с использованием тестов открытого поля, приподнятого крестообразного лабиринта, ротарод-теста, иммобилизационного теста Порсолта и условной реакции пассивного избегания на фоне скополамин-индуцированной амнезии. В конце скрининга исследовали влияние молекулы на продолжительность жизни мышей на модели острой нормобарической гипоксической гипоксии с гиперкапнией [57].

Результаты исследования VAZ16_p05 в тесте открытого поля выявили психотропную неиндифферентность исследуемого соединения. Показано, что влияние на показатель локомоторной активности животных, а именно количество пересечённых квадратов, носит дозозависимый характер. Следует заметить, что с животными интактного контроля нет достоверных различий

животных, которым вводили дозу 10 мг/кг, хотя по средним показателям экспериментальная группа пересекала практически в 1,5 раза больше квадратов, однако вследствие большой дисперсии результатов такое различие не является достоверным. Животные на фоне дозы 100 мг/кг достоверно в 1,46 ($p < 0,05$) больше перемещались по арене (рис. 2.2).

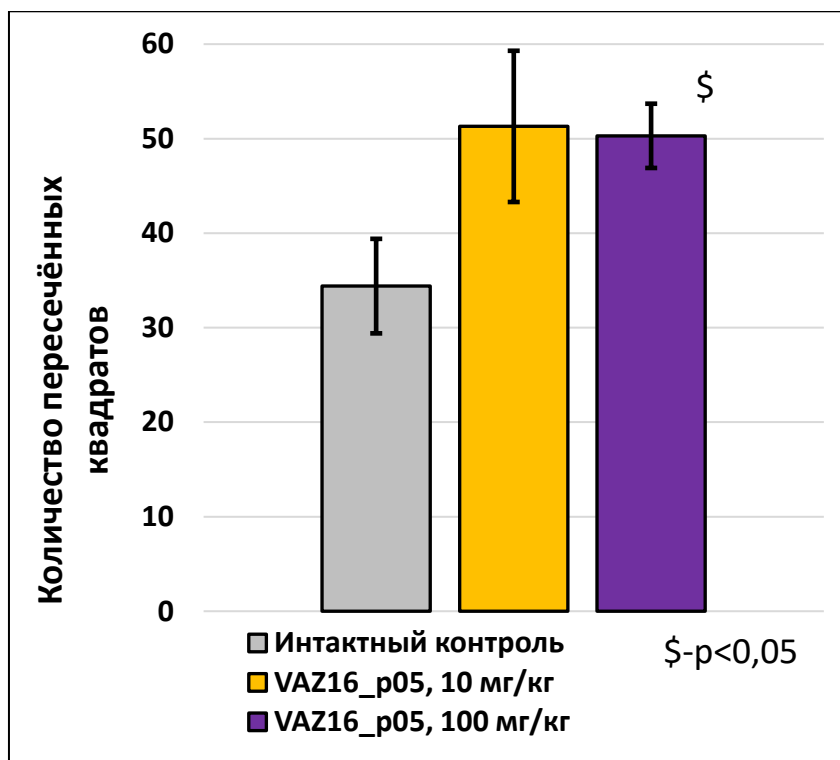


Рис. 2.2 Влияние VAZ16_p05 на количество обследованных животными отверстий в тесте открытого поля

Другие показатели тета открытого поля в экспериментальных группах в обеих дозах отличались от интактного контроля в большую сторону, что в итоге сказалось на интегральном показателе всех видов активности: в 100 мг/кг VAZ16_p05 приводил к достоверному его повышению практически на 30 % ($p < 0,05$).

По результатам теста условной реакции пассивного избегания на фоне скополамин-индуцированной амнезии VAZ16_p05 в дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг достоверно выявил антиамнестический эффект, а антиамнестическая активность составила 61,5 % и 57,6 % ($p < 0,05$) соответственно (рис. 2.3).

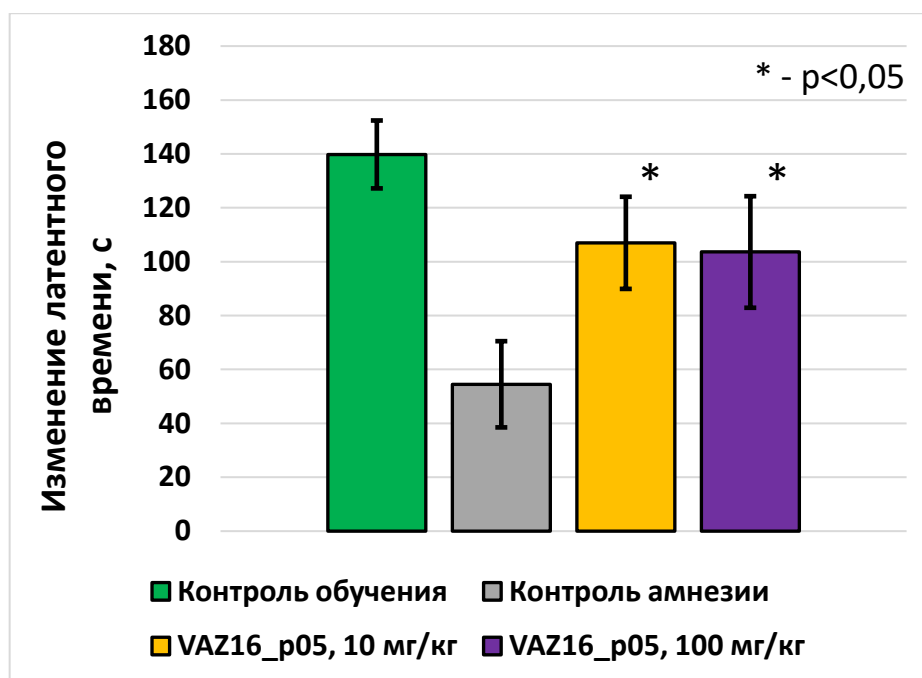


Рис. 2.3 Результаты исследования VAZ16_p05 в тесте условной реакции пассивного избегания на фоне скополамин-индуцированной амнезии

Таким образом, результаты проведенного комплексного скринингового исследования [57] показали перспективность углубленного исследования VAZ16_p05 в дозе 100 мг/кг (по сумме активностей) как перспективного ноотропа с психостимулирующими свойствами.

2.3 Используемые в работе онлайн-ресурсы компьютерного прогнозирования метаболизма

SMARTCyp (https://smartcyp.sund.ku.dk/mol_to_som)

SMARTCyp 3.0 – это обновленная версия веб-сервера для прогнозирования сайтов метаболизма для опосредованного цитохромом P450 метаболизма, теперь на языке Python 3 с увеличенным структурным покрытием и новыми возможностями [58]. Программа SMARTCyp – это первый метод, основанный на принципах теории функционала плотности, использующий энергии активации для более чем 250 молекул для определения наиболее вероятного места метаболизма. Новые функции включают меру сходства между молекулой запроса и фрагментом модели, новый графический

интерфейс и дополнительные параметры, расширяющие структурное покрытие программы SMARTCyp [58].

SMARTCyp не требует трехмерных структур молекулы, и хотя он подтвержден экспериментальными данными, его реализация не зависит от них [58]. Идея SMARTCyp заключается в том, что энергии активации CYP, реагирующих с фрагментами лигандов, рассчитанные квантово-химическими методами, являются наилучшей возможной ссылкой на реакционную способность фрагмента. Справочные данные квантово-химических расчетов для веществ имеют очень высокое отношение сигнал/шум, поскольку в данных отсутствуют экспериментальные ошибки или так называемые «ложные негативы». Результаты очень легко интерпретировать, поскольку чем ниже энергии активации, тем больше вероятность того, что сайт будет метаболизирован [58].

Если оригинальная программа SMARTCyp была написана на Java с использованием библиотеки Chemistry Development Kit (CDK), то SMARTCyp 3.0 написана на Python с использованием библиотеки RDKit. CDK и RDKit по-разному обрабатывают ароматичность и, соответственно, существует разница в том, каким атомам соответствуют шаблоны SMARTS, например, из-за разной типизации атомов. Для обеспечения обратной совместимости различия в правилах SMARTS, обнаруженные CDK и RDKit для всех сайтов, были определены для тестового набора из 475 субстратов 3A4. Каждое расходящееся правило SMARTS было проанализировано отдельно и сравнено с соответствующей молекулой и субструктурой, из которой она была создана, и, при необходимости, исправлено. SMARTCyp 3.0, использующий обновленные правила SMARTS, имеет производительность, равную предыдущей версии программы [58].

Xenosite (<https://xenosite.org>)

XenoSite – это подход к моделированию метаболизма P450, основанный на машинном обучении [59]. Используя нейронную сеть, модели XenoSite обучаются на самом большом наборе общедоступных данных о метаболизме

P450, включающем более 680 соединений, аннотированных с помощью SOM для изоферментов P450 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 и 3A4, а также микросом печени человека (HLM), которые объединяют отдельные модели P450, чтобы представить ожидаемый метаболизм соединений *in vivo*. В экспериментах с перекрестной проверкой XenoSite определяет экспериментально наблюдаемые SOM в двух верхних ранговых позициях для наборов субстратов каждого изофермента P450 с высокой точностью: 87,1%, 85,7%, 83,4%, 88,7%, 86,7%, 89,0%, 88,5%, 83,5%, 87,6% и 89,4%, соответственно, по этим изоферментам [59].

Сервер XenoSite позволяет представлять молекулярные структуры в формате SMILES или SDF, либо через загрузку файла, либо путем ввода или вставки молекул в любом формате на веб-сайт. Формат SMILES и SDF – это распространенные химические форматы, для которых существует несколько общедоступных библиотек [59].

XenoSite предоставляет результаты прогнозирования в виде таблицы с семью столбцами. Первый столбец – название молекулы или номер, соответствующий порядку ввода молекул, если названия не указаны в SDF или SMILES. Второй столбец - номер атома во входной молекуле. Третий столбец содержит числовые метки, которые группируют атомы по общей топологии или являются частью одной реакции. В четвертом столбце указана вероятность метаболизма, которую прогнозирует XenoSite [59]. Пятый столбец содержит тип атома. Шестой столбец - булево значение, указывающее, аннотирован ли данный атомный сайт как известный SOM из литературных источников, использованных при обучении моделей прогнозирования XenoSite. Последний столбец – это фоновая вероятность наблюдения сайта метаболизма с учетом модели, которая может быть использована для интерпретации или изменения масштаба прогнозирования [59].

Biotransformer (<http://biotransformer.ca>)

BioTransformer – программное средство с открытым доступом и веб-сервис со свободным доступом для точного и всестороннего прогнозирования метаболизма *in silico* и идентификации метаболитов [60].

BioTransformer 3.0 – это универсальный инструмент прогнозирования метаболизма *in silico*. Он в основном предназначен для прогнозирования процессов биотрансформации в организме человека (или млекопитающих), происходящих в результате первичного или вторичного метаболизма. BioTransformer 3.0 также поддерживает прогнозирование биотрансформаций химических веществ, созданных человеком [60].

BioTransformer 3.0 можно использовать не только для прогнозирования структур метаболитов или побочных продуктов метаболизма, но он также может помочь в идентификации молекул с помощью строчной фильтрации SMILES, фильтрации молекулярных формул и/или оконной массовой фильтрации на основе рассчитанных структур, химических формул или масс прогнозируемых продуктов. Результаты BioTransformer 3.0 также предоставляют информацию о ферментативном или биологическом происхождении и реакционных процессах, ответственных за прогнозируемые продукты [60].

BioTransformer 3.0 очень прост в использовании. Пользователи вводят одну молекулярную структуру (используя SMILES или SDF-файл), а веб-сервер выдает интерактивную таблицу прогнозируемых метаболитов или продуктов трансформации с возможностью сортировки вместе с уравнением(ями) реакции, типами реакций и ферментами или биологическими процессами, которые, как предполагается, ответственны за эти реакции. BioTransformer 3.0 принимает большинство типов структур малых молекул в качестве входных данных, но молекула должна быть органической, иметь молекулярную массу <1500 D и не должна быть смесью. В дополнение к созданию удобной для навигации таблицы выходных данных, также доступны разнообразные файлы для загрузки (в форматах JSON, CSV и SDF),

содержащие дополнительную или более подробную информацию для прогнозирования метаболитов. Расчеты BioTransformer обычно занимают менее минуты, но для более сложных прогнозов биотрансформации с большим количеством итераций и/или с гораздо большими молекулами эти расчеты могут занять до 30 минут [60].

GLORYx (<https://nerdd.zbh.uni-hamburg.de>)

GLORY включает новый набор правил реакции для CYP-опосредованного метаболизма, благодаря чему общие типы реакций отличаются от более необычных реакций [61].

Концепция GLORYx заключается в том, что с помощью FAME 3 прогнозируются SoM, или, точнее, вероятность того, что каждый тяжелый атом является SoM, и на основе этих прогнозов применяется набор правил реакции для генерирования структур прогнозируемых метаболитов как для фазы 1, так и для фазы 2 метаболизма. Для инструмента прогнозирования метаболитов, ориентированного на CYP, GLORY, показано, что использование прогнозируемых вероятностей SoM как жесткого критерия для определения того, нужно ли применять правило реакции в данной позиции, не является особенно эффективным подходом, за исключением случаев, когда целью является просто уменьшить количество прогнозов [61]. Зато использование прогнозируемых вероятностей SoM для оценки и ранжирования прогнозируемых метаболитов позволило получить обоснованное ранжирование прогнозируемых метаболитов, при этом сохранив высокий уровень узнаваемости уже известных метаболитов. Поэтому используются прогнозируемые вероятности SoM для ранжирования метаболитов, предсказанных GLORYx. Для GLORYx существует возможность использовать различные модели прогнозирования FAME 3 SoM в зависимости от того, какая фаза метаболизма прогнозируется [61].

GLORYx был разработан и проанализирован с использованием большого набора референтных данных, содержащего данные о метаболизме из DrugBank и MetXBioDB. Этот набор референтных данных был использован

для изучения метаболизма фазы 1 и фазы 2 отдельно, чтобы убедиться, что каждая фаза может удовлетворительно обрабатываться отдельно, а также определить, как лучше всего совместить прогнозы для обеих фаз. Окончательная валидация GLORYx была впоследствии проведена на наборе тестовых данных, которые были отобраны вручную [61].

Way2Drug SOMP/RA (<http://www.way2drug.com/RA>)

Way2Drug SOMP/RA обеспечивает прогнозирование реагирующих атомов в реакциях алифатического и ароматического гидроксирования, N- и O-глюкуронирования, N-, S- и C-окисления, а также N- и O-деалкилирования [62]. Химическая структура может быть загружена одним из трех различных способов: рисование в Marvin, ввод в виде SMILES-строк или загрузка в виде файла в формате MDL (Biovia) Molfile [62]. Результаты прогнозирования отображают структуру с пронумерованными атомами и таблицу с вероятным спектром реакции биотрансформации. Этот спектр рассчитывается программным обеспечением PASS на основе SAR-анализа учебного набора, содержащего более 3500 субстратов цитохромов P450 и УДФ-глюкуронозилтрансфераз. Средняя точность предсказания в перекрестной валидации LOO (IAP) составляет 0,86 [62]. Нажав на название реакции, пользователь получает таблицу с прогнозом реагирующих атомов выбранного класса реакции. Эта таблица включает атомы и их ранги в соответствии с вероятностью быть реагирующими атомами выбранного класса реакции. Пользователю предоставляется выпадающее меню с топ-метрикой. Атомы, которые соответствуют выбранному пункту меню, подсвечиваются на структуре [62].

Выводы к разделу 2

1. Охарактеризован метод синтеза этилового эфира 3-[(2-метил-4-оксо-1H-хинолин-3-ил)метиламино]бензойной кислоты (лабораторный шифр VAZ16_p05).

2. Обоснована перспективность углубленного фармакологического изучения VAZ16_p05 как потенциального ноотропа с психостимулирующими свойствами.

3. Проведён анализ алгоритмов использованных в работе онлайн-ресурсов компьютерного прогнозирования возможных путей метаболизма в организме человека и обоснован их выбор.

РАЗДЕЛ 3. ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ВОЗМОЖНЫХ ПУТЕЙ МЕТАБОЛИЗМА ЭТИЛОВОГО ЭФИРА 3-[(2-МЕТИЛ-4-ОКСО-1Н- ХИНОЛИН-3-ИЛ)МЕТИЛАМИНО]БЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ

Для прогнозирования возможных путей биотрансформации перспективного соединения – этилового эфира 3-[(2-метил-4-оксо-1Н-хинолин-3-ил)метиламино]бензойной кислоты (лабораторный шифр VAZ16_p05), применено пять различных онлайн-ресурсов, которые находятся в свободном доступе, а именно:

- 1) Xenosite (<https://xenosite.org/>);
- 2) SMARTCyp (https://smartcyp.sund.ku.dk/mol_to_som);
- 3) Way2Drug RA (<http://www.way2drug.com/RA>);
- 4) Biotransformer 3.0 (<http://biotransformer.ca>);
- 5) GLORYx (<https://nerdd.zbh.uni-hamburg.de>).

По результатам прогнозирования возможных путей метаболизма VAZ16_p05 с помощью онлайн сервиса Xenosite наиболее вероятным направлением биотрансформации молекулы является гидролиз сложноэфирной группы до соответствующей кислоты (рис. 3.1), что в последующих биотрансформационных итерациях создаёт возможность для глюкуронирования. Вариантами нестабильного окисления возможно предположить, помимо также гидролиза, окислительное дезаминирование аминометильного фрагмента с образованием соответствующего альдегида (рис. 3.1). Среди направлений, реализуемых по пути стабильного окисления, следует выделить невысокую вероятность ароматического гидроксирования как гетероциклической системы, так и фенильного фрагмента (рис. 3.1).

Обращает на себя внимание тот факт, что, согласно расчетам, все изоформы CYP могут с невысокой, но значимой вероятностью катализировать алифатическое гидроксирование метильной группы в положении 2 хинолонового цикла (рис. 3.1).

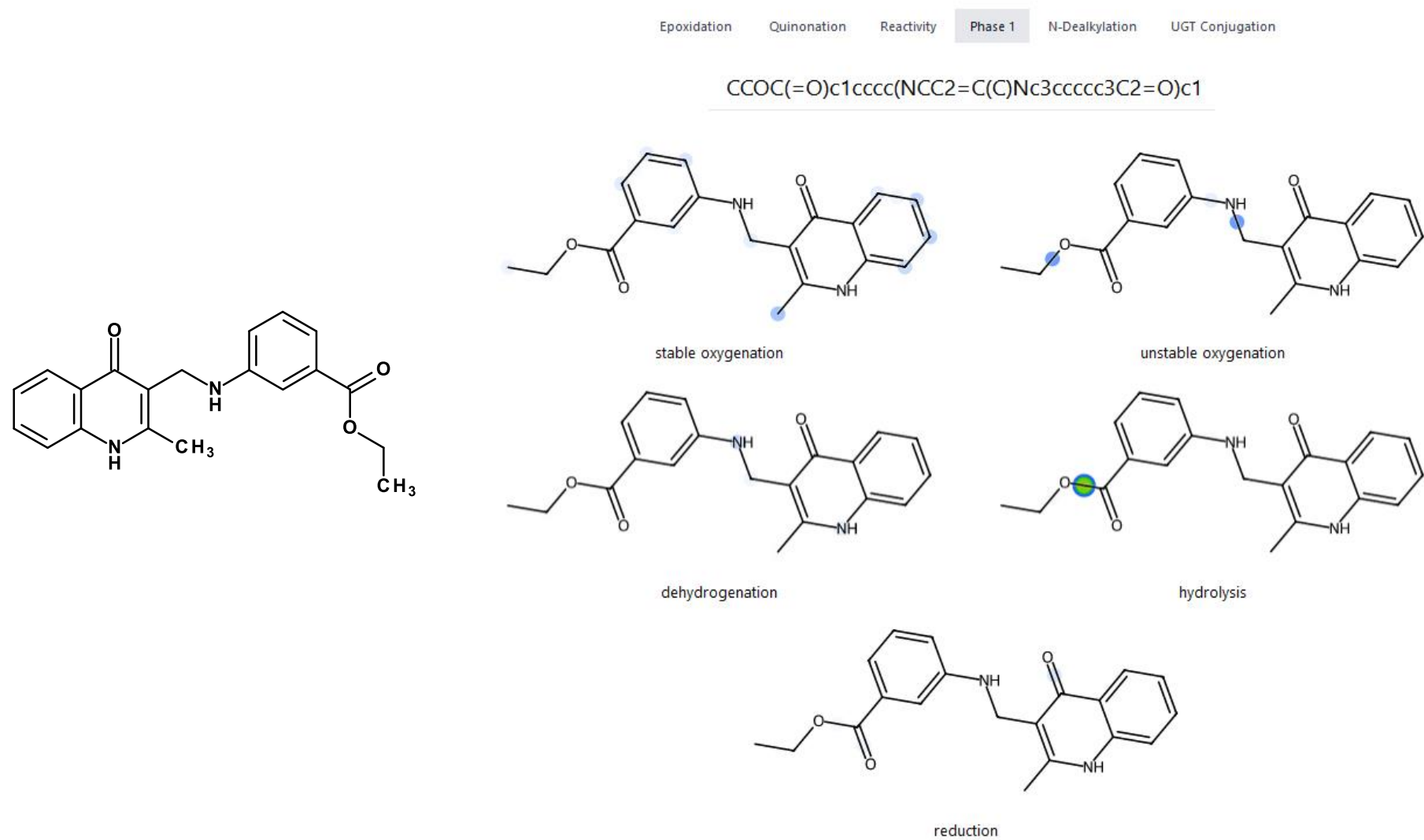


Рис. 3.1 Результаты прогнозирования возможных путей метаболизма VAZ16_p05 с помощью онлайн-ресурса Xenosite (модуль Phase 1)

В результате дальнейшего окисления гидроксиметильной группы через альдегидную до карбоксильной прогнозируется образование генерации метаболитов с новыми фармакологическими свойствами – производных кинуреновой кислоты.

Кинуреновая кислота (4-гидроксихинолин-2-карбоновая кислота) является метаболитом триптофана и образуется из кинуренина под действием кинуренин-аминотрансферазы [63]. Это соединение в головном мозге выступает эндогенным антагонистом глицинового сайта NMDA-рецепторов, что обуславливает интерес к кинуреновой кислоте как потенциальному фармакоректору патологических состояний, сопровождающихся и отягощающихся эксайтотоксичностью. Значительной проблемой при исследованиях *in vivo* стала незначительная проницаемость указанной молекулы сквозь гематоэнцефалический барьер [63], поэтому усилия исследователей сосредоточились на ее химической модификации с целью поиска производных кинуреновой кислоты с физико-химическими свойствами, способными преодолеть это ограничение.

Следовательно, результаты расчетов свидетельствуют о том, что часть эффектов фармакодинамики VAZ16_p05, в частности его ноотропные (антиамнестические) свойства, могут быть связаны не только с непосредственным действием молекулы на рецепторные системы головного мозга, но и с вероятными активными метаболитами, образующимися в результате биотрансформации.

Онлайн-ресурс Xenosite, кроме прогнозирования возможных направлений метаболизма молекул в пределах I фазы, позволяет оценить безопасность исследуемой молекулы в аспекте ее реактивности, а также вероятность образования токсичных метаболитов.

Согласно результатам проведенного прогнозирования VAZ16_p05 имеет крайне низкие показатели вероятности образования эпоксидов (рис. 3.2). Однако, следует отметить, что существует вероятность образования метаболитов хиноидной структуры.

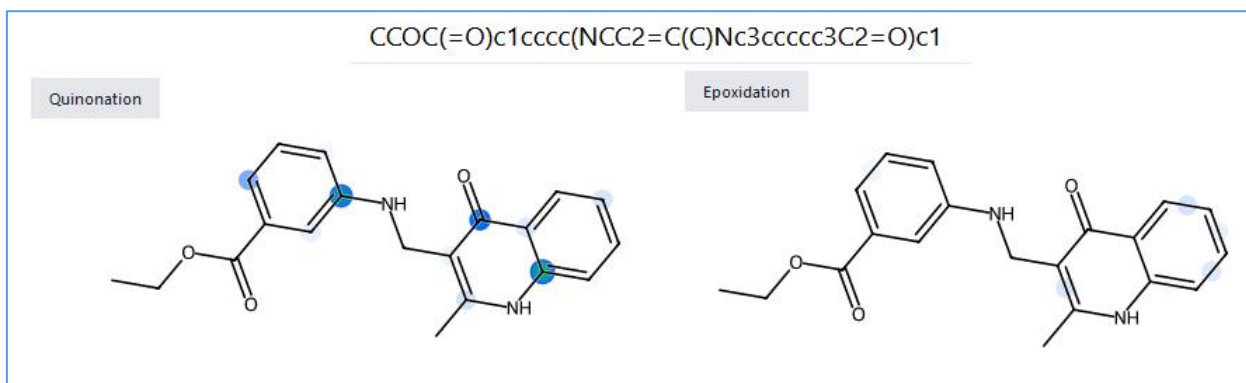


Рис. 3.2 Результаты прогнозирования вероятности образования реактивных метаболитов VAZ16_p05: хинонов и эпоксидов (онлайн-ресурс Xenosite)

На рис. 3.3 представлены результаты прогнозирования реактивности исследуемого соединения, то есть потенциального взаимодействия с определенными биологическими молекулами в организме человека, при помощи модуля Reactivity онлайн-ресурса Xenosite. Этот аспект является очень важным при исследовании новых молекул в разрезе потенциальной канцеро- и мутагенности.

Результаты проведенного исследования показали, что VAZ16_p05 имеет низкие показатели потенциального взаимодействия с системой восстановленного глутатиона, белками и низкий потенциал к образованию цианидов (рис. 3.3).

Однако, за счет достаточно реакционноспособных аминотетильной и сложноэфирной групп существует определенная вероятность ее взаимодействия с ДНК клеток (рис. 3.3). Следует заметить, в условиях *in vivo* такое развитие событий представляется маловероятным, поскольку вряд ли исследуемая молекула сможет в неизменном виде достигать непосредственно ядра клеток. При этом, следует иметь ввиду полученные результаты при планировании углублённого исследования хронической токсичности VAZ16_p05.

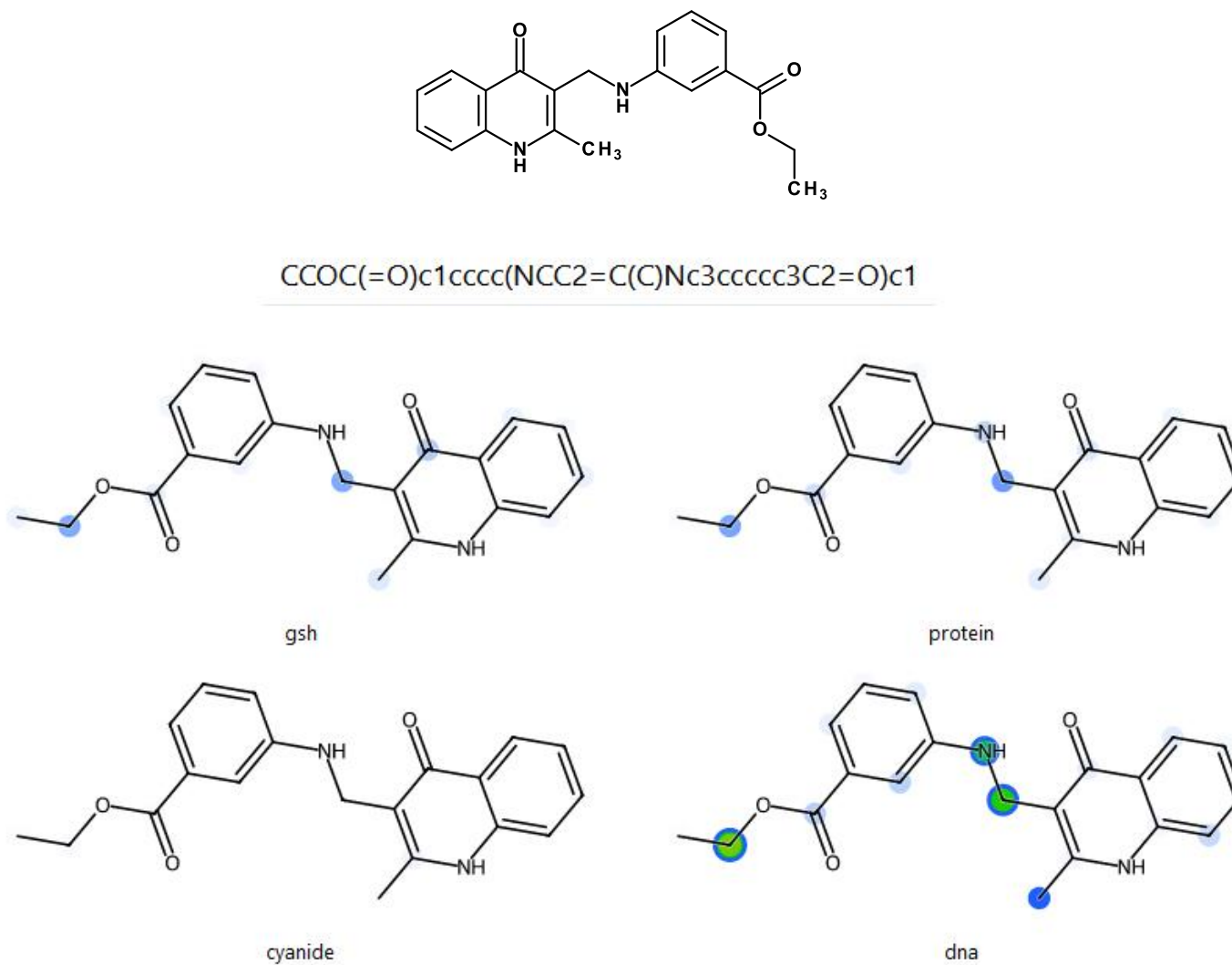


Рис. 3.3 Прогнозирование реактивности VAZ16_p05 в организме человека с помощью онлайн-ресурса Xenosite (модуль Reactivity)

Результаты прогнозирования с помощью онлайн-ресурса SMARTCyp показывают, что различные изоформы CYP могут катализировать различные по своей направленности окислительные процессы (рис. 3.4, 3.5 и 3.6).

При участии изоформы CYP3A4 наиболее вероятными направлениями биотрансформации VAZ16_p05 являются окислительное дезаминирование аминотетильного фрагмента молекулы с образованием соответствующего альдегида и ароматическое гидроксирование фенильного заместителя (рис. 3.4). При этом следует отметить, что *пара*-положение фенильного заместителя является приоритетным в сравнении с *орто*-положениями. Имеется также вероятность алифатического гидроксирования метильной группы в положении 2 гетероцикла. Следует отметить низкую вероятность ароматического гидроксирования с участием атомов углерода гетероцикла. Более высокую реакционную способность в реакциях ароматического гидроксирования фенильного заместителя по сравнению с гетероциклом можно объяснить влиянием сложноэфирной группы.

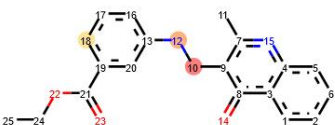
								3A4	2D6	2C9
1										
										
3A4 Ranking	Atom	3A4 Score	Energy	2DSASA	Span2end	Relative Span	Similarity			
1	C.10	35.7	41.1	20.8	6	0.6	0.4			
2	N.12	49.6	54.1	11.4	7	0.5	0.3			
3	C.18	52.1	59.5	27.8	3	0.8	0.7			
4	C.16	53.2	59.5	29.1	5	0.6	0.7			
5	C.20	53.5	59.5	21.5	5	0.6	0.3			
6	C.11	57.9	66.4	54.4	3	0.8	0.7			
7	C.2	59.5	68.2	32.7	1	0.9	1.0			
8	C.24	67.1	75.9	33.2	1	0.9	1.0			
9	N.15	68.8	75.6	13.5	3	0.8	0.3			
10	C.6	71.5	80.8	33.5	0	1.0	1.0			
11	C.1	72.9	80.8	26.9	2	0.9	1.0			
12	C.5	77.7	86.3	28.5	1	0.9	1.0			
13	C.25	79.0	89.6	66.0	0	1.0	0.7			
14	C.17	79.4	86.3	30.8	4	0.7	1.0			

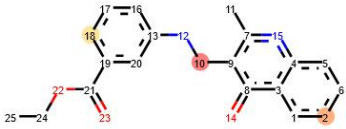
Рис. 3.4 Результаты прогнозирования возможных путей метаболизма VAZ16_p05 с участием CYP3A4 (программный комплекс SMARTCyp)

Если окислительное дезаминирование и ароматическое гидроксирование с точки зрения фармакологической активности метаболитов вряд ли интересно, то алифатическое гидроксирование метильной группы вновь открывает перспективу дальнейшего окиснения до биологически активных производных кинуреновой кислоты.

При участии изоформы CYP2C9 наиболее вероятными направлениями биотрансформации VAZ16_p05 являются окислительное дезаминирование аминометильного фрагмента молекулы с образованием соответствующего альдегида и ароматическое гидроксирование в первую очередь с участием атома углерода в положении 6 гетероцикла, а уже потом в *пара*-положении фенильного заместителя (рис. 3.5). В целом, картина прогнозирования в значительной степени повторяет такую в случае CYP3A4, однако в более высокой вероятностью гидроксирования гетероцикла в сравнении с ароматическим заместителем.

3A4
2D6
2C9

1



2C9 Ranking	Atom	2C9 Score	Energy	2DSASA	Span2end	COO-Dist	Similarity
1	C.10	63.9	41.1	20.8	6	0	0.4
2	C.2	72.8	68.2	32.7	1	0	1.0
3	C.18	76.1	59.5	27.8	3	0	0.7
4	N.12	77.3	54.1	11.4	7	0	0.3
5	C.6	79.5	80.8	33.5	0	0	1.0
6	C.24	80.5	75.9	33.2	1	0	1.0
7	C.11	81.9	66.4	54.4	3	0	0.7
8	C.16	82.0	59.5	29.1	5	0	0.7
9	C.20	82.3	59.5	21.5	5	0	0.3
10	C.25	87.0	89.6	66.0	0	0	0.7
11	C.5	91.1	86.3	28.5	1	0	1.0
12	C.1	91.5	80.8	26.9	2	0	1.0
13	N.15	92.8	75.6	13.5	3	0	0.3
14	C.17	108.7	86.3	30.8	4	0	1.0

Рис. 3.5 Результаты прогнозирования возможных путей метаболизма VAZ16_p05 с участием CYP2C9 (программный комплекс SMARTCyp)

Результаты прогнозирования возможных путей метаболизма VAZ16_p05 при участии CYP2D6 указывают на окислительное дезаминирование аминотетильного фрагмента молекулы с образованием соответствующего альдегида и ароматическое гидроксирование также в первую очередь с участием атома углерода в положении 6 гетероцикла, а уже потом в *para*-положении фенильного заместителя (рис. 3.6).

3A4
2D6
2C9

2D6 Ranking	Atom	2D6 Score	Energy	2DSASA	Span2end	N+dist	Similarity
1	C.10	67.1	41.1	20.8	6	0	0.4
2	C.2	73.6	68.2	32.7	1	0	1.0
3	C.18	78.5	59.5	27.8	3	0	0.7
4	C.6	79.5	80.8	33.5	0	0	1.0
5	N.12	80.5	54.1	11.4	7	0	0.3
6	C.24	81.3	75.9	33.2	1	0	1.0
7	C.11	84.3	66.4	54.4	3	0	0.7
8	C.16	85.2	59.5	29.1	5	0	0.7
9	C.20	85.5	59.5	21.5	5	0	0.3
10	C.25	87.0	89.6	66.0	0	0	0.7
11	C.5	91.9	86.3	28.5	1	0	1.0
12	C.1	93.1	80.8	26.9	2	0	1.0
13	N.15	95.2	75.6	13.5	3	0	0.3
14	C.17	111.9	86.3	30.8	4	0	1.0

Рис. 3.6 Результаты прогнозирования возможных путей метаболизма VAZ16_p05 с участием CYP2D6 (программный комплекс SMARTCyp)

На рис. 3.7 приведен фрагмент протокола прогнозирования возможных путей метаболизма VAZ16_p05 посредством онлайн системы Biotransformer. В общей сложности системой рассчитана возможность образования 11 уникальных метаболитов как результат 8 различных биотрансформационных преобразований. Более того, все 11 метаболитов первой итерации являются потенциальными исходными для дальнейшего метаболизма (рис. 3.7).

```

C:\WINDOWS\system32\cmd.exe

C:\Users\user\Desktop\Biotransformer3>java -jar C:\Users\user\Desktop\Biotransformer3\BioTransformer3.0_20230525.jar -k
pred -b cyp450 -ismi "CCOC(=O)c1cccc(NCC2=C(C)NC3CCCCC3C2=O)c1" -ocsv C:\Users\user\Desktop\Biotransformer3\3CO0Et.csv -
s 1 -cm 3
Cyp450Mode = 3
Processing molecule with SMILES: CCOC(=O)C1=CC=CC(NCC2=C(C)NC3=CC=CC=C3C2=O)=C1
CYP450 num of iterations done: 1
Substrates for next iteration: 11
Unique Biotransformations: 8
Unique metabolites: 11
The results were saved to the following file: C:\Users\user\Desktop\Biotransformer3\3CO0Et.csv

Successfully completed metabolism prediction for 1 out of 1 molecule(s).
Total time consumption: 9186

```

3CO0Et									
	InChI	SMILES	Molecular formula	Major Isotope Mass	ALogP	Lipinski_Violations	Reaction	Enzyme(s)	Biosystem
1	InChI=1S/C20H20N2O4/c1-3-2...	CCOC(=O)C1=CC=CC(NCC2=C(C)NC3=CC(=CC=C3C2=O)O)=C1	C20H20N2O4	352,142	3,4838	0	Aromatic hydroxylation of fused benzene ring AndFromCyProduct	CYP1A2	HUMAN
2	InChI=1S/C20H20N2O4/c1-3-2...	CCOC(=O)C1=CC=CC(NCC2=C(C)NC3=CC(=CC=C3C2=O)O)=C1	C20H20N2O4	352,142	3,4838	0	Aromatic hydroxylation of fused benzene ring AndFromCyProduct	CYP1A2	HUMAN
3	InChI=1S/C20H20N2O4/c1-3-2...	CCOC(=O)C1=CC=CC(NCC2=C(C)NC3=CC(=CC=C3C2=O)O)=C1	C20H20N2O4	352,142	3,4838	0	Hydroxylation of benzene on carbon ortho to electron donating group	CYP1A2	HUMAN
4	InChI=1S/C20H20N2O4/c1-3-2...	CCOC(=O)C1=CC=CC(NCC2=C(C)NC3=CC(=CC=C3C2=O)O)=C1	C20H20N2O4	352,142	3,4838	1	Hydroxylation of benzene on carbon ortho to electron donating group	CYP1A2	HUMAN
5	InChI=1S/C20H20N2O4/c1-3-2...	CCOC(=O)C1=CC=CC(NCC2=C(C)NC3=CC(=CC=C3C2=O)O)=C1	C20H20N2O4	352,142	3,4838	0	Aromatic hydroxylation of fused benzene ring	CYP1A2	HUMAN
6	InChI=1S/C20H20N2O4/c1-3-2...	CCOC(=O)C1=CC=CC(NCC2=C(C)NC3=CC(=CC=C3C2=O)O)=C1	C20H20N2O4	352,142	3,4838	0	Aromatic hydroxylation of fused benzene ring	CYP1A2	HUMAN
7	InChI=1S/C20H20N2O4/c1-13-...	C(COC(=O)C1=CC=CC(NCC2=C(C)NC3=CC(=CC=C3C2=O)O)=C1)O	C20H20N2O4	352,142	2,863	0	Hydroxylation of terminal methyl	CYP1A2	HUMAN
8	InChI=1S/C9H11NO2/c1-2-12-9...	CCOC(=O)C1=CC=CC(N)=C1	C9H11NO2	165,079	1,2876	0	N-Dealkylation of secondary arylalkylamine	CYP1A2	HUMAN
9	InChI=1S/C11H9NO2/c1-7-9(6-...	C(C1=C(C)NC2=CC=CC=C2C1=O)=O	C11H9NO2	187,063	1,9142	0	N-Dealkylation of secondary arylalkylamine	CYP1A2	HUMAN
10	InChI=1S/C20H20N2O4/c1-2-2...	CCOC(=O)C1=CC=CC(NCC2=C(C)NC3=CC(=CC=C3C2=O)O)=C1	C20H20N2O4	352,142	3,2926	0	Hydroxylation of methyl carbon adjacent to aliphatic ring AndFromC...	CYP1A2	HUMAN
11	InChI=1S/C20H22N2O3/c1-3-2...	CCOC(=O)C1=CC=CC(NCC2=C(C)NC3=CC(=CC=C3C2=O)O)=C1	C20H22N2O3	338,163	2,887	0	Reduction of ketone to alcohol	CYP2C9	HUMAN

Рис. 3.7 Фрагмент протокола прогнозирования возможных путей метаболизма VAZ16_p05 с помощью онлайн системы Biotransformer

Подавляющее большинство прогнозируемых метаболитов являются продуктами ароматического гидроксилирования по разным положениям как гетероциклической системы хинолона, так и фенильного фрагмента. Это вполне предсказуемо с учетом биохимической природы процессов, катализирующих ферменты CYP. Но среди прогнозируемых метаболитов есть также 2-гидроксиметильное производное, являющееся продуктом алифатического гидроксилирования реакционноспособной метильной группы в положении 2 хинолонового кольца.

Таким образом, основные направления прогнозирования с помощью системы Biotransformer, несмотря на отличия в алгоритмах расчетов, совпадают с результатами предыдущих программ.

Анализ прогнозируемых метаболитов VAZ16_p05 с помощью модуля GLORYx онлайн-системы NERDD подтверждает, что основными путями метаболических превращений исследуемой молекулы являются гидролиз до соответствующей кислоты, ароматическое гидроксилирование с участием гетероцикла, окислительное дезаминирование с образованием соответствующего альдегида в положении 3, а также гидроксилирование метильной группы в положении 2 гетероцикла (рис. 3.8).

Отдельного внимания заслуживает модуль CYPstrate онлайн-ресурса NERDD, который позволяет спрогнозировать субстратную специфичность молекулы к определенным изоформам CYP (рис. 3.9). Такое исследование позволяет уже на ранних этапах изучения перспективных молекул спрогнозировать, субстратами каких изоформ цитохрома являются исследуемые вещества. Как показано на рис. 3.9, VAZ16_p05 не является субстратом таких цитохромов, как CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8 и CYP2E1.

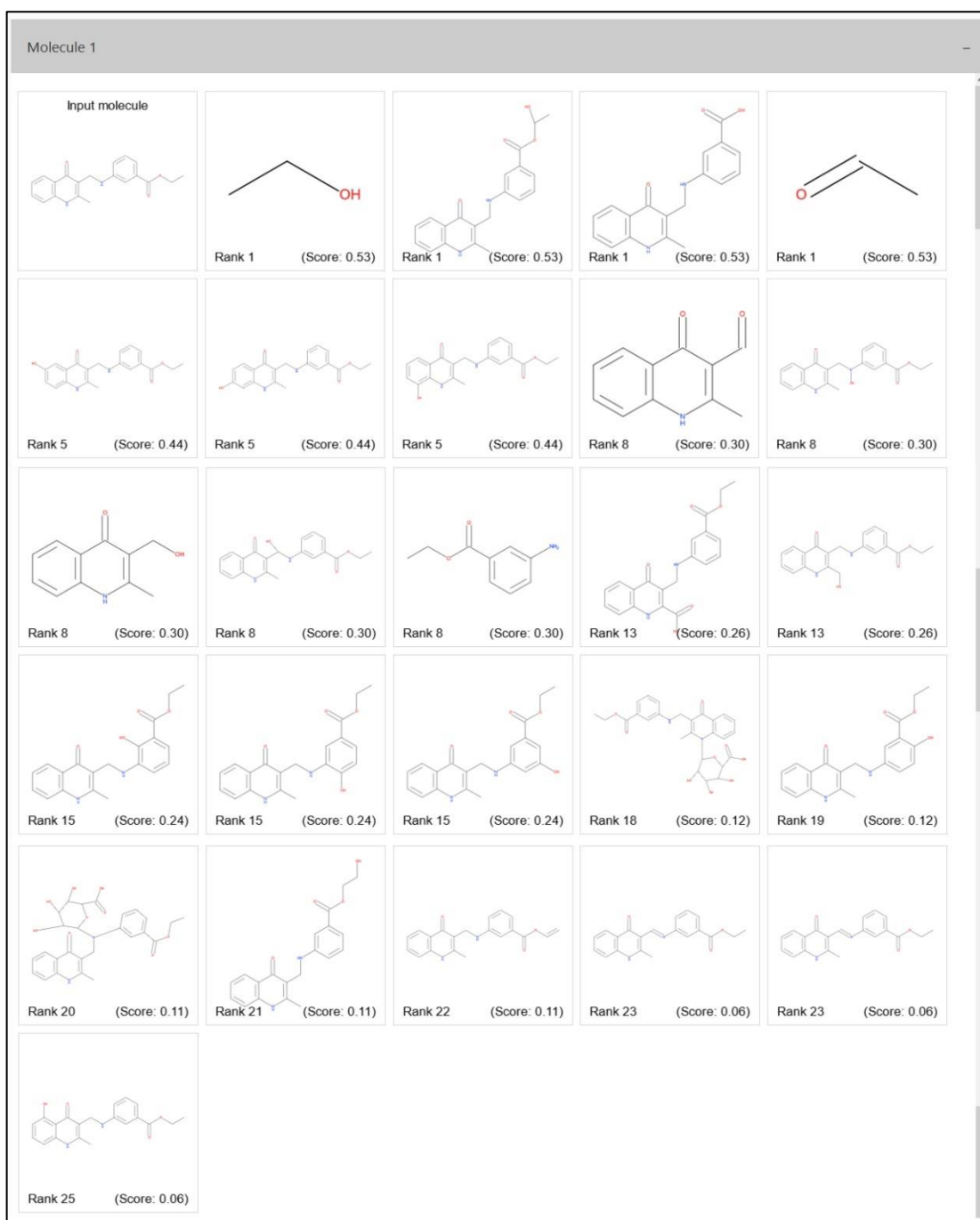


Рис. 3.8 Результаты прогнозирования возможных путей метаболизма VAZ16_p05 с помощью модуля GLORYx онлайн-системы NERRD

2D structure	CYP1A2	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP2E1	CYP3A4
	No prediction	Non-substrate	Non-substrate	Non-substrate	No prediction	No prediction	No prediction	Non-substrate	No prediction

Рис. 3.9 Субстратная специфичность VAZ16_p05 к изоформам цитохрома P450 по результатам модуля CYPstrate онлайн-ресурса NERRD

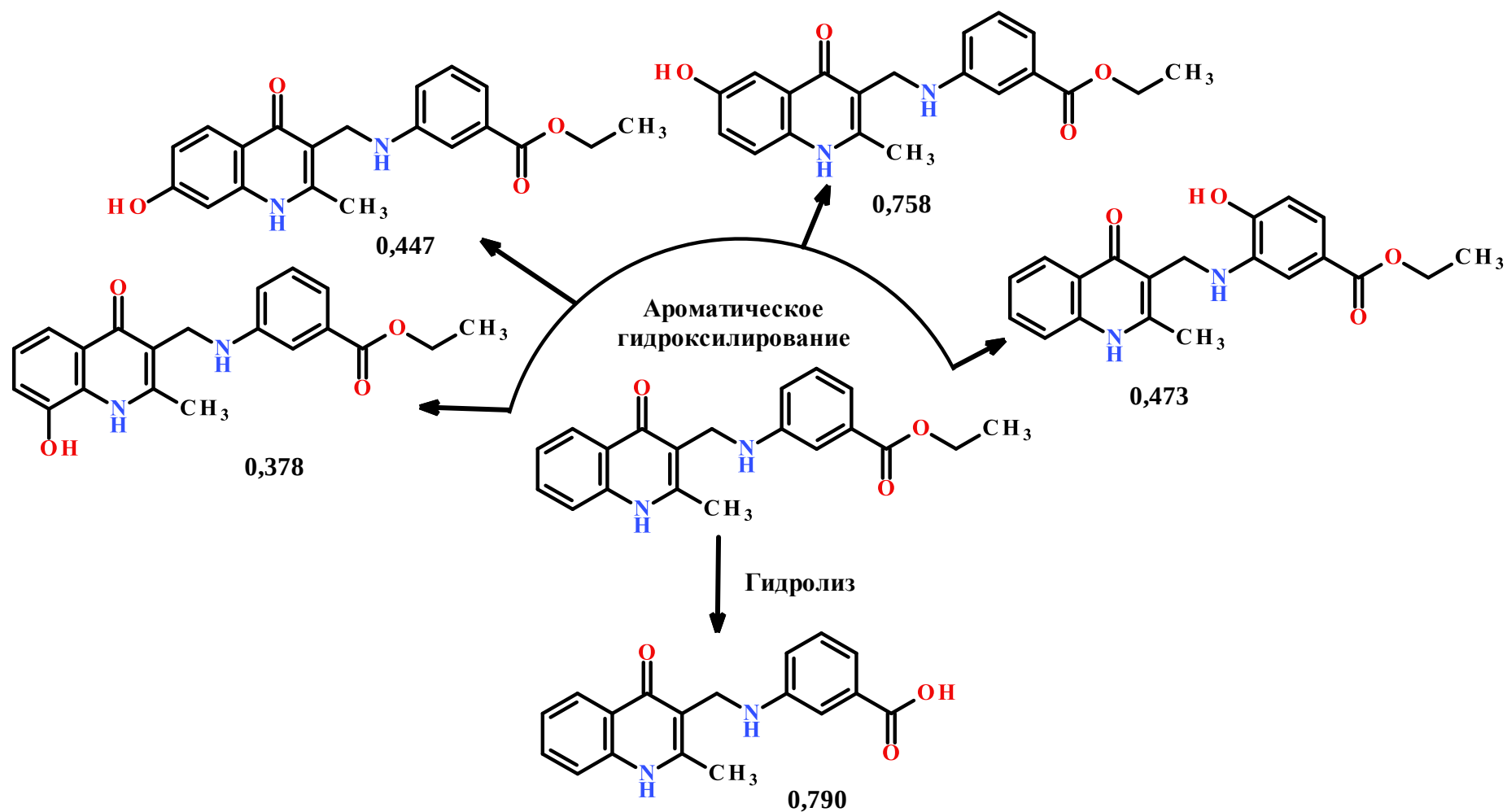


Рис. 3.10 Результаты прогнозирования возможных путей метаболизма VAZ16_p05 с помощью системы Way2Drug RA

Результаты прогнозирования с помощью онлайн сервиса Way2Drug RA, которые графически представлены на рис. 3.10. Этот онлайн программный продукт предоставляет только показатели вероятности реализации того или иного процесса, поэтому визуализация полученных результатов требует определенного экспертного понимания характера процессов для экстраполяции конкретных процессов в отношении исследуемого соединения.

Как можно увидеть из рис. 3.10, основными путями прогнозируются с высокой степенью вероятности варианты гидролиза до соответствующей кислоты и ароматического гидроксилирования с участием атомов карбона как гетероциклической системы хинолона, так и фенильного фрагмента. Особенно реакционноспособным в аспекте ароматического гидроксилирования является положение 6 системы хинолин-4-она (рис. 3.10). Особенностью является высокая позиция в прогнозе ароматического гидроксилирования фенильного фрагмента в *орто*-положение при низкой вероятности *пара*-гидроксилирования.

Таким образом, комплексный анализ результатов прогнозирования возможных путей метаболизма VAZ16_p05 с помощью пяти различных онлайн-ресурсов позволяет заключить, что молекула этилового эфира 3-[(2-метил-4-оксо-1Н-хинолин-3-ил)метиламино]бензойной кислоты может интенсивно метаболизироваться с участием ферментных систем цитохрома P450. Основными направлениями можно считать гидролиз сложноэфирной группы с образованием соответствующей кислоты, ароматическое гидроксилирование молекулы исследуемого вещества с участием атомов карбона как гетероциклической системы хинолона, так и фенильного фрагмента, а также окислительное дезаминирование аминотетильного фрагмента с образованием соответствующего альдегида. В данном случае прогнозируемые метаболиты вряд ли оказывают существенное влияние на общий профиль фармакологической активности материнской молекулы. Тем не менее, возможное направление алифатического гидроксилирования по метильной группе в положении 2 гетероцикла с последующим окислением до производных кинуреновой кислоты свидетельствует в пользу предположения,

что доказанные эффекты VAZ16_p05 могут, по крайней мере частично, обеспечиваться именно этими фармакологически активными метаболитами.

Результаты, полученные указанными системами, несколько отличаются между собой, что вполне объясняется разницей в алгоритмах расчетов, положенных в основу. Но общие закономерности биотрансформационных преобразований соотносятся между собой и полностью укладываются в современные взгляды медицинской химии по поводу реакционной способности ксенобиотиков под влиянием ферментных систем цитохрома P450 организма человека.

Выводы к разделу 3

1. Проведено компьютерное прогнозирование возможных путей биотрансформации перспективного соединения – этилового эфира 3-[(2-метил-4-оксо-1Н-хинолин-3-ил)метиламино]бензойной кислоты (лабораторный шифр VAZ16_p05) с применением пяти различных онлайн-ресурсов, находящихся в свободном доступе.

2. Полученные результаты свидетельствуют о том, что молекула этилового эфира 3-[(2-метил-4-оксо-1Н-хинолин-3-ил)метиламино]бензойной кислоты может интенсивно метаболизироваться с участием ферментных систем цитохрома P450.

3. Основными направлениями можно считать гидролиз сложноэфирной группы с образованием соответствующей кислоты, ароматическое гидроксирование молекулы исследуемого вещества с участием атомов карбона как гетероциклической системы хинолона, так и фенильного фрагмента, а также окислительное дезаминирование аминометильного фрагмента с образованием соответствующего альдегида.

4. Прогнозируемое направление алифатического гидроксирования по метильной группе в положении 2 гетероцикла с последующим окислением до производных кинуреновой кислоты свидетельствует в пользу предположения,

что доказанные эффекты VAZ16_p05 могут, по крайней мере частично, обеспечиваться именно этими фармакологически активными метаболитами.

5. По результатам модуля Reactivity онлайн-ресурса Xenosite, VAZ16_p05 имеет низкие показатели потенциального взаимодействия с системой восстановленного глутатиона, белками и слабый потенциал к образованию цианидов и эпоксидов. хинонов. Однако, выявлена определенная вероятность взаимодействия VAZ16_p05 с ДНК клеток, а также окисления в высокореакционноспособные хиноны.

6. По результатам модуля CYPstrate онлайн-системы NERDD, который позволяет прогнозировать субстратную специфичность соединения к определенным изоформ CYP, VAZ16_p05 не является субстратом таких цитохромов, как CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8 и CYP2E1.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведена систематизация и анализ научной литературы, посвященной метаболизму ксенобиотиков в организме человека, в частности, нетипичным реакциям биотрансформации лекарственных средств и кандидатов в лекарственные препараты. Проведенный анализ подтверждает важность детального и исчерпывающего изучения биотрансформации перспективных кандидатов в лекарственные препараты на ранних этапах их разработки.

2. Охарактеризован метод синтеза этилового эфира 3-[(2-метил-4-оксо-1Н-хинолин-3-ил)метиламино]бензойной кислоты (лабораторный шифр VAZ16_p05). Обоснована перспективность углубленного фармакологического изучения VAZ16_p05 как потенциального ноотропа с психостимулирующими свойствами. Проведён анализ алгоритмов использованных в работе онлайн-ресурсов компьютерного прогнозирования возможных путей метаболизма в организме человека и обоснован их выбор.

3. Проведено компьютерное прогнозирование возможных путей биотрансформации перспективного соединения – этилового эфира 3-[(2-метил-4-оксо-1Н-хинолин-3-ил)метиламино]бензойной кислоты (лабораторный шифр VAZ16_p05) с применением пяти различных онлайн-ресурсов, находящихся в свободном доступе.

4. Полученные результаты свидетельствуют о том, что молекула этилового эфира 3-[(2-метил-4-оксо-1Н-хинолин-3-ил)метиламино]бензойной кислоты может интенсивно метаболизироваться с участием ферментных систем цитохрома P450. Основными направлениями можно считать гидролиз сложноэфирной группы с образованием соответствующей кислоты, ароматическое гидроксирование молекулы исследуемого вещества с участием атомов карбона как гетероциклической системы хинолона, так и фенильного фрагмента, а также окислительное дезаминирование аминометильного фрагмента с образованием соответствующего альдегида.

5. Прогнозируемое направление алифатического гидроксирования по метильной группе в положении 2 гетероцикла с последующим окислением до производных кинуреновой кислоты свидетельствует в пользу

предположения, что доказанные эффекты VAZ16_p05 могут, по крайней мере частично, обеспечиваться именно этими фармакологически активными метаболитами.

6. По результатам модуля Reactivity онлайн-ресурса Xenosite, VAZ16_p05 имеет низкие показатели потенциального взаимодействия с системой восстановленного глутатиона, белками и слабый потенциал к образованию цианидов и эпоксидов. хинонов. Однако, выявлена определенная вероятность взаимодействия VAZ16_p05 с ДНК клеток, а также окисления в высокореакционноспособные хиноны. По результатам модуля CYPstrate онлайн-системы NERDD, который позволяет прогнозировать субстратную специфичность соединения к определенным изоформ CYP, VAZ16_p05 не является субстратом таких цитохромов, как CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8 и CYP2E1.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Bachmann C., Bickel M. H. History of drug metabolism: the first half of the 20th century. *Drug Metab. Rev.* 1985. Vol. 16, № 3. P. 185–253. DOI: <https://doi.org/10.3109/03602538508991435> (Date of access: 21.03.2024).
2. Guengerich F. P. A history of the roles of cytochrome P450 enzymes in the toxicity of drugs. *Toxicol. Res.* 2020. Vol. 37, № 1. P. 1–23. DOI: <https://doi.org/10.1007/s43188-020-00056-z> (Date of access: 21.03.2024).
3. Handler P., Perlzweig W. A. Detoxication mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* 1945. Vol. 14. P. 617–642.
4. Brodie B. B., Gillette J. R., La Du B. N. Enzymatic metabolism of drugs and other foreign compounds. *Annu. Rev. Biochem.* 1958. Vol. 27, № 3. P. 427–454. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.27.070158.002235> (Date of access: 21.03.2024).
5. Remmer H. The acceleration of evipan oxidation and the demethylation of methylaminopyrine by barbiturates. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 1959. Vol. 237. P. 296–307.
6. Guengerich F. P. Roles of cytochrome P450 enzymes in pharmacology and toxicology: Past, present, and future. *Adv. Pharmacol.* 2022. Vol. 95. P. 1–47. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2021.12.001> (Date of access: 21.03.2024).
7. Physicochemical Properties, Biotransformation, and Transport Pathways of Established and Newly Approved Medications: A Systematic Review of the Top 200 Most Prescribed Drugs vs. the FDA-Approved Drugs Between 2005 and 2016 / A. Saravanakumar et al. *Clin. Pharmacokinet.* 2019. Vol. 58, № 10. P. 1281–1294. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40262-019-00750-8> (Date of access: 21.03.2024).
8. A Decade in the MIST: Learnings from Investigations of Drug Metabolites in Drug Development under the "Metabolites in Safety Testing" Regulatory Guidance / S. Schadt et al. *Drug Metab. Dispos.* 2018. Vol. 46, № 6. P. 865–878. DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.117.079848> (Date of access: 21.03.2024).

9. Effect of drug metabolism in the treatment of SARS-CoV-2 from an entirely computational perspective / J. P. A. de Jesus et al. *Sci. Rep.* 2021. Vol. 11, № 1. P. 19998. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99451-1> (Date of access: 21.03.2024).
10. Metabolism-mediated drug–drug interactions – study design, data analysis, and implications for in vitro evaluations / S. Fu et al. *Medicine in Drug Discovery.* 2022. Vol. 14. P. 100121.
11. Broccatelli F., Hop C. E. C. A., Wright M. Strategies to optimize drug half-life in lead candidate identification. *Expert Opin. Drug Discov.* 2019. Vol. 14, № 3. P. 221–230. DOI: <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1569625> (Date of access: 21.03.2024).
12. Minimizing the risk of chemically reactive metabolite formation of new drug candidates: implications for preclinical drug design / A. Brink et al. *Drug Discov. Today.* 2017. Vol. 22, № 5. P. 751–756. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.11.018> (Date of access: 21.03.2024).
13. Effective Application of Metabolite Profiling in Drug Design and Discovery / M. A. Cerny et al. *J. Med. Chem.* 2020. Vol. 63, № 12. P. 6387–6406. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01840> (Date of access: 21.03.2024).
14. Biotransformation: Impact and Application of Metabolism in Drug Discovery / J. Shanu-Wilson et al. *ACS Med. Chem. Lett.* 2020. Vol. 11, № 11. P. 2087–2107. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.0c00202> (Date of access: 21.03.2024).
15. Isin E. M. Unusual Biotransformation Reactions of Drugs and Drug Candidates. *Drug Metab. Dispos.* 2023. Vol. 51, № 4. P. 413–426. DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.121.000744> (Date of access: 21.03.2024).
16. Kalgutkar A. S. Designing around Structural Alerts in Drug Discovery. *J. Med. Chem.* 2020. Vol. 63, № 12. P. 6276–6302. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00917> (Date of access: 21.03.2024).
17. CYP2C8-Mediated Formation of a Human Disproportionate Metabolite of the Selective Na_v1.7 Inhibitor DS-1971a, a Mixed Cytochrome P450 and Aldehyde Oxidase Substrate / D. Asano et al. *Drug Metab. Dispos.* 2022. Vol. 50,

№ 3. P. 235–242. DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.121.000665> (Date of access: 21.03.2024).

18. Baillie T. A., Rettie A. E. Role of biotransformation in drug-induced toxicity: influence of intra- and inter-species differences in drug metabolism. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2011. Vol. 26, № 1. P. 15–29. DOI: <https://doi.org/10.2133/dmpk.dmpk-10-rv-089> (Date of access: 21.03.2024).

19. Application of New Cellular and Microphysiological Systems to Drug Metabolism Optimization and Their Positioning Respective to In Silico Tools / L. Docci et al. *SLAS Discov.* 2019. Vol. 24, № 5. P. 523–536. DOI: <https://doi.org/10.1177/2472555219831407> (Date of access: 21.03.2024).

20. Hepatocyte spheroids as a competent in vitro system for drug biotransformation studies: nevirapine as a bioactivation case study / P. F. Pinheiro et al. *Arch. Toxicol.* 2017. Vol. 91, № 3. P. 1199–1211. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1792-x> (Date of access: 21.03.2024).

21. Primary Human Hepatocyte Spheroid Model as a 3D In Vitro Platform for Metabolism Studies / K. P. Kanebratt et al. *J. Pharm. Sci.* 2021. Vol. 110, № 1. P. 422–431. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.10.043> (Date of access: 21.03.2024).

22. Setup of human liver-chips integrating 3D models, microwells and a standardized microfluidic platform as proof-of-concept study to support drug evaluation / B. Cox et al. *Biomater. Biosyst.* 2022. Vol. 7. P. 100054. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbiosy.2022.100054> (Date of access: 21.03.2024).

23. On the potential of in vitro organ-chip models to define temporal pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships / C. W. McAleer et al. *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, № 1. P. 9619. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45656-4> (Date of access: 21.03.2024).

24. Use of radiolabeled compounds in drug metabolism and pharmacokinetic studies / E. M. Isin et al. *Chem. Res. Toxicol.* 2012. Vol. 25, № 3. P. 532–542. DOI: <https://doi.org/10.1021/tx2005212> (Date of access: 21.03.2024).

25. The integration of LC-MS and NMR for the analysis of low molecular weight trace analytes in complex matrices / R. M. Gathungu et al. *Mass Spectrom.*

Rev. 2020. Vol. 39, № 1–2. P. 35–54. DOI: <https://doi.org/10.1002/mas.21575> (Date of access: 21.03.2024).

26. Predicting drug metabolism: experiment and/or computation? / J. Kirchmair et al. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2015. Vol. 14, № 6. P. 387–404. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrd4581> (Date of access: 21.03.2024).

27. Tyzack J. D., Kirchmair J. Computational methods and tools to predict cytochrome P450 metabolism for drug discovery. *Chem. Biol. Drug Des.* 2019. Vol. 93, № 4. P. 377–386. DOI: <https://doi.org/10.1111/cbdd.13445> (Date of access: 21.03.2024).

28. Future of Biotransformation Science in the Pharmaceutical Industry / V. M. Kramlinger et al. *Drug Metab. Dispos.* 2022. Vol. 50, № 3. P. 258–267. DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.121.000658> (Date of access: 21.03.2024).

29. Guengerich F. P. Mechanisms of Cytochrome P450-Catalyzed Oxidations. *ACS Catal.* 2018. № 8. P. 10964–10976. DOI: <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b03401> (Date of access: 21.03.2024).

30. Bolleddula J., Chowdhury S. K. Carbon-carbon bond cleavage and formation reactions in drug metabolism and the role of metabolic enzymes. *Drug Metab. Rev.* 2015. Vol. 47, № 4. P. 534–557. DOI: <https://doi.org/10.3109/03602532.2015.1086781> (Date of access: 21.03.2024).

31. Weidolf L., Covey T. R. Studies on the metabolism of omeprazole in the rat using liquid chromatography/ion spray mass spectrometry and the isotope cluster technique with [³⁴S]omeprazole. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1992. Vol. 6, № 3. P. 192–196. DOI: <https://doi.org/10.1002/rcm.1290060308> (Date of access: 21.03.2024).

32. Stereoselective flunoxaprofen-S-acyl-glutathione thioester formation mediated by acyl-CoA formation in rat hepatocytes / M. P. Grillo et al. *Drug Metab. Dispos.* 2010. Vol. 38, № 1. P. 133–142. DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.109.029371> (Date of access: 21.03.2024).

33. Late-occurring and Long-circulating Metabolites of GABA_Aα_{2,3} Receptor Modulator AZD7325 Involving Metabolic Cyclization and Aromatization: Relevance to MIST Analysis and Application for Patient Compliance / C. Gu et al.

Drug Metab. Dispos. 2018. Vol. 46, № 3. P. 303–315. DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.117.078873> (Date of access: 21.03.2024).

34. Idiosyncratic liver injury induced by vildagliptin with successful switch to linagliptin in a hemodialyzed diabetic patient / N. Kurita et al. *Diabetes Care*. 2014. Vol. 37, № 9. P. e198–e199. DOI: <https://doi.org/10.2337/dc14-1252> (Date of access: 21.03.2024).

35. Identification of Novel Metabolites of Vildagliptin in Rats: Thiazoline-Containing Thiol Adducts Formed via Cysteine or Glutathione Conjugation / K. Mizuno et al. *Drug Metab. Dispos.* 2019. Vol. 47, № 8. P. 809–817. DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.119.086546> (Date of access: 21.03.2024).

36. Discovery of highly potent, selective, and efficacious small molecule inhibitors of ERK1/2 / L. Ren et al. *J. Med. Chem.* 2015. Vol. 58, № 4. P. 1976–1991. DOI: <https://doi.org/10.1021/jm501921k> (Date of access: 21.03.2024).

37. Novel Homodimer Metabolites of GDC-0994 via Cytochrome P450-Catalyzed Radical Coupling / R. H. Takahashi et al. *Drug Metab. Dispos.* 2020. Vol. 48, № 6. P. 521–527. DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.119.090019> (Date of access: 21.03.2024).

38. Elucidating the structure and cytochrome P450-mediated mechanism for novel metabolites of GDC-0575 in rats / C. Zhang et al. *Xenobiotica*. 2022. Vol. 52, № 3. P. 219–228. DOI: <https://doi.org/10.1080/00498254.2022.2062685> (Date of access: 21.03.2024).

39. From Kratom to mitragynine and its derivatives: physiological and behavioural effects related to use, abuse, and addiction / Z. Hassan et al. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2013. Vol. 37, № 2. P. 138–151. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.11.012> (Date of access: 21.03.2024).

40. A Phase 2 clinical trial of PF-05212377 (SAM-760) in subjects with mild to moderate Alzheimer's disease with existing neuropsychiatric symptoms on a stable daily dose of donepezil / T. Fullerton et al. *Alzheimers Res. Ther.* 2018. Vol. 10, № 1. P. 38. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13195-018-0368-9> (Date of access: 21.03.2024).

41. Exploring Drug Metabolism by the Gut Microbiota: Modes of Metabolism and Experimental Approaches / P. Dhurjad et al. *Drug Metab. Dispos.* 2022. Vol. 50, № 3. P. 224–234. DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.121.000669> (Date of access: 21.03.2024).

42. Commensal Gut Bacteria Convert the Immunosuppressant Tacrolimus to Less Potent Metabolites / Y. Guo et al. *Drug Metab. Dispos.* 2019. Vol. 47, № 3. P. 194–202. DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.118.084772> (Date of access: 21.03.2024).

43. Discovery and Early Clinical Development of LY3202626, a Low-Dose, CNS-Penetrant BACE Inhibitor / D. L. McKinzie et al. *J. Med. Chem.* 2021. Vol. 64, № 12. P. 8076–8100. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00489> (Date of access: 21.03.2024).

44. The Involvement of the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC) in the Reductive Metabolism of Hydroxamic Acids / C. Ginsel et al. *Drug Metab. Dispos.* 2018. Vol. 46, № 10. P. 1396–1402. DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.118.082453> (Date of access: 21.03.2024).

45. Duvic M., Vu J. Vorinostat: a new oral histone deacetylase inhibitor approved for cutaneous T-cell lymphoma. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2007. Vol. 16, № 7. P. 1111–1120. DOI: <https://doi.org/10.1517/13543784.16.7.1111> (Date of access: 21.03.2024).

46. Role of human flavin-containing monooxygenase (FMO) 5 in the metabolism of nabumetone: Baeyer-Villiger oxidation in the activation of the intermediate metabolite, 3-hydroxy nabumetone, to the active metabolite, 6-methoxy-2-naphthylacetic acid *in vitro* / K. Matsumoto et al. *Xenobiotica.* 2021. Vol. 51, № 2. P. 155–166. DOI: <https://doi.org/10.1080/00498254.2020.1843089> (Date of access: 21.03.2024).

47. Discovery of (3-(4-(2-Oxa-6-azaspiro[3.3]heptan-6-ylmethyl)phenoxy)-azetidin-1-yl)(5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)methanone (AZD1979), a Melanin Concentrating Hormone Receptor 1 (MCHr1) Antagonist with Favorable Physicochemical Properties / A. Johansson et al. *J. Med. Chem.* 2016. Vol. 59, № 6.

P. 2497–2511. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01654> (Date of access: 21.03.2024).

48. Metabolism of the MEK1/2 Inhibitor Pimasertib Involves a Novel Conjugation with Phosphoethanolamine in Patients with Solid Tumors / H. Scheible et al. *Drug Metab. Dispos.* 2017. Vol. 45, № 2. P. 174–182. DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.116.072934> (Date of access: 21.03.2024).

49. Nucleophilic Thiol Proteins Bind Covalently to Abasic Sites in DNA / P. P. Ghodke et al. *Chem. Res. Toxicol.* 2022. Vol. 35, № 10. P. 1805–1808. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.2c00068> (Date of access: 21.03.2024).

50. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings / C. A. Lipinski et al. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001. Vol. 46, № 1–3. P. 3–26. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0) (Date of access: 21.03.2024).

51. Are Biotransformation Studies of Therapeutic Proteins Needed? Scientific Considerations and Technical Challenges / S. Schadt et al. *Drug Metab. Dispos.* 2019. Vol. 47, № 12. P. 1443–1456. DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.119.088997> (Date of access: 21.03.2024).

52. Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of US Food and Drug Administration-Approved Antisense Oligonucleotide Drugs / J. M. Migliorati et al. *Drug Metab. Dispos.* 2022. Vol. 50, № 6. P. 888–897. DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.121.000417> (Date of access: 21.03.2024).

53. Crooke S. T., Geary R. S. Clinical pharmacological properties of mipomersen (Kynamro), a second generation antisense inhibitor of apolipoprotein B. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2013. Vol. 76, № 2. P. 269–276. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04469.x> (Date of access: 21.03.2024).

54. Optimising proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) for oral drug delivery: a drug metabolism and pharmacokinetics perspective / A. Pike et al. *Drug Discov. Today.* 2020. Vol. 25, № 10. P. 1793–1800. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.07.013> (Date of access: 21.03.2024).

55. 4-Hydroxydibenzyl: a novel metabolite from the human gut microbiota after consuming resveratrol / C. E. Iglesias-Aguirre et al. *Food Funct.* 2022. Vol. 13,

№ 14. P. 7487–7493. DOI: <https://doi.org/10.1039/d2fo01475k> (Date of access: 21.03.2024).

56. 3-Диметиламинометил-2-метил-1H-хинолин-4-он – эффективный реагент в синтезе 3-аминометилзамещенных хинолонов / В. А. Зубков и др. *Журнал органічної та фармацевтичної хімії*. 2005. Т. 3, № 2(10). С. 23–27.

57. Podolsky I. M., Shtrygol' S. Yu., Zubkov V. O. The psycho- and neurotropic profiling of novel 3-(N-R,R'-aminomethyl)-2-methyl-1H-quinolin-4-ones *in vivo*. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2018. Vol. 26. P. 107–114.

58. SMARTCyp 3.0: enhanced cytochrome P450 site-of-metabolism prediction server / L. Olsen et al. *Bioinformatics*. 2019. Vol. 35, № 17. P. 3174–3175.

59. Matlock M. K., Hughes T. B., Swamidass S. J. XenoSite server: a web-available site of metabolism prediction tool. *Bioinformatics*. 2015. Vol. 31, № 7. P. 1136–1137.

60. BioTransformer: a comprehensive computational tool for small molecule metabolism prediction and metabolite identification / Y. Djoumbou-Feunang et al. *J. Cheminform*. 2019. Vol. 11, № 1. P. E02.

61. GLORYx: Prediction of the Metabolites Resulting from Phase 1 and Phase 2 Biotransformations of Xenobiotics / C. de Bruyn Kops et al. *Chem. Res. Toxicol*. 2021. Vol. 34, № 2. P. 286–299.

62. Prediction of reacting atoms for the major biotransformation reactions of organic xenobiotics / A. V. Rudik et al. *J. Cheminform*. 2016. № 8. P. E68.

63. Recent evidence for an expanded role of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in neurological diseases / M. D. Lovelace et al. *Neuropharmacology*. 2017. Vol. 112, part B. P. 373–388.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ СТВОРЕННЯ НОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

МАТЕРІАЛИ
XXX МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ
КОНФЕРЕНЦІЇ МОЛОДИХ ВЧЕНИХ ТА СТУДЕНТІВ

17-19 квітня 2024 року
м. Харків

Харків
НФаУ
2024

Продолжение приложения А

Секція І

«СИНТЕЗ ФІЗІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН»

The next step in computational evaluation that would allow activity to be predicted is a computational molecular analysis method to describe binding efficiency and affinity (molecular docking). According to the docking results, it was established that the compounds have a moderate affinity for dipeptidyl peptidase-4, as evidenced by the estimated values (table 1).

Table 1

Estimated molecular docking values of generated molecules relative to dpp-4

Compound	Affinity DG	EDoc	Ki μ M
1	-8.4	-5.66	70.60
2	-8.0	-5.37	115.18
3	-7.7	-6.54	16.08
4	-8.1	-6.25	26.41
Evogliptin	-8.5	-5.53	88.17

Visualization of the location of the studied derivatives in the dipeptidyl peptidase-4 site in comparison with Evogliptin is shown in fig. 2.

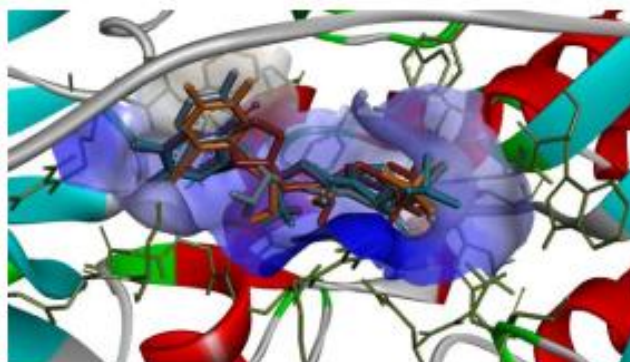


Fig. 2. Visualization of the molecular docking of the studied derivatives in the dipeptidyl peptidase-4 site in comparison with Evogliptin (blue)

Conclusions. According to the *in silico* assessment of toxicity and activity, the generated molecules are practically non-toxic and may have a moderate hypoglycemic effect due to the inhibition of dipeptidyl peptidase-4. A detailed analysis of the formed complexes revealed compounds that had a binding mode similar to classical inhibitors.

PREDICTION OF PROBABLE METABOLIC PATHWAYS OF THE POTENTIAL CANDIDATE FOR AN API WITH NEUROTROPIC PROPERTIES

El Gamh Fatima Ezzahra

Scientific supervisor: prof. Podolsky I.M.

National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine

medchem@nuph.edu.ua

Introduction. Understanding metabolic processes at a molecular level is crucial for successful drug discovery and development. Knowledge of the metabolic properties of a molecule helps to

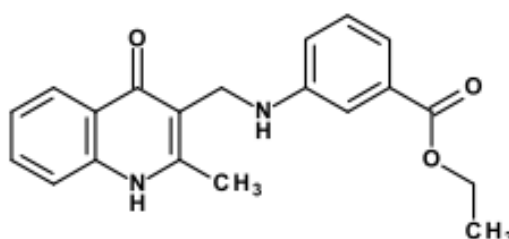
Продолжение приложения А

XXX Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених та студентів
«АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ СТВОРЕННЯ НОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ»

optimize its stability, which in turn affects the *in vivo* half-life and risk-benefit ratio of a drug. Experimental methods are available to investigate the metabolic fate of drugs in great detail, but they require scientific equipment, human expertise, cost, and time. These challenges have led to the development of computational tools for drug metabolism prediction. *In silico* methods can predict the metabolic fate of virtual compounds and help plan for the best strategy to optimize the metabolic stability of project compounds beforehand.

Aim. Prediction of probable metabolic pathways of ethyl 3-[(2-methyl-4-oxo-1H-quinolin-3-yl)methylamino]benzoate, a promising candidate for APIs with neurotropic properties.

Materials and methods. Ethyl 3-[(2-methyl-4-oxo-1H-quinolin-3-yl)methylamino]benzoate, an object of the study, has been synthesized by Associate Professor of the Department of Medicinal Chemistry Vadym Zubkov.



The molecule under investigation shows promise for pharmacological study, based on a comprehensive screening of its psycho- and neurotropic properties conducted by Professor Illya Podolsky, from the Department of Medicinal Chemistry.

To accurately predict the biotransformation pathways of ethyl 3-[(2-methyl-4-oxo-1H-quinolin-3-yl)methylamino]benzoate, we confidently relied on five powerful and freely available online resources: Xenosite, SMARTCyp, Way2Drug RA, Biotransformer, and GLORYx.

Results and discussion. After analyzing the possible metabolic pathways of ethyl 3-[(2-methyl-4-oxo-1H-quinolin-3-yl)methylamino]benzoate using five different online systems, it was found that the main directions are hydrolysis of the ester group, aromatic hydroxylation of the molecule with the participation of carbon atoms of both the quinolone heterocyclic system and the phenyl substituent, as well as N-dealkylation of the aminomethyl fragment. The predicted metabolites are unlikely to significantly affect the overall pharmacological activity profile of the parent molecule. However, the possible directions of aliphatic hydroxylation of the methyl group at position 2 of the heterocycle with further oxidation to kynurenic acid derivatives suggest that the proven pharmacodynamic effects of the test molecule may be at least partially provided by these pharmacologically active metabolites.

Conclusions. We have performed a computer prediction of possible pathways of biotransformation of a promising compound, ethyl 3-[(2-methyl-4-oxo-1H-quinolin-3-yl)methylamino]benzoate, using five different freely available online resources. The metabolic transformations of the test molecule align with the current views of medicinal chemistry on the reactivity of xenobiotics under the influence of cytochrome P450 enzymes in the human body.

Продолжение приложения А



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ



СЕРТИФІКАТ УЧАСНИКА

Цим засвідчується, що

El Gamh Fatima Ezzahra
Scientific supervisor: prof. Podolsky I.M.

брав(ла) участь у роботі
XXX Міжнародної науково-практичної конференції 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