

Бабков Денис Александрович

**МИШЕНЬ-ОРИЕНТИРОВАННЫЙ ПОИСК АНТИДИАБЕТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ
И ИХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА**

3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора фармацевтических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации на базе Научного центра инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством и кафедры фармакологии и биоинформатики.

Научные консультанты: Спасов Александр Алексеевич, академик РАН, З.Д.Н. РФ, доктор медицинских наук, профессор;

Васильев Павел Михайлович, доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: Каленикова Елена Игоревна, заведующий кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», доктор фармацевтических наук, профессор;

Воронина Татьяна Александровна, заведующий лабораторией психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», доктор медицинских наук, профессор;

Покровский Михаил Владимирович, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Минобрнауки РФ, доктор медицинских наук, профессор

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «__» _____ 2023 г. в ____ ч. на заседании диссертационного совета 21.2.005.02 ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу 400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте (www.volgmed.ru) ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета, доктор медицинских наук

Шаталова Ольга Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Сахарный диабет и его отдаленные последствия являются одной из ведущих причин ранней потери трудоспособности, инвалидизации и смертности. В динамике 2016-2021 гг. сохраняется рост распространенности сахарного диабета как в России, так и в мире, преимущественно за счет сахарного диабета 2-го типа (СД2) [Shestakova и др., 2019; IDF Diabetes Atlas. Ninth edition, 2019], отмечается уменьшение количества пациентов с достижением целевого уровня HbA1c менее 7% [Frontoni, Picconi, 2018]. Смертность от СД2 составила 60,29 на 100 тыс. населения, что втрое превышает суммарную смертность от ВИЧ, туберкулеза, вирусных гепатитов и сепсиса за тот же период [Dedov и др., 2018].

В настоящее время в клинической практике используются 11 классов антидиабетических лекарственных средств, однако они способны лишь замедлить развитие сахарного диабета 2-ого типа, обладая ограниченной способностью корректировать инсулинорезистентность [Петров и др., 2010; Аметов, Тертычная, 2019]. Исследования показывают, что даже у пациентов, приверженных адекватной комбинированной антигипергликемической терапии, не удается достичь целевых значений гликированного гемоглобина [Juarez и др., 2014]. Современные и находящиеся на поздних стадиях разработки новые методы лечения все еще имеют существенные недостатки, такие как ограниченная эффективность, нежелательные побочные эффекты и субоптимальные фармакокинетические параметры [Tahrani, Barnett, Bailey, 2016]. Разработка и внедрение новых антидиабетических средств, направленных на восстановление активности сигнального пути инсулина, борьбу с системным воспалением и защиту эндокриноцитов поджелудочной железы, может позволить решить принципиально важные проблемы терапии сахарного диабета: сохранить функциональную массу β -клеток и гипергликемическое повреждение периферических тканей [Statsenko, Streltsova, Turovets, 2021; Wang и др., 2021].

Разработка принципиально новых антидиабетических средств и средств профилактики и терапии отдаленных последствий сахарного диабета является крайне актуальной задачей [Belete, 2020]. Её решение и внедрение в практическое здравоохранение новых лекарственных средств способно существенно повысить качество жизни больных и снизить социальные и экономические потери, связанные с растущей заболеваемостью сахарным диабетом.

Степень разработанности темы

В настоящее время наблюдается изменение парадигмы лечения СД2. Согласно существующим рекомендациям, применяют комбинации монотаргетных ЛС, влияющих на отдельные патогенетические звенья СД2, с целью достижения строгого гликемического контроля [Dedov и др., 2020]. Однако, согласно клиническим данным, он труднодостижим и не предотвращает прогрессирования заболевания, с течением времени приводя к снижению функциональной массы β -клеток и необходимости инсулинотерапии [Rodriguez-Gutierrez и др., 2019].

Сейчас становится очевидно, что сложный патогенез СД2, включающий порочные круги липотоксичности, периферической инсулинорезистентности, системного хронического метавоспаления, дисфункции и апоптоза β -клеток, требует столь же комплексной фармакологической коррекции. Наиболее актуальными можно считать терапевтические стратегии, направленные на снижение секреторной нагрузки на β -клетки [Saisho, 2019], предотвращение их апоптоза и стимулирование пролиферации [Saisho, 2020, 2019] с параллельным снижением избыточной массы тела [Недогода, 2020] и иммунометаболических

нарушений [Tuurenkov и др., 2019], во многом обуславливающих развитие осложнений и повышенный сердечно-сосудистый риск [Shestakova и др., 2022; Donath и др., 2013]. Учитывая универсальный характер регуляции энергетического, углеводного и липидного обменов клеток-мишеней инсулина, β -клеток и тканевых макрофагов, разработка метаболитных средств создает возможность плеiotропного воздействия на патогенез и течение СД2.

Таким образом, одними из наиболее перспективных мишеней для инновационных антидиабетических средств являются белки-участники сигнальных путей, регулирующих инсулино- и лептинорезистентность гепатоцитов, адипоцитов и миоцитов [Спасов и др., 2013], а также выживаемость и пролиферацию β -клеток поджелудочной железы [Wang и др., 2021] и активацию иммунокомпетентных клеток [Itariu и др., 2014]. Например, метформин, являющийся «золотым стандартом» терапии СД2, частично реализует свое действие через АМФ-активируемую протеинкиназу (АМРК) [Foretz, Guigas, Viollet, 2019]. Новые активаторы АМРК в настоящее время проходят клинические испытания [Poxel SA, 2020]. Активаторы глюкокиназы активно изучаются в клинических исследованиях, но не были разрешены для клинического применения [Thilagavathi и др., 2022]. Ингибиторы киназы гликогенсинтазы типа 3В активно изучаются в качестве нейропротекторных средств для лечения нейродегенеративных заболеваний [Martinez и др., 2002]. Ингибиторы РТР1В доказали антидиабетическую эффективность в доклинических исследованиях, а также безопасность и переносимость в клинических испытаниях 2-ой фазы [Singh и др., 2022]. В настоящее время в клинической практике отсутствуют лекарственные средства, реализующие свой эффект за счет прямого влияния на активность указанных белков-мишеней (АМРК, РТР1В, GSK3В, GSK). Идентификация низкомолекулярных соединений, способных восстановить физиологический уровень активности сигнального пути инсулина, предотвращать апоптоз β -клеток и стимулировать их пролиферацию является предметом активных исследований [Wang и др., 2021].

Ожидаемая стоимость разработки нового препарата сегодня достигла 1-2 миллиардов долларов США, средний срок разработки составляет 15-20 лет, в итоге регистрируются для клинического применения не более 5% соединений [Dahlin, Inglese, Walters, 2015]. Многие фармацевтические компании сокращают расходы на инновационные исследования, фокусируясь на менее рискованных и затратных проектах, таких как внедрение воспроизведенных лекарственных препаратов. С другой стороны, многочисленные академические научные центры заняты фундаментальными и прикладными биомедицинскими исследованиями, особенно в областях выявления новых мишеней воздействия на метаболические дефекты СД2 и ранних этапов разработки лекарственных средств [Parrish и др., 2018]. При этом, как правило, они не обладают достаточными ресурсами для выполнения масштабных доклинических и клинических исследований. В тоже время, разработка открытых программных инструментов и общедоступных баз данных химической и биологической информации создает условия для разработки ресурсо-эффективных подходов к ранним этапам разработки ЛС [Martinez-Mayorga и др., 2020].

Цели исследования

Целью настоящего исследования является разработка системы мишень-ориентированного поиска соединений – регуляторов активности киназ, обладающих комплексными антидиабетогенными свойствами – снижающих периферическую инсулинорезистентность и системное воспаление, стимулирующих пролиферацию β -клеток поджелудочной железы, нормализующих метаболизм глюкозы и липидов в условиях СД2.

Задачи исследования

1. Разработка технологии мишень-ориентированного поиска высокоактивных соединений, обладающих плейотропной антидиабетической активностью – снижающих инсулинорезистентность за счет восстановления активности сигнального пути рецептора инсулина, подавляющих апоптоз или стимулирующих пролиферацию β -клеток поджелудочной железы, нормализующих гомеостаз углеводов и липидов, корректирующих системные иммунометаболические нарушения – с использованием комплекса информационных технологий валидации мишеней, компьютерного прогноза лекарственного подобия и биологической активности химических соединений (методов молекулярного подобия и фармакофорного анализа).

2. Проведение экспериментального скрининга новых гетероциклических производных *in vitro* для определения их влияния на целевые белковые мишени: киназу гликогенсинтазы типа 3 β , АМФ-активируемую протеинкиназу, протеинтирозинфосфатазу типа 1В, глюкокиназу. Изучение взаимосвязей структура-активность.

3. Изучение антидиабетической активности наиболее перспективных ингибиторов GSK3 β на клеточных моделях и при однократном и/или длительном введении на моделях сахарного диабета *in vivo* с оценкой влияния на углеводный и жировой обмен, инсулинорезистентность, системное воспаление, оценку антитромботической активности. Определение острой токсичности наиболее активных соединений и обоснование перспективности их доклинического изучения для лечения сахарного диабета, метаболического синдрома и ожирения.

4. Исследование антидиабетической активности наиболее перспективных активаторов АМПК на клеточной модели воспаления и при однократном и/или длительном введении по влиянию на гликемический контроль экспериментальных животных. Изучение острой токсичности наиболее активных соединений. Обоснование перспективности доклинического изучения новых фармакологически активных соединений для лечения сахарного диабета, метаболического синдрома и ожирения.

5. Определение антидиабетической активности наиболее перспективных ингибиторов РТР1В при однократном и/или длительном введении на моделях сахарного диабета *in vivo* с оценкой влияния на гомеостаз глюкозы, липидный обмен и инсулинорезистентность. Оценка острой токсичности наиболее активных соединений. Обоснование перспективности их доклинического изучения для лечения сахарного диабета, метаболического синдрома и ожирения.

6. Изучение антидиабетической активности наиболее перспективных активаторов GSK при однократном и/или длительном введении на моделях сахарного диабета *in vivo*, включая определение чувствительности к инсулину, влияние на метаболизм глюкозы и липидов, системное воспаление, пролиферацию β -клеток. Изучение острой токсичности наиболее активных соединений и обоснование перспективности их доклинического изучения для лечения сахарного диабета.

Научная новизна

Показана возможность плейотропного воздействия на ключевые звенья патогенеза СД2 через GSK3 β , РТР1В, АМПК, GSK-опосредованную регуляцию активности внутриклеточных сигнальных каскадов и метаболических путей. Выявлены новые фармакологически активные соединения, перспективные для дальнейшего доклинического изучения.

Найдено, что соединение K-167 (Z-3-(пиридин-2-илметил)индолин-2-он) является наномолярным ингибитором GSK3B, нецитотоксично, обладает плеiotропной антидиабетической активностью на животной модели сахарного диабета 2-го типа, нормализуя гиперинсулинемию, снижая инсулинорезистентность, улучшая толерантность к глюкозе, уменьшая массу висцеральных жировых отложений и триглицериды печени, корректируя маркеры системного воспалительного процесса, а также обладает выраженным антитромботическим действием.

Показано, что соединения BIF-68 и BIF-69 (гидробромид 4'-(3,4-дигидро-пиримидо-[1,2-a]бензимидазол-10(2H)-ил-метил)бифенил-2-карбонитрила и гидробромид 4'-(2,3,4,5-тетрагидро-1H[1,3]дiazеино[1,2-a]-бензимидазол-11-ил-метил)бифенил-2-карбонитрила) являются субмикромольными активаторами АМПК и ингибируют синтез оксида азота ЛПС-стимулированными макрофагами, обладая низкой цитотоксичностью, при этом не обладают гипогликемической активностью *in vivo*.

Выявлено соединение AZH-141a (1-(2-диметиламиноэтил)-3-(бифенил-4-ил)метил-2-имино-бензамидазолия гидробромид), микромолярный ингибитор РТР1В и активатор АМПК, обладающее плеiotропной антидиабетической активностью на животной модели сахарного диабета 2-го типа, улучшая толерантность к глюкозе и гликемию натощак, а также корректирует липидный гомеостаз, снижая концентрацию общего холестерина и липопротеинов низкой плотности плазмы крови, массу висцеральных жировых отложений и массу тела животных.

Установлено, что соединение NP-0006 (бис(3,4-дигидроксиметил-5-гидрокси-6-метилпиридин-2-илметил)сульфан) является микромолярным активатором GSK и обладает плеiotропной антидиабетической активностью на животной модели сахарного диабета 2-го типа, снижая гиперинсулинемию, инсулинорезистентность, улучшая толерантность к глюкозе, ингибируя глюконеогенез, восстанавливая синтез гликогена, снижая массу тела животных за счет уменьшения ретроперитонеальных и мезентериальных висцеральных жировых отложений и корректируя маркеры системного воспаления. NP-0006 повышает пролиферативную активность эндокриноцитов островков Лангерганса поджелудочной железы мышей с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа.

Теоретическая и практическая значимость работы

Предложена оригинальная методология комплексного направленного поэтапного мишень-ориентированного поиска новых антидиабетических соединений с последовательным изучением *in silico*, *in vitro* и *in vivo*, позволяющая эффективно выявлять новые активные соединения с благоприятными фармакокинетическими и токсикологическими характеристиками. Система отличается рациональным выбором и приоритизацией биологических мишеней, использованием методов хемоинформатики для отсева соединений с низким лекарственным подобием и выбора для экспериментального изучения структур, фармакофорно близких к известным модуляторам мишени с последующей валидацией соединений-лидеров. Проведен виртуальный скрининг 2309 структур, 303 отобранных соединения экспериментально изучены по влиянию на активность 4 целевых белковых мишеней. Эффективность предложенной системы поиска подтверждена выявлением новых химических классов и скаффолдов ингибиторов GSK3B и РТР1В, активаторов АМПК и GSK.

Показано, что 3-арилден-2-оксиндолы являются перспективным скаффолдом для поиска и разработки ингибиторов GSK3B. Найдены 2'-карбонитрилбифенил-конъюгированные бензо[d]имидазо[1,2-a]имидазолы, перспективные для поиска активаторов АМПК. Выявлено,

что бифенил-замещенные 2-аминобензимидазолы и 2-иминобензимидазолы являются перспективным скаффолдом для поиска новых ингибиторов РТР1В. Установлено, что бис-пиридоксиновые соединения с линкерным серусодержащим алифатическим фрагментом являются новым и перспективным скаффолдом для поиска и разработки активаторов GSK.

Доказана антидиабетическая активность наиболее перспективных веществ. Показана возможность плейотропного воздействия на метаболические дефекты СД2 через регуляцию активности внутриклеточных сигнальных каскадов. Доказана перспективность поиска полифункциональных антидиабетических соединений. Комплексное исследование фармакологических свойств наиболее эффективных соединений обосновало перспективность доклинического изучения ингибитора GSK3В соединения К-167, ингибитора РТР1В/активатора АМПК соединения АЗН-141а и активатора GSK соединения NP-0006. Заложены основы создания лекарственных препаратов с оригинальным механизмом действия для улучшения лечения социально значимых заболеваний.

Методология и методы исследования

Использовали геномные и протеомные данные, агрегированные в системах OpenTargets, TargetMine, Pharos. Хемоинформатический и фармакофорный анализ выполнен с помощью пакета DataWarrior и базы данных ChEMBL, web-сервисов ADMETlab, ADMETsar, SwissADME, Pro-Tox II.

Биохимический скрининг проводили с использованием платформы ADP-Glo™, люминесцентного, спектрофотометрического и флюориметрического анализа с использованием рекомбинантных АМПК, GSK3В, РТР1В и GSK человека.

Использованы модели сахарного диабета на нелинейных крысах, нелинейных мышах и мышах C57bl/6j с индукцией стрептозотоцином внутрибрюшинно, высокожировой диетой или их комбинацией. При исследовании показателей углеводного обмена животных определяли гликемию, толерантность к глюкозе и инсулинорезистентность, гликоген печени. Жировой обмен оценивали по липидному профилю периферической крови и триглицеридам печени, мофрометрии висцеральных жировых отложений и массе тела животных. Тромбоз моделировали аппликацией раствора хлорида железа (III) на сонную артерию. Количество и пролиферацию β -клеток поджелудочной железы определяли иммуногистохимически с использованием антител к инсулину, глюкагону, маркеру пролиферации Ki-67 с последующей морфометрической обработкой данных. Острая токсичность определялась при 2-недельном наблюдении. Все исследования с использованием животных были одобрены Региональным независимым этическим комитетом, регистрационный номер IRB0005839 IORG0004900 (ONRP), протоколы № 2090-2016 от 23 декабря 2016 г. и № 2021/042 от 29 апреля 2021 года..

Реализация результатов исследования

Разработанная методология поиска и изучения потенциальных противодиабетических соединений внедрена в научно-исследовательскую работу Научного центра инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, включена в учебно-методический процесс на кафедрах фармакологии и биоинформатики, фармакологии и фармации Института НМФО ВолгГМУ, фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России.

Полученные данные о взаимосвязях структура-активность используются в направленном синтезе новых химических соединений на кафедре медицинской химии и тонкого органического синтеза Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, в Научно-исследовательском институте физической и органической химии Южного

федерального университета, Научно-образовательном центре фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета, кафедрах органической и биомолекулярной химии Уральского федерального университета им. первого Президента России Б.Н. Ельцина и Института органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН.

Значительная часть исследований, изложенных в работе, выполнена в рамках проекта Российского Научного Фонда № 14-25-00139 от 7 августа 2014 г. «Создание системы мишень-ориентированного поиска биологически активных соединений, влияющих на патогенетически важные звенья нарушения углеводного обмена при сахарном диабете типа 2, с использованием технологий компьютерного моделирования и медицинской химии».

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанная оригинальная система мишень-ориентированного поиска антидиабетических средств, основанная на рациональной приоритизации мишеней, вычислительной оценке лекарственного подобия, токсичности, фармакокинетических свойств и фармакофорного подобия соединений, подтверждением активности новых соединений *in vitro*, на клеточных и животных моделях, позволяет отсеивать неперспективные соединения и эффективно отбирать и идентифицировать новые соединения, перспективные для поиска антидиабетических средств.

2. 3-Арилиден-2-оксиндолы являются перспективным скаффолдом для поиска и разработки ингибиторов GSK3B.

3. Соединение К-167 (*Z*-3-(пиридин-2-илметил)индолин-2-он) является наномолярным ингибитором GSK3B (IC_{50} 4 нМ), проявляет низкую цитотоксичность, подавляет провоспалительную активацию макрофагов и обладает плеiotропной антидиабетической активностью на животной модели сахарного диабета 2-го типа (мышь C57BL/6J с алиментарным ожирением) при 3-х месячном пероральном введении, нормализуя гиперинсулинемию, снижая инсулинорезистентность, улучшая толерантность к глюкозе, снижая массу висцеральных жировых отложений и триглицериды печени, а также корректирует маркеры системного воспалительного процесса. Соединение К-167 в дозе 30 мг/кг оказало более выраженное антитромботическое действие, чем препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в дозе 150 мг/кг. К-167 относится к 5-му классу токсичности (нетоксичные соединения).

4. 2'-Карбонитрилбифенил-конъюгированные бензо[*d*]имидазо[1,2-*a*]имидазолы являются перспективным скаффолдом для поиска и разработки активаторов АМПК.

5. Соединения VIF-68 и VIF-69 (гидробромид 4'-(3,4-дигидро-пиримидо-[1,2-*a*]бензимидазол-10(2*H*)-ил-метил)бифенил-2-карбонитрила и гидробромид 4'-(2,3,4,5-тетрагидро-1*H*[1,3]дiazеино[1,2-*a*]-бензимидазол-11-ил-метил)бифенил-2-карбонитрила) являются субмикромольными активаторами АМПК (EC_{50} 0,34 мкМ и 0,44 мкМ, соответственно) и ингибируют синтез оксида азота ЛПС-стимулированными макрофагами, обладая низкой цитотоксичностью.

6. Бифенил-замещенные 2-аминобензимидазолы и 2-иминобензимидазолы являются перспективным скаффолдом для поиска и разработки ингибиторов РТР1В.

7. Соединение AZH-141a (1-(2-диметиламиноэтил)-3-(бифенил-4-ил)метил-2-имино-бензо[*d*]имидазолия гидробромид) является микромолярным ингибитором РТР1В (IC_{50} 30,5 мкМ) и микромолярным активатором АМПК (EC_{50} 21,7 мкМ) и обладает плеiotропной антидиабетической активностью на животной модели сахарного диабета 2-го типа (крысы с алиментарным ожирением и индукция стрептозотоцином) при 21-дневном пероральном

введении, значимо улучшая толерантность к глюкозе и гликемию натощак, а также корректирует липидный гомеостаз, снижая концентрацию общего холестерина и липопротеинов низкой плотности плазмы крови, массу висцеральных жировых отложений и массу тела животных. AZH-141a относится к 3-му классу токсичности (умеренно токсичные соединения).

8. Бис-пиридоксиновые соединения с линкерным серусодержащим алифатическим фрагментом являются перспективным скаффолдом для поиска и разработки активаторов GSK.

9. Соединение NP-0006 (бис(3,4-дигидроксиметил-5-гидрокси-6-метилпиридин-2-илметил)сульфан) является микромолярным активатором GSK (EC_{50} 18,6 мкМ; E_{max} 150,6±1,8%) и обладает плейотропной антидиабетической активностью на животной модели сахарного диабета 2 типа (мыши C57BL/6J с алиментарным ожирением) при 3-х недельном внутрибрюшинном введении, снижая гиперинсулинемию, инсулинорезистентность, улучшая толерантность к глюкозе, ингибируя глюконеогенез, восстанавливая синтез гликогена, снижая массу тела животных за счет уменьшения ретроперитонеальных и мезентериальных висцеральных жировых отложений и корректируя маркеры системного воспаления. NP-0006 повышает пролиферативную активность эндокриноцитов островков Лангерганса поджелудочной железы мышей с экспериментальным СД1 при однократном введении в дозе 50 мг/кг. NP-0006 относится к 4-му классу токсичности (малотоксичные соединения).

Степень достоверности работы

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала с использованием современных методов и методических подходов, соответствующих поставленным задачам. Сформулированные в диссертации выводы были подтверждены экспериментальным материалом, анализом литературы, точностью статистической обработки полученных результатов.

Апробация результатов работы

Основные положения диссертационной работы докладывались, обсуждались и представлялись на 22-ом Открытом межрегиональном конгрессе «Volga Pharma Summit» (г. Волгоград, 2017 г.), Всероссийской конференции «MedChem Russia 2019» (г. Екатеринбург, 2019 г.), XXV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (г. Москва, 2018 г.), Всероссийской научной конференции молодых ученых «Достижения современной фармакологической науки» (г. Рязань, 2018 г.), 76-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (г. Волгоград, 2018 г.), Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (г. Москва, 2019 г.), XXIV Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области (г. Волгоград, 2019 г.), 77-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (г. Волгоград, 2019 г.), 78-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (г. Волгоград, 2020 г.), XXV Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области (г. Волгоград, 2020 г.), Весенней школе-конференции по медицинской химии «МедХимРар-21» (г. Москва, 2021 г.); 79-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (г. Волгоград, 2021 г.), XX Менделеевском съезде по общей и

прикладной химии (г. Екатеринбург, 2016 г.), конференции 26th Young Research Fellows Meeting (Франция, г. Париж, 2019), Всероссийской конференции «MedChem Russia 2022» (г. Волгоград, 2022 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 24 печатных работ, из них 13 в ведущих научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 1 учебное пособие и 1 монография. Получено 6 патентов на изобретения РФ.

Личный вклад автора

Вклад автора заключается в определении направления и планировании исследования, непосредственном участии во всех этапах исследования. Автором разработана методология поиска новых антидиабетических соединений, выполнены этапы компьютерной обработки и отбора соединений. Вклад в выполнение экспериментальной работы заключался в планировании, личном участии в проведении экспериментов, анализе и интерпретации полученных данных. При написании диссертационной работы автором выполнен анализ отечественной и зарубежной литературы, сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и практических рекомендаций, оформление рукописи. Автором выполнена подготовка, написание и подготовка к публикации статей по материалам исследования в научных изданиях, подготовка заявок на регистрацию изобретений.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 237 страницах машинописного текста и состоит из введения, 7 глав, обсуждения, выводов, практических рекомендаций, перечня сокращений и условных обозначений и списка литературы. Работа иллюстрирована 72 рисунками и 28 таблицами. Библиографический указатель включает 460 источников, из них 12 отечественных, 448 иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **главе 1** изложены современные взгляды на этиологию и патогенез сахарного диабета 2-го типа, а также существующие фармакотерапевтические подходы. Особое внимание уделено проблеме потери функциональной активности β -клеток и смене парадигмы лечения СД2 от гликемического контроля к защите (обеспечению секреторного покоя) и стимуляции регенерации β -клеток. Отмечены проблемы современной разработки лекарственных средств и пути их решения, предлагаемые хемоинформатикой и другими информационными технологиями, от фазы выбора биологической мишени до отбора соединений для экспериментального скрининга.

В **главе 2** описаны материалы и методы, которые были использованы в исследовании. Объектами изучения были 2309 низкомолекулярных соединений, принадлежащих разнообразным химическим классам. Приведены методы расчета характеристик лекарственного подобия, токсичности и фармакокинетических свойств и молекулярного подобия, которые были использованы для виртуального скрининга. Отобранные соединения исследовались в микропланшетном формате как ингибиторы GSK3 β , ингибиторы PTP1B, активаторы АМПК или активаторы GSK. Далее для характеристики соединений изучалась цитотоксичность, влияние на захват глюкозы фибробластами, влияние на воспалительную активацию макрофагов. При изучении антидиабетической активности *in vivo* использованы модели сахарного диабета 2-го типа: мыши C57bl/6j с ожирением, вызванным высокожировой диетой (ВЖД); нелинейные крысы, получавшие ВЖД в сочетании с введением 35 мг/кг стрептозотоцина (STZ)

внутрибрюшинно. Соединения-лидеры изучались при однократном введении в тесте толерантности к глюкозе. При длительном введении изучался широкий ряд показателей углеводного и жирового обмена: гликемия натощак, толерантность к глюкозе, уровень инсулина, показатель инсулинорезистентности, гликоген печени, липидный профиль периферической крови, триглицериды печени, масса висцеральных жировых отложений, масса тела, маркеры системного воспаления – лейкоцитарная формула, уровни воспалительных цитокинов, маркеры оксидативного стресса – продукты перекисного окисления и восстановленный глутатион. Влияние на пролиферацию β -клеток исследовалось иммуногистохимически с применением антител к инсулину, глюкагону, маркеру пролиферации Ki-67 и ДНК-красителя DAPI на модели сахарного диабета 1-го типа у белых мышей, вызванного введением 200 мг/кг STZ внутрибрюшинно. Острая токсичность изучалась при на белых беспородных мышах при 2-недельном наблюдении.

В главе 3 описывается разработанная система мишень-ориентированного поиска антидиабетических соединений (Рисунок 1). Представлен методический подход для оценки и приоритизации инновационных мишеней разработки ЛС, использующий комплекс геномных, протеомных, экспериментальных и клинических данных. В результате валидированы четыре антидиабетические мишени (Таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика выбранных антидиабетических стратегий

Механизм действия	Влияние на инсулин-зависимые ткани	Влияние на β -клетки поджелудочной железы	Влияние на системное воспаление
Ингибирование киназы гликогенсинтазы 3-бета (GSK3B)	Стимулирует захват и утилизацию глюкозы, синтез гликогена	Защищает от апоптоза	Подавляет провоспалительную активацию макрофагов и выброс цитокинов
Активирование АМР-активируемой протеинкиназы (AMPK)	Стимулирует утилизацию глюкозы, расщепление липидов и окисление жирных кислот, подавляет глюконеогенез	Защищает от глюко- и липотоксичности	Стимулирует противовоспалительную активацию макрофагов
Ингибирование протеин-тирозинфосфатазы типа 1В (PTP1B)	Нормализует инсулино- и лептиночувствительность, снижает потребление пищи	Снижение секреторной нагрузки	Косвенное через нормализацию гомеостаза липидов
Активирование глюкокиназы (GCK)	Стимулирует захват и окисление глюкозы	Нормализует секрецию инсулина, стимулирует регенерацию	Косвенное через нормализацию гомеостаза глюкозы

Описана технология отбора соединений для экспериментального исследования с учетом критериев лекарственного подобия и подструктурных маркеров токсичности. Поиск наиболее активных ранее описанных низкомолекулярных ингибиторов или активаторов выбранных мишеней осуществлялся в публичной базе данных ChEMBL для использования их скаффолдов как образцов для виртуального скрининга библиотеки исследуемых соединений по критерию фармакофорной схожести. В результате формировали фокусированные мишень-специфические библиотеки для экспериментального скрининга. Выявленные активные соединения служили основой для формулирования закономерностей структура-активность и выбора соединений для дальнейшей валидации на клеточных и животных моделях. Одной из моделей служили ЛПС-

активированные первичные макрофаги мышей C57bl/6j, которые позволили параллельно оценить цитотоксичность и противовоспалительную активность соединений, как показатель способности соединений подавлять системное хроническое метавоспаление и индуцированную M1-макрофагами периферическую инсулинорезистентность. Проводилась оценка расчетных параметров фармакокинетики и безопасности соединений-лидеров, а также экспериментальное определение острой токсичности. Фармакологическую активность оценивали на животных моделях СД с определением мишень-специфических аспектов влияния на β -клетки и маркеры углеводного и жирового обмена.



Рисунок 1 – Принципиальная схема предложенной системы мишень-ориентированного поиска.

В главе 4 приведены результаты экспериментального скрининга ингибиторов GSK3B и изучения фармакологической активности наиболее перспективных соединений. В результате исследования фокусированной библиотеки соединений был выявлен перспективный скаффолд ингибиторов GSK3B – 3-арилиден-2-оксиндолы. Среди 42 испытанных соединений выявлено 16 ингибиторов GSK3B, из них 4 – с субмикромольной активностью. Наиболее активное соединение 3-(2-пиридинилметилден)-2-оксиндол (K-167) показало IC_{50} 4,19 нМ.

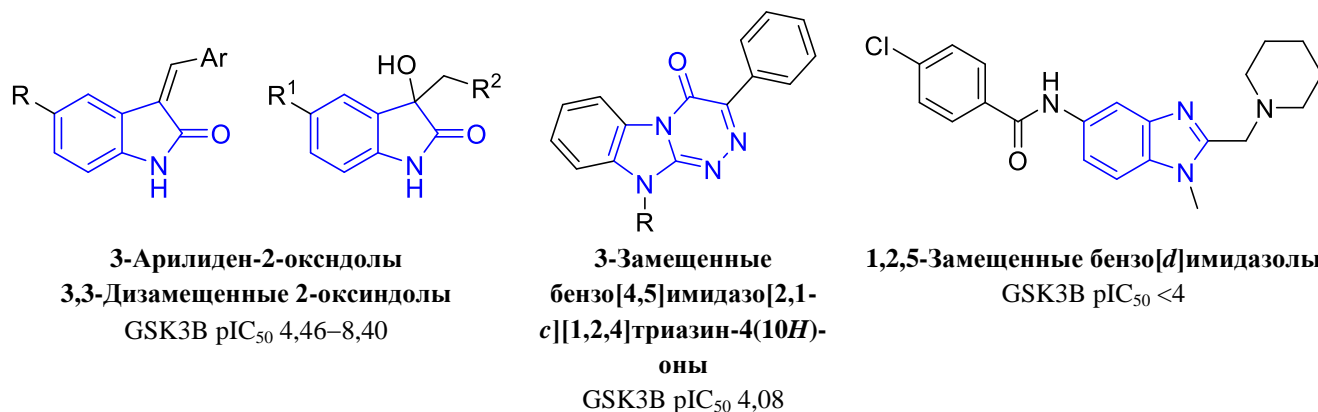


Рисунок 2 – Классы наиболее активных найденных ингибиторов GSK3B.

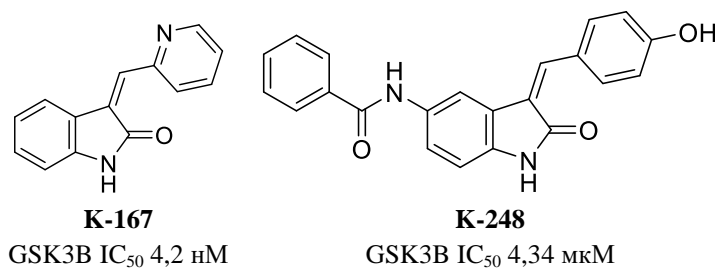


Рисунок 3 – Наиболее активные найденные ингибиторы GSK3B.

Все изученные ингибиторы GSK3B показали низкую цитотоксичность по отношению к моноцитам периферической крови человека и нормальным клеткам почек линии HEK293. Дальнейший отбор соединений проводился на клеточной модели ЛПС-индуцированного воспалительного ответа макрофагов, имитирующей активацию тканевых макрофагов при развитии алиментарного ожирения и инсулинорезистентности. Для пяти соединений показана способность подавлять продукцию оксида азота макрофагами, наибольшую активность показали соединения K-167 и K-248 (IC_{50} 13,9 и 8,8 мкМ, соответственно), также они ингибировали секрецию провоспалительного ИЛ-6 с IC_{50} 22,4 и 21,5 мкМ. Их фармакологический потенциал подтвержден способностью стимулировать захват глюкозы фибробластами крыс, культивируемыми в среде с концентрацией глюкозы 25 мМ.

При однократном введении мышам с экспериментальным СД2 DIO-C57BL/6J в дозе 30 мг/кг внутривенно соединение K-248 не показало значимого эффекта в тесте толерантности к глюкозе и было исключено из дальнейшего исследования. Соединение K-167 в той же дозе у пути введения проявило существенную антигипергликемическую активность как у диабетических мышей с алиментарным ожирением DIO-C57BL/6J, так и у диабетических инсулинорезистентных крыс HFD+STZ, эффект был сопоставим с вилдаглиптином в дозе 10 мг/кг. Таким образом, K-167 было выбрано как соединение-лидер для дальнейшего изучения при длительном введении мышам с СД2.

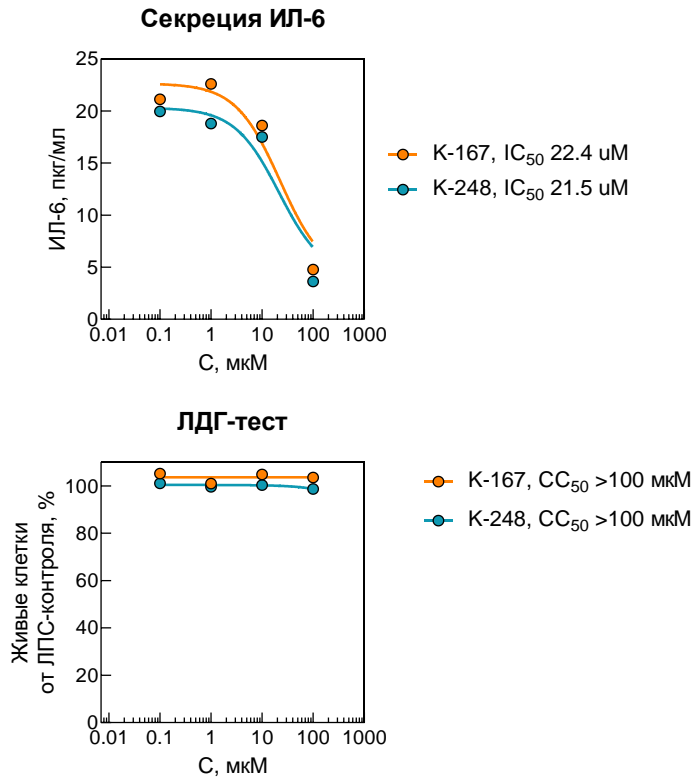


Рисунок 4 – Влияние соединений-лидеров на секрецию интерлейкина 6 ЛПС-стимулированными макрофагами мышей C57bl/6j. Данные представлены как среднее±SD, n = 3.

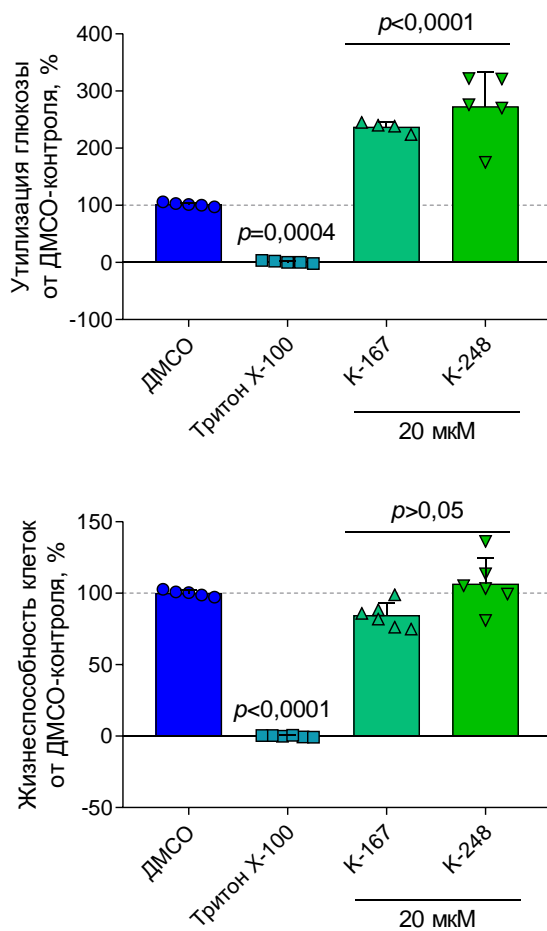


Рисунок 5 – Влияние соединений-лидеров на утилизацию глюкозы и жизнеспособность неонатальных фибробластов сердца крыс. Данные представлены как среднее±SD, n = 5-6. Статистическая значимость к ДМСО-контролю (1-сторонний ANOVA с пост-тестом Даннетта).

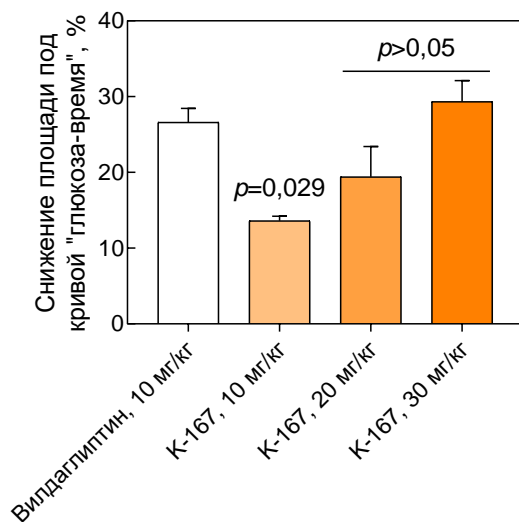
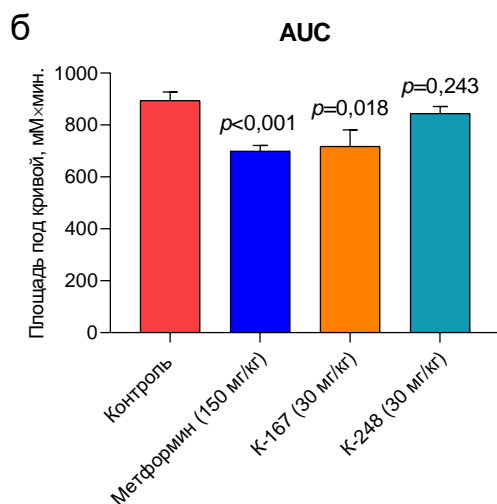
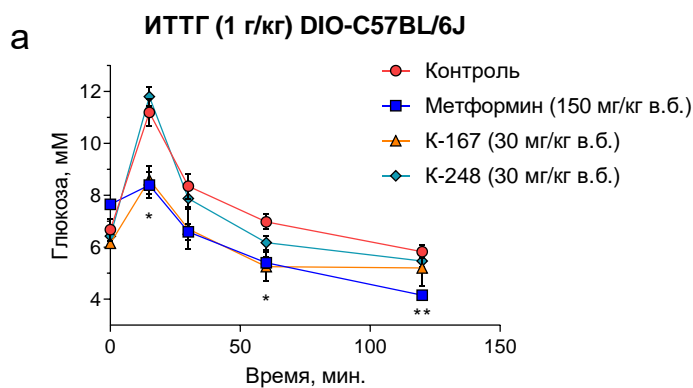


Рисунок 6 – Влияние соединений К-167, К-248 и метформина на гликемию при пероральном тесте толерантности к глюкозе у мышей с СД2 (DIO-C57BL/6J). Данные представлены как среднее±SD (n = 6). Статистическая значимость к контрольной группе (2-сторонний ANOVA с пост-тестом Туки): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (а) или непарный t-тест (б).

Рисунок 7 – Антигипергликемический эффект соединения К-167 (10, 20 и 30 мг/кг) и вилдаглиптина (10 мг/кг) при пероральной нагрузке 2 г/кг глюкозы у мышей DIO-C57bl/6j. Данные представлены как среднее±SD, n = 3. Статистическая значимость к группе вилдаглиптина (1-сторонний ANOVA с пост-тестом Даннетта).

При 3-месячном пероральном введении в дозе 30 мг/кг К-167 показало выраженную плейотропную антидиабетическую активность, сопоставимую или превосходящую эффект метформина в дозе 150 мг/кг. Показано значительное снижение уровня инсулина плазмы крови ($770,6 \pm 106$ пкг/мл против $3553 \pm 324,1$ пкг/мл в группе контроля), а также снижение инсулинорезистентности по показателю НОМА-IR ($5,29 \pm 0,67$ усл. ед против $7,47 \pm 0,41$ усл. ед в группе контроля). К-167 выражено улучшало толерантность к глюкозе, сопоставимой с таковой у препарата сравнения метформина в дозе 150 мг/кг перорально (площадь под кривой глюкоза время -15,0% против -12,9%) на 3-ий месяц введения. Показано снижение массы

висцеральных жировых отложений: ретроперитонеальных на 34,9%, мезентериальных на 33,5% и эпидидимальных на 36,9% по сравнению с группой СД2. Выявлено значимое снижение содержания триглицеридов печени на 24,3%. Отмечалось снижение признаков системного воспалительного процесса. Было показано достоверное восстановление количества сегментоядерных нейтрофилов ($18,6\pm 3\%$ против $30,0\pm 1,6\%$) и лимфоцитов ($76,6\pm 3,1\%$ против $63,0\pm 2,0\%$) по отношению к группе контроля. Соединение К-167 привело к достоверному снижению уровня ФНО- α (39,4%) и оксида азота (59,3%). На интактных крысах К-167 в дозе 30 мг/кг оказало более выраженное антитромботическое действие, чем препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в дозе 150 мг/кг (продолгование времени окклюзии сонной артерии, индуцированной аппликацией 50% раствора $FeCl_3$ $78,51\pm 19,48\%$ и $68,4\pm 16,4\%$, соответственно). Изучение острой 2-недельной токсичности показало, что К-167 относится к 5 классу токсичности (нетоксичные соединения), $LD_{50} > 5000$ мг/кг при пероральном введении белым беспородным мышам.

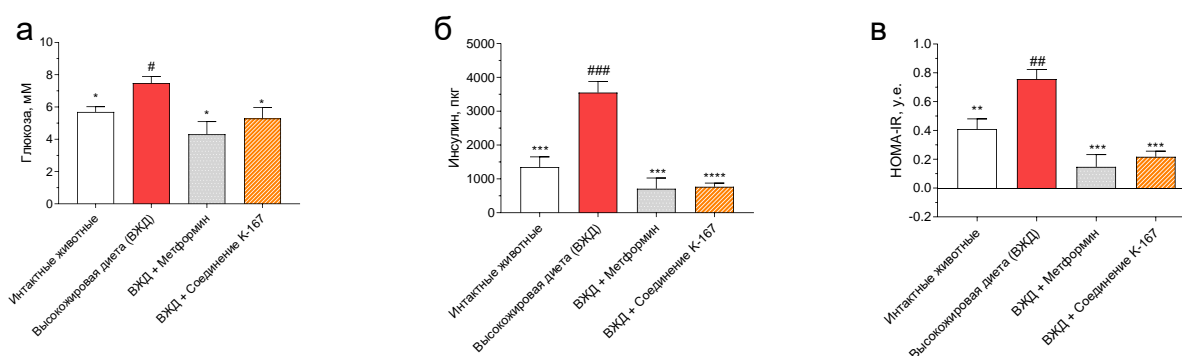


Рисунок 8 – Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на концентрацию глюкозы (а) и инсулина (б) плазмы крови, индекс НОМА-IR (в). Данные представлены как среднее \pm SD (n = 6). Статистическая значимость (непарный t-тест): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ к группе ВЖД; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ к интактной группе.

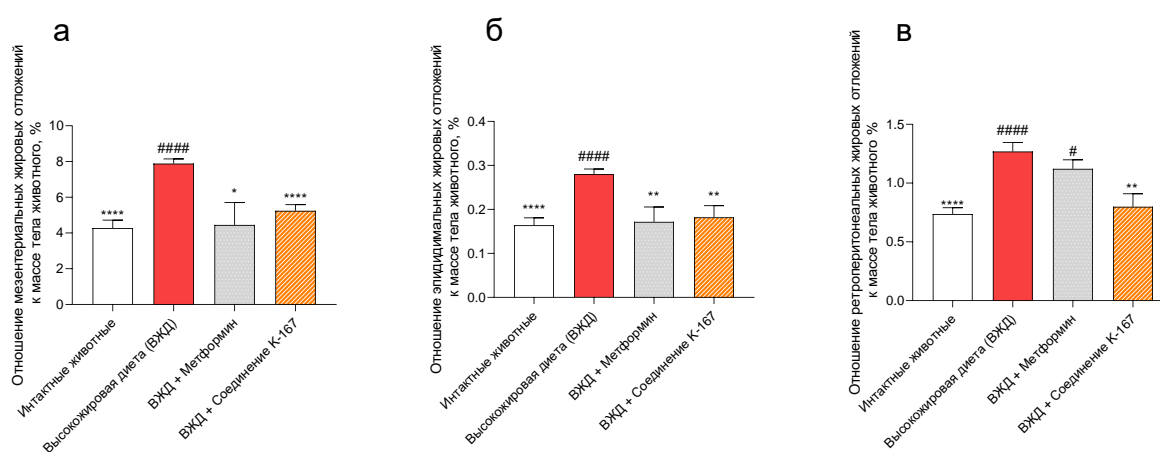


Рисунок 9 – Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на массу мезентериальных (а), эпидидимальных (б) и ретроперитонеальных (в) жировых отложений у животных с СД2 после курсового введения. Данные представлены как среднее \pm SD (n = 6). Статистическая значимость (непарный t-тест): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ к группе ВЖД; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ к интактной группе.

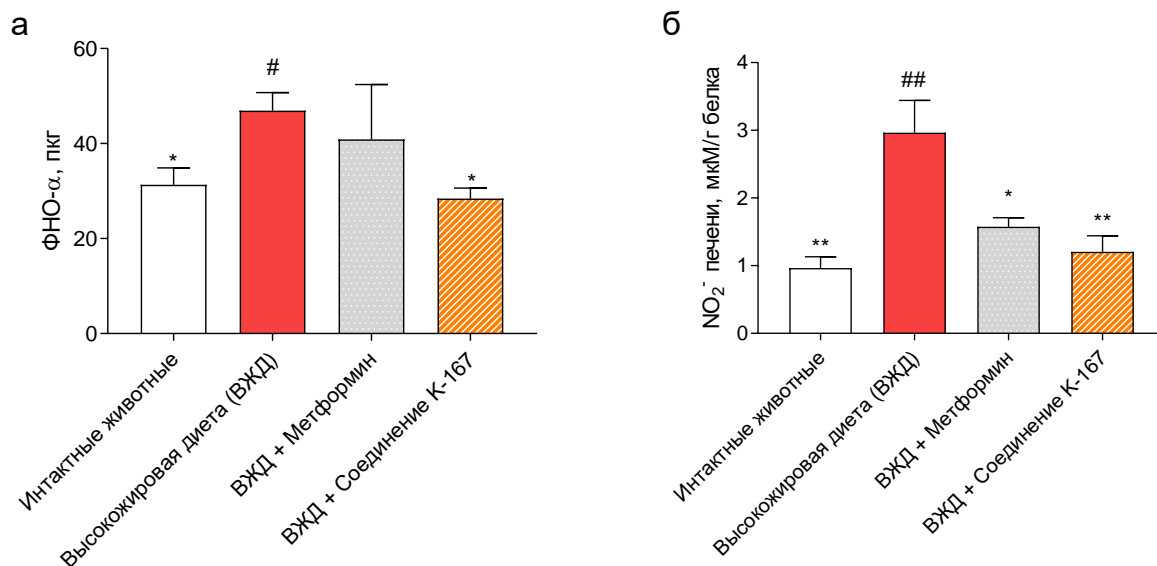


Рисунок 10 – Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень ФНО-альфа плазмы крови (а) и оксида азота печени (б) у животных с СД2. Данные представлены как среднее±SD (n = 6). Статистическая значимость (непарный t-тест): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ к группе ВЖД; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ к интактной группе.

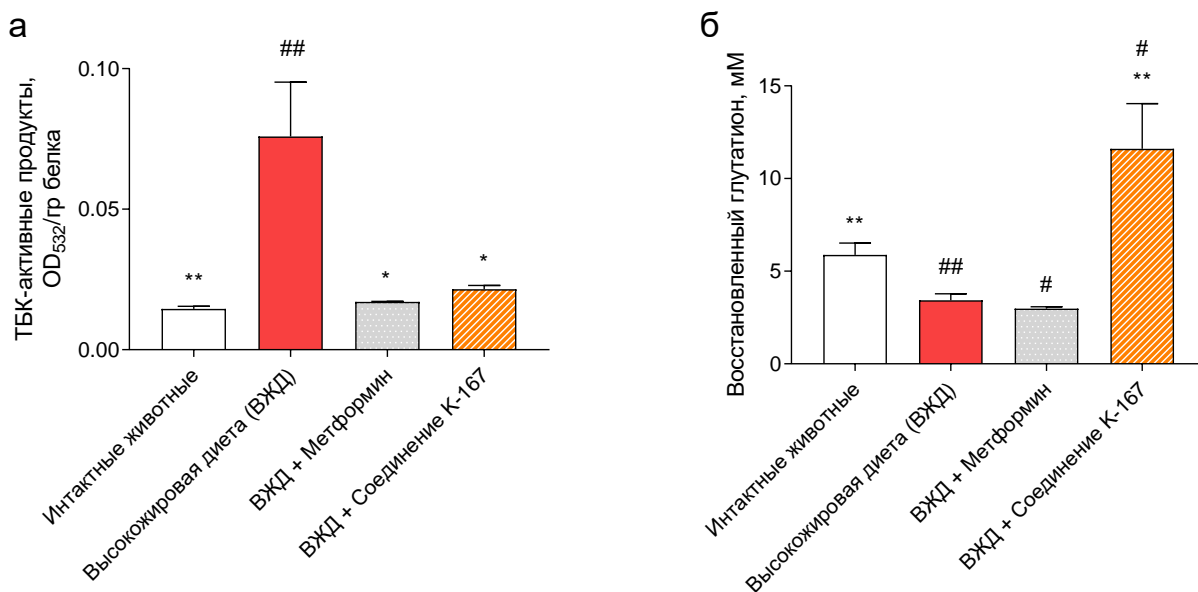


Рисунок 11 – Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень TBK-активных продуктов (а) и восстановленного глутатиона (б) печени у животных с СД2. Данные представлены как среднее±SD (n = 6). Статистическая значимость (непарный t-тест): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ к группе ВЖД; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ к интактной группе.

В главе 5 описаны результаты экспериментального скрининга активаторов АМРК и изучения фармакологической активности наиболее перспективных соединений. При

экспериментальном изучении 83 соединений фокусированной библиотеки 36 соединений в концентрации 10 мкМ активировали рекомбинантную АМПК человека на 50% и более. Величины EC_{50} определены для 8 наиболее активных соединений. Наибольшая активность и явная взаимосвязь структура-активность наблюдалась для 2'-карбонитрил-дифенил-замещенных конденсированных производных бензимидазола. Увеличение размеров внешнего цикла гетероциклического ядра от 5-членного до 7-членного положительно коррелировала с активацией АМПК. Последующая оценка влияния соединений-лидеров на воспалительную активацию перитонеальных макрофагов мышей C57bl/6j подтвердила, что наибольшей активностью обладают бифенильные производные бензимидазола AZH-143, ВIF-68, ВIF-69. Наиболее активные соединения ВIF-68 и ВIF-69 равноэффективно ингибировали синтез оксида азота макрофагами с IC_{50} около 5 мкМ, проявляя низкую цитотоксичность ($CC_{50} > 100$ мкМ согласно МТТ-тесту). К сожалению, ни ВIF-69, ни другие выявленные АМПК-активаторы не проявили гипогликемической активности в экспериментах на животных, возможно из-за недостаточной клеточной проницаемости. Тем не менее, учитывая высокую активность *in vitro*, синтетическую доступность и благоприятные характеристики лекарственного подобия, выявленные 2'-циано-бифенильные производные бензимидазолов можно рассматривать как базовый скаффолд для последующей оптимизации и разработки новых активаторов АМПК с плейотропной антидиабетической активностью.

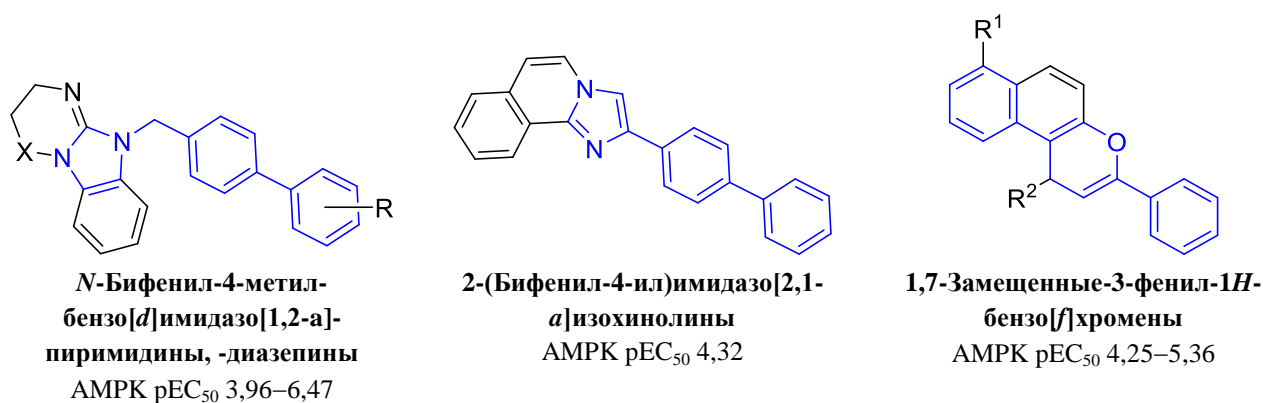


Рисунок 12 – Классы наиболее активных найденных активаторов АМПК.

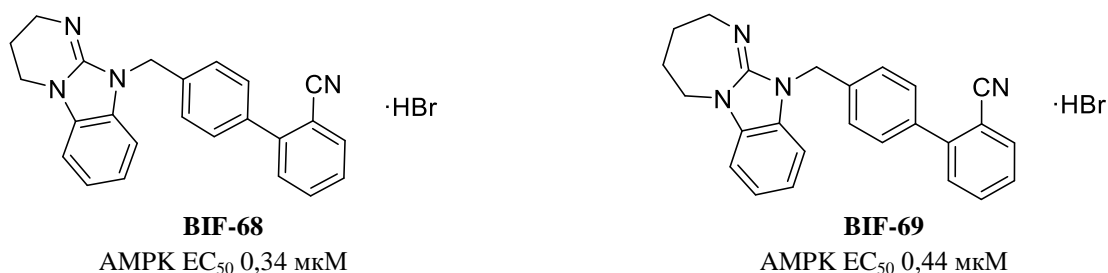


Рисунок 13 – Наиболее активные найденные активаторы АМПК.

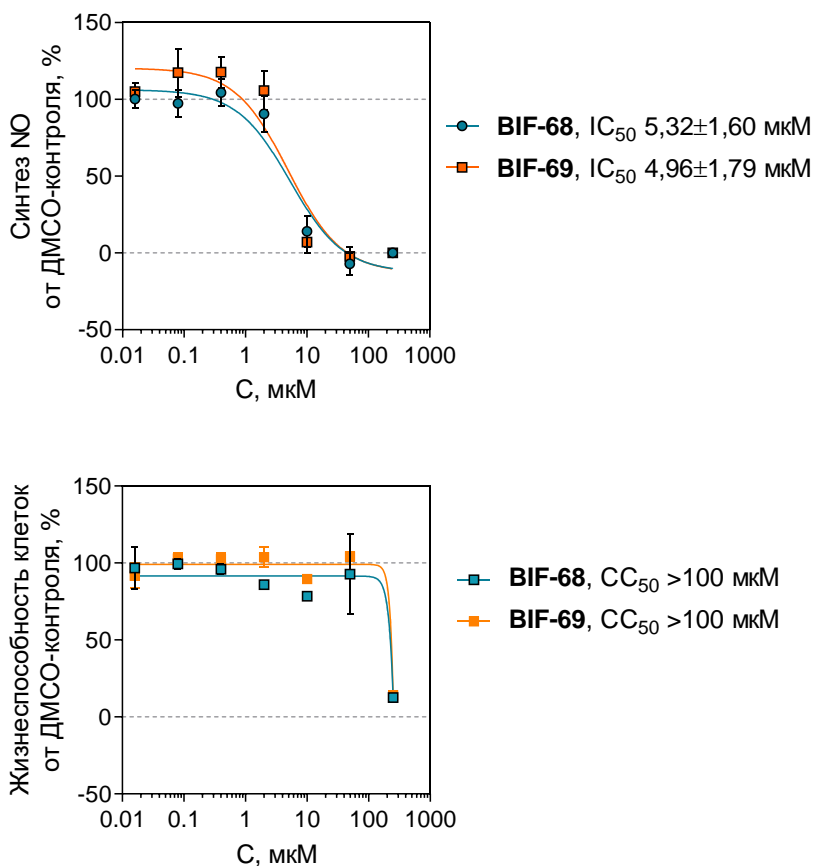
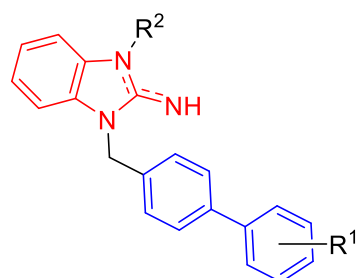
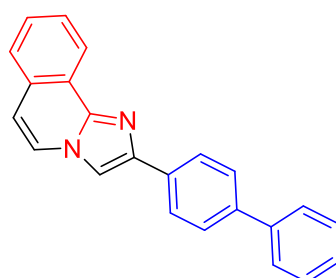


Рисунок 14 – Влияние выявленных активаторов АМПК на синтез оксида азота и жизнеспособность ЛПС-стимулированных макрофагов мышей C57bl/6j. Данные представлены как среднее \pm SD, $n = 3$.

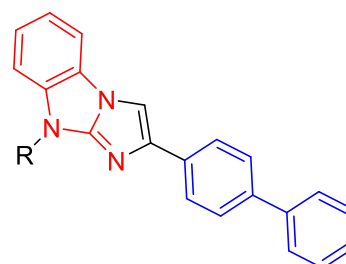
В главе 6 приведены результаты экспериментального скрининга ингибиторов РТР1В и изучения фармакологической активности наиболее перспективных соединений. В результате скрининга фокусированной библиотеки из 51 соединения выявлено 12 активных, подавлявших специфическую активность РТР1В на 50% и более. Из числа последних валидировано 9 ингибиторов, обладающих активностью в микромолярном диапазоне. Наиболее активные соединения являются бифенильными производными 2-иминобензимидазола. Одно из наиболее активных соединений AZH-141a является не только ингибитором РТР1В, но и микромолярным активатором АМПК.



1-(Бифенил-4-илметил)-1H-бензо[d]имидазол-2-амины и -имины
РТР1В pIC_{50} 4,0–4,66



2-(Бифенил-4-ил)имидазо[2,1-a]изохинолины
РТР1В pIC_{50} 4,41



2-(Бифенил-4-ил)-9H-бензо[d]имидазо[1,2-a]имидазол
РТР1В pIC_{50} 4,00

Рисунок 15 – Классы наиболее активных найденных ингибиторов РТР1В.

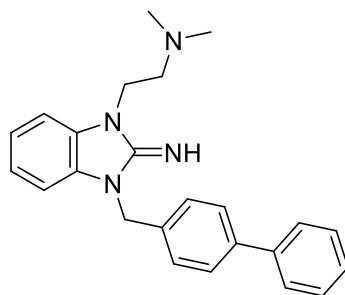
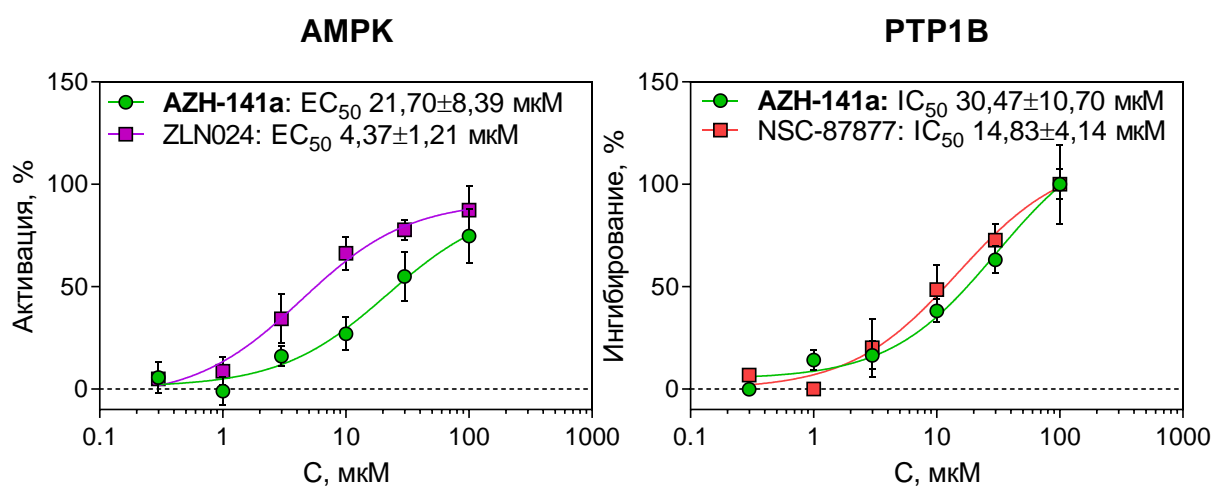
**AZH-141a**PTP1B IC₅₀ 30,47 мкМAMPK EC₅₀ 21,7 мкМ

Рисунок 16 – Наиболее активный найденный ингибитор PTP1B/активатор AMPK.

Рисунок 17 – Кривые титрования для соединения AZH-141a по влиянию на активность рекомбинантной человеческой AMPK $\alpha_1\beta_1\gamma_1$ и рекомбинантной человеческой PTP1B в сравнении с соединениями сравнения. Данные представлены как среднее \pm SD, n = 3.

Для двух соединений-лидеров AZH-141a и VIF-10 выполнен прогноз и показаны благоприятные расчетные характеристики лекарственного подобия, при этом для AZH-141a консенсус оценок фармакокинетических свойств и специфической токсичности более благоприятен. При исследовании антидиабетической активности на животных выявлено, что AZH-141a, но не VIF-10, обладает гипогликемическим эффектом при однократном введении интактным крысам в дозе 300 мг/кг перорально.

При 21-дневном введении крысам с ожирением и экспериментальным СД2 AZH-141a в дозе 30 мг/кг также обладает антигипергликемической активностью и улучшает толерантность к глюкозе. Соединение предотвращало увеличение массы тела животных и оказывало нормализующее влияние на массу висцеральных жировых отложений, хотя и менее выраженное, чем у метформина в дозе 300 мг/кг. При этом положительное влияние на липидный профиль периферической крови (снижение концентраций общего холестерина и липопротеинов низкой плотности при повышении концентрации липопротеинов высокой плотности) было более существенным для AZH-141a. В целом, эти результаты можно рассматривать как доказательство концепции того, что соединение, модулирующее активность двух мишеней терапии СД2 (в данном случае, AMPK и PTP1B) может обладать значимым и

устойчивым антидиабетическим эффектом, несмотря на относительно невысокую аффинность к этим ферментам в условиях *in vitro*.

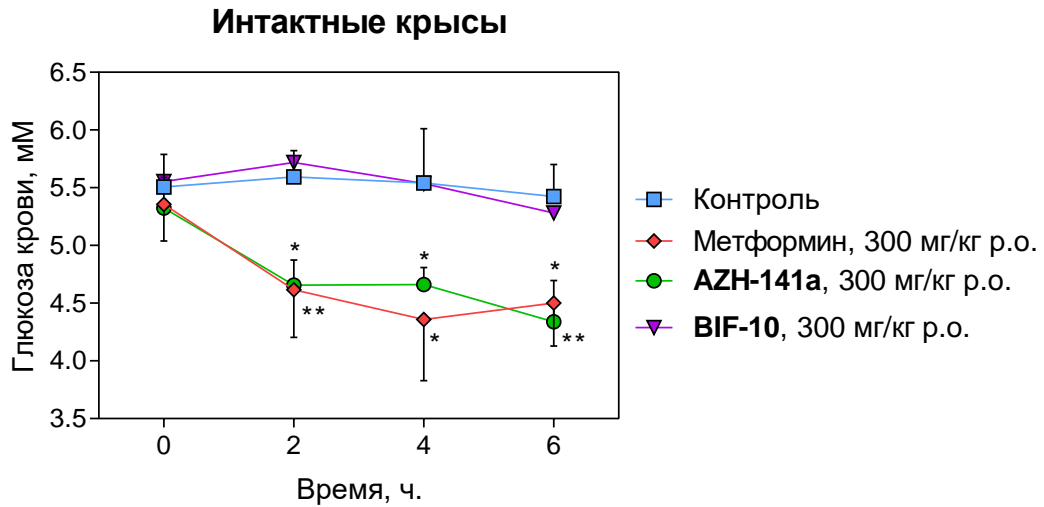


Рисунок 18 – Разовая доза AZH-141a оказывает гипогликемическое действие на интактных самцах крыс-альбиносов, соединение BIF-10 не проявило активности. Данные представлены в виде среднего \pm SD ($n = 5$). Значения p определялись с помощью двустороннего ANOVA с поправкой Гринхауса-Гейссера и множественным сравнением тестом Даннетта, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой в тот же момент времени.

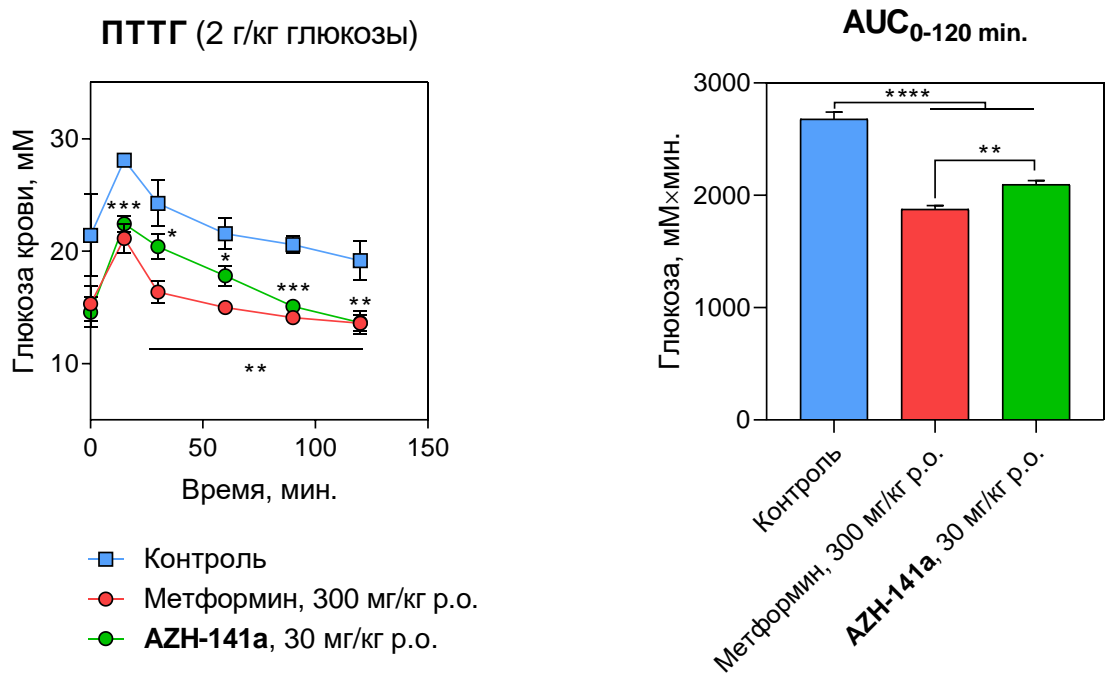


Рисунок 19 – Влияние на толерантность к глюкозе (2 г/кг) в после 21 дня введения соединений. Данные представлены как среднее \pm SD ($n = 6$). Статистическая значимость к группе ВЖД (2-сторонний ANOVA с пост-специальным тестом Туки для графиков глюкоза-время, непарный t -тест для площадей под кривыми): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

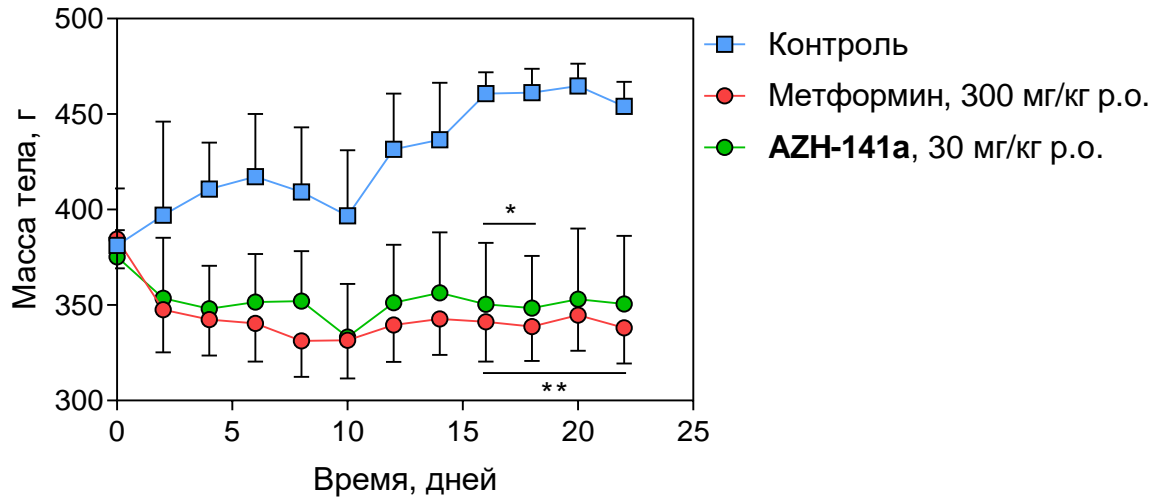


Рисунок 20 – Влияние соединения AZH-141a (30 мг/кг) и метформина (300 мг/кг) на массу тела животных с СД2 во время курсового введения. Данные представлены как среднее \pm SD (n = 6). Статистическая значимость (2-сторонний ANOVA с пост-тестом Туки) к группе контроля: * $p < 0,05$.

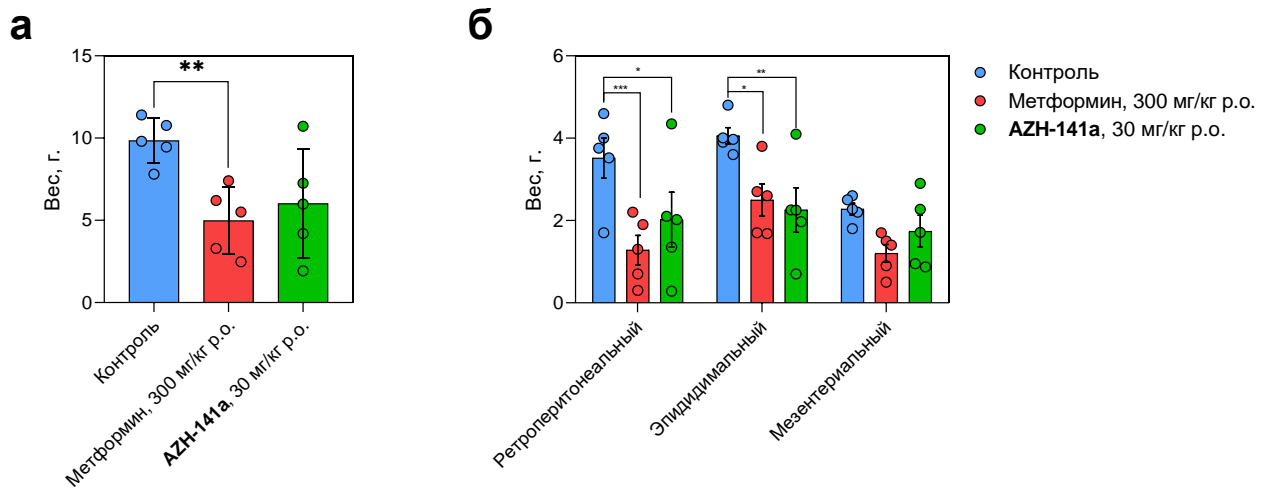


Рисунок 21 – Влияние 21-дневного введения метформина и AZH-141a на липидный обмен крыс HFD+STZ (n = 6). а, Общая масса висцерального жира. б, Вес основных висцеральных жировых депо. Данные представлены как среднее \pm SD, n = 6. Статистическая значимость к группе контроля (1-сторонний ANOVA с пост-тестом Данна): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

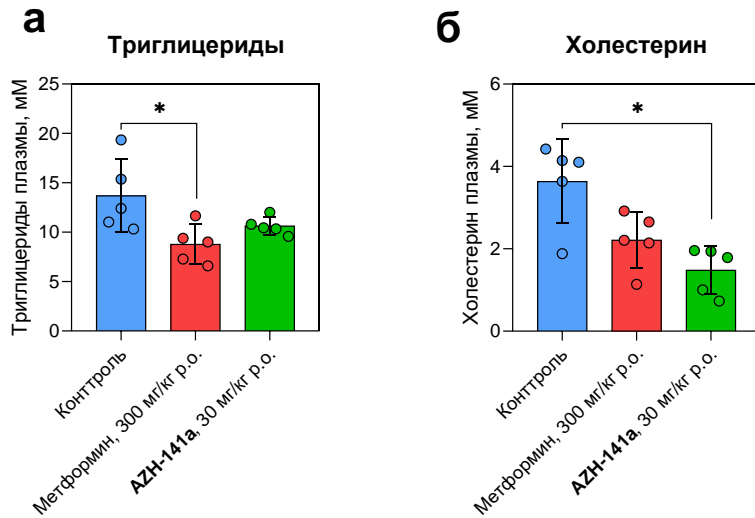


Рисунок 22 – Влияние 21-дневного введения метформина и AZH-141a на липидный обмен крыс HFD+STZ (n = 6). а, Триглицериды периферической крови. б, Общий холестерин периферической крови. Данные представлены как среднее \pm SD, n = 6. Статистическая значимость к группе контроля (1-сторонний ANOVA с пост-тестом Данна): *p < 0,05.

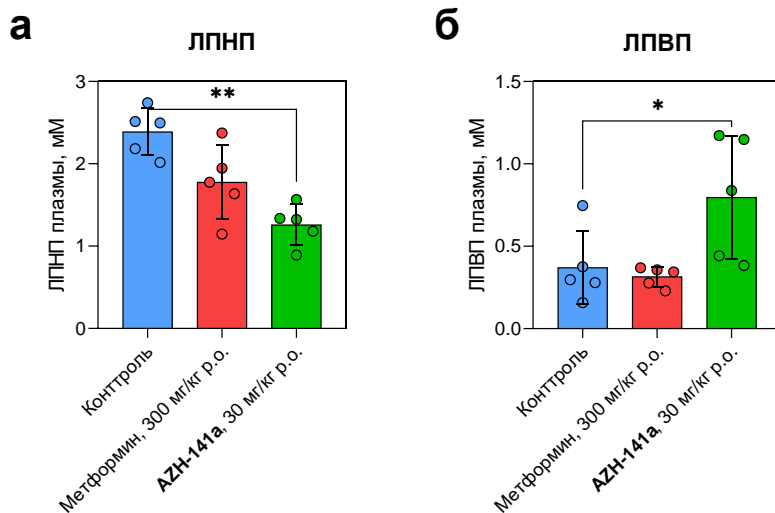


Рисунок 23 – Влияние 21-дневного введения метформина и AZH-141a на липидный обмен крыс HFD+STZ (n = 6). а, Липопротеины низкой плотности периферической крови. б, Липопротеины высокой плотности периферической крови. Данные представлены как среднее \pm SD, n = 6. Статистическая значимость к группе контроля (1-сторонний ANOVA с пост-тестом Данна): *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

В главе 7 изложены результаты экспериментального скрининга активаторов GSK и изучения фармакологической активности наиболее перспективных соединений. В результате скрининга фокусированной библиотеки соединений выявлено 27 соединений, валидированных как активаторы GSK. Таким образом, результативность скрининга составила 21,3%. Величины EC_{50} выявленных соединений лежат в диапазоне 19 мкМ – 82 мМ, однако эффективность наиболее активных соединений (максимальная величина активации GSK) сопоставима с эффективностью соединения сравнения PF-04937319.

Выявлен новый класс активаторов GSK – биспиридоксиновые соединения, аналоги которых неизвестны из открытых источников. Представители ряда, соединения NP-0001, NP-0006, NP-0061, NP-0063, обладали наибольшей активностью среди всех выявленных соединений (EC_{50} 18,56 – 47,71 мкМ).

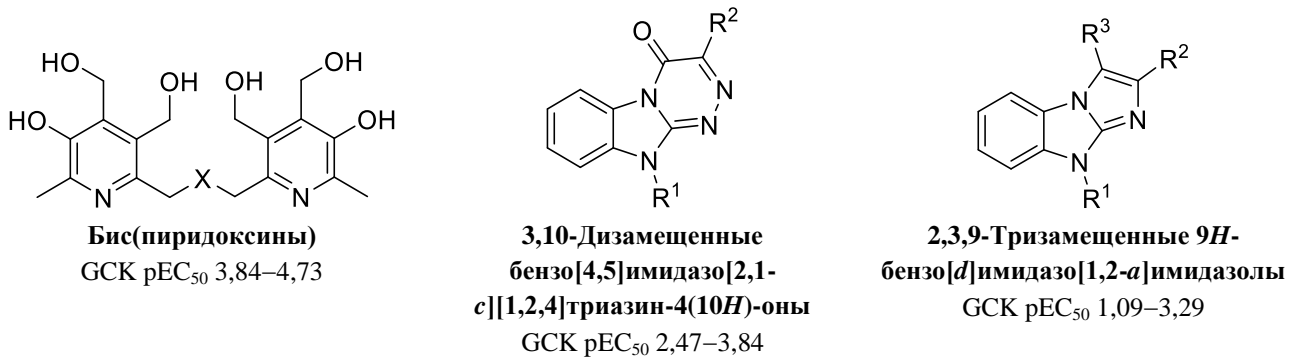


Рисунок 24 – Классы наиболее активных найденных активаторов GCK.

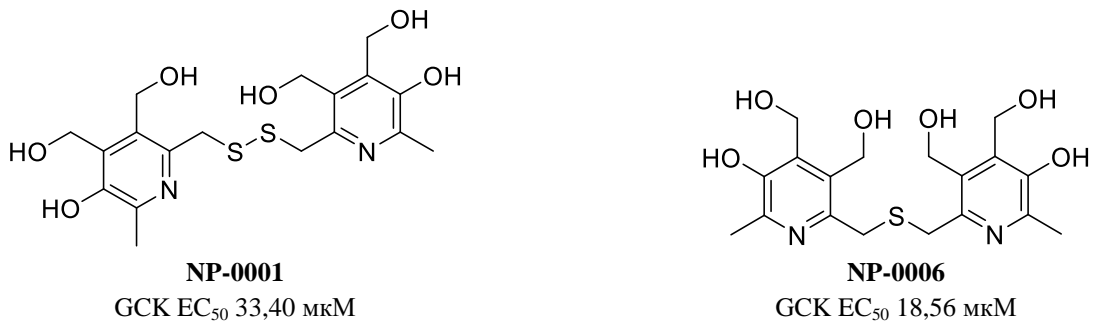


Рисунок 25 – Наиболее активные найденные активаторы GCK.

Прогноз фармакокинетических и токсикологических характеристик наиболее активных соединений NP-0001 и NP-0006 показал высокую степень безопасности и благоприятные физико-химические свойства, включая высокую растворимость в воде. Оценка их влияния на жизнеспособность макрофагов мышей и фибробласты крыс показала отсутствие цитотоксичности вплоть до концентрации 250 мкМ, подтверждая перспективность оценки их фармакологической активности на животных. Согласно консенсусной компьютерной оценке, слабыми сторонами соединений являются невысокая проницаемость клеточных мембран и пероральная биодоступность менее 20%.

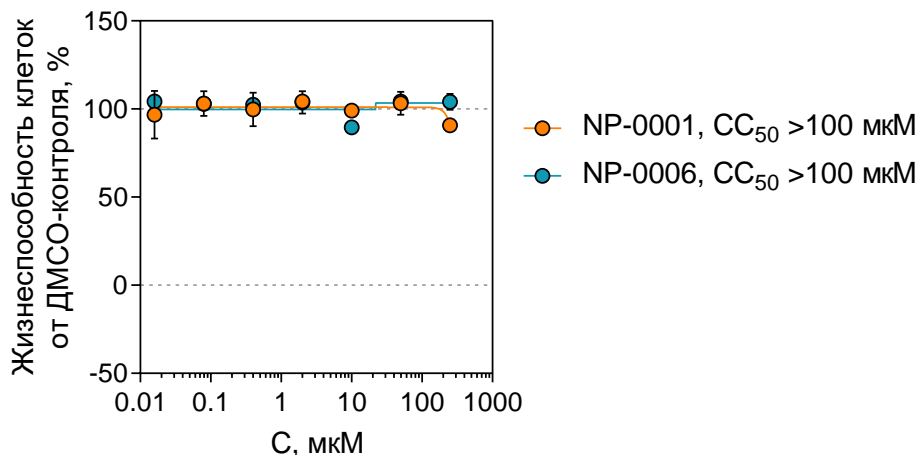


Рисунок 26 – Жизнеспособность перитонеальных макрофагов мышей C57bl/6j выявленных активаторов GCK по данным МТТ-теста. Данные представлены как среднее±SD, n = 4. Статистическая значимость к ДМСО-контролю (1-сторонний ANOVA с пост-тестом Даннетта): * p < 0.05; ** p < 0.005; *** p < 0.0005; **** p < 0.0001.

Последующая оценка антигипергликемической активности соединений-лидеров на интактных крысах показала, что соединение NP-0001 не эффективно при введении перорально или внутривнутрибрюшинно в дозе до 300 мг/кг. Соединение NP-0006 улучшало толерантность к глюкозе без развития гипергликемии в дозах 300 мг/кг и 500 мг/кг внутривнутрибрюшинно. При этом при пероральном введении соединение теряло эффективность, что подтверждает справедливость прогнозных оценок ADMET.

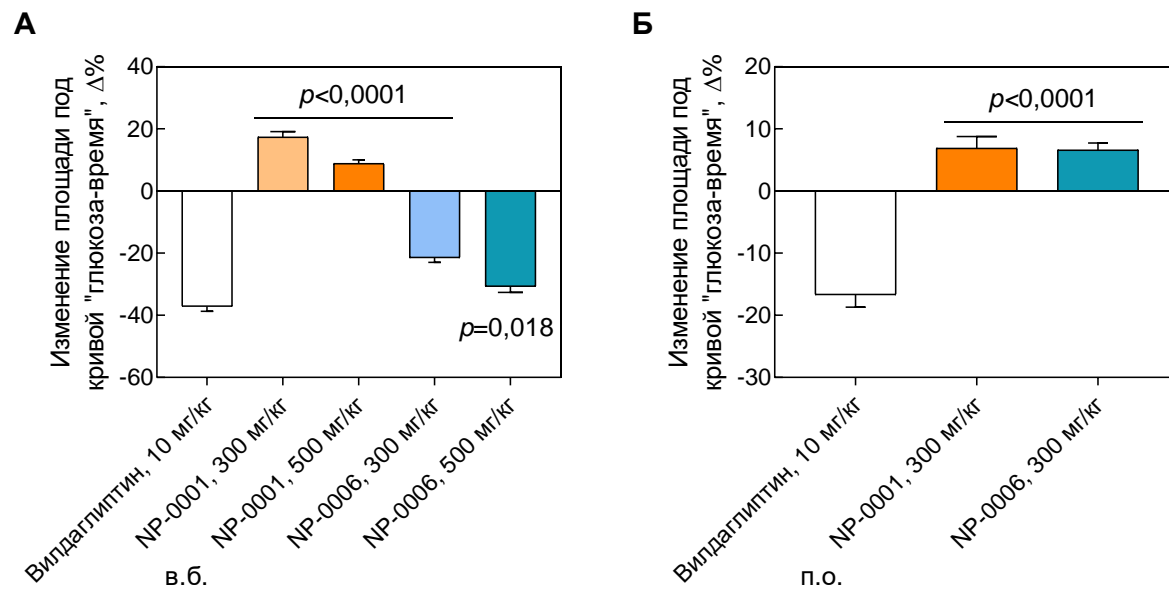


Рисунок 27 – Антигипергликемический эффект вилдаглиптина, соединения NP-0001 и соединения NP-0006 при пероральной нагрузке 2 г/кг глюкозы у интактных крыс. А). Внутривнутрибрюшинное введение соединений (в.б.). Б). Пероральное введение соединений (п.о.). Данные представлены как среднее \pm SD, $n = 3$. Статистическая значимость к группе вилдаглиптина (1-сторонний ANOVA с пост-тестом Даннетта).

Оценка антидиабетической активности соединения NP-0006 была выполнена при 21-дневном введении мышам с ожирением DIO-C57bl/6j в дозе 300 мг/кг внутривнутрибрюшинно в сравнении с метформином. При оценке влияния на углеводный обмен показано, что NP-0006 повышает активность GSK печени на 78,4% и нормализует содержание гликогена печени до уровня интактных животных, что подтверждает вовлечение GSK в реализацию его механизма действия. Отмечена нормализация гликемии натощак начиная с 7-ого дня введения без развития гипогликемии в течение всего эксперимента. На 21-ый день введения в экспериментальных группах, получавших NP-0006 или метформин восстанавливалась нормальная толерантность к глюкозе и индекс чувствительности к инсулину НОМА-IR. Как NP-0006, так и метформин корректировали гиперинсулинемию с равной эффективностью.

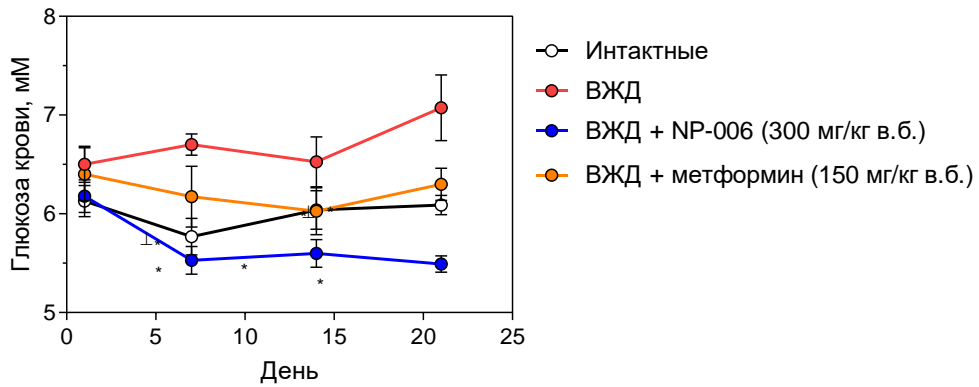


Рисунок 28 – Динамика глюкозы крови мышей DIO-C57bl/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, под влиянием соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) в течение хронического введения. Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к группе СД, критерий 2-way ANOVA с пост-тестом Даннета (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$); группа интактного контроля по отношению к группе СД, критерий 2-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($p < 0,05$).

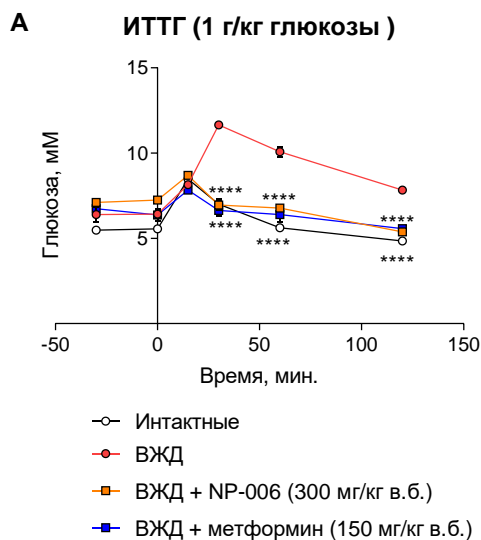
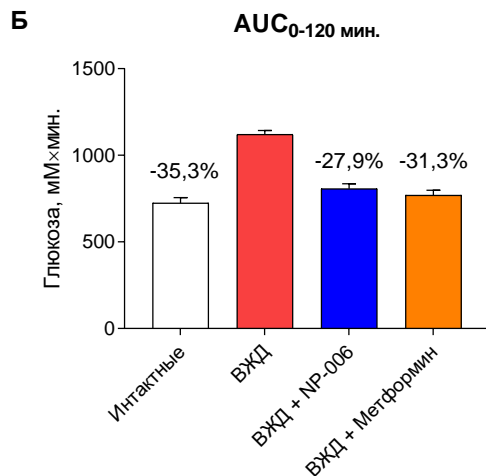


Рисунок 29 – Влияние NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) на глюкозотолерантность мышей DIO-C57bl/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, в интраперитонеальном тесте толерантности к глюкозе (1 г/кг) при длительном введении (А). Площадь под кривой глюкоза-время (Б). Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к группе СД, критерий 2-way ANOVA с пост-тестом Даннета (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).



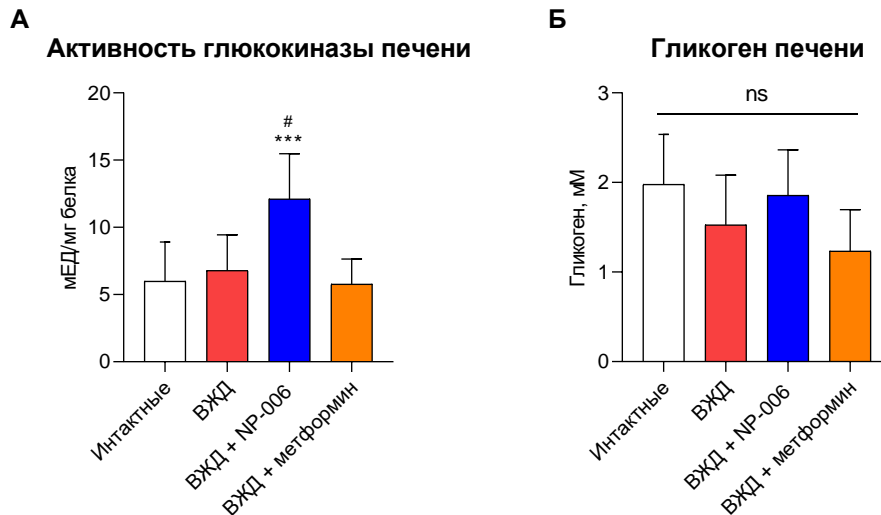


Рисунок 30 – Влияние NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) на активность глюкокиназы и содержание гликогена печени мышей DIO-C57bl/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой при длительном введении. Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к группе СД, критерий 2-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($** p < 0,01$; $*** p < 0,001$; $**** p < 0,0001$).

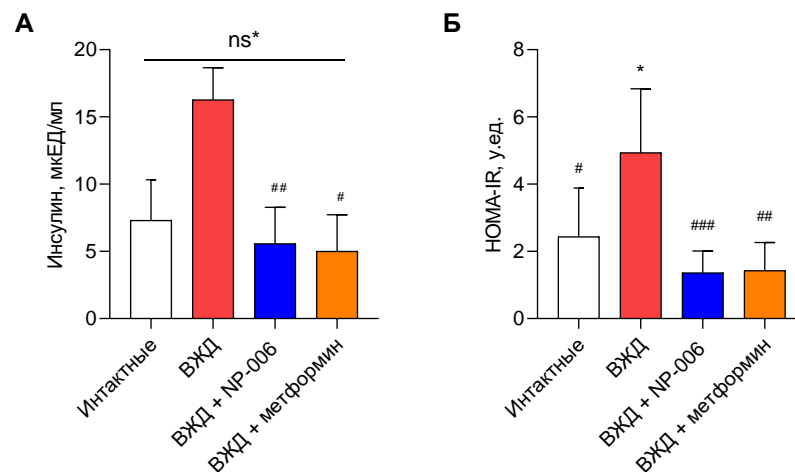


Рисунок 31 – Влияние соединения NP-0006 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на концентрацию глюкозы (а) и инсулина (б) плазмы крови, индекс НОМА-IR (в). Данные представлены как среднее \pm SD ($n = 6$). Статистическая значимость (непарный t-тест): $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ к группе ВЖД; $#p < 0,05$, $##p < 0,01$ к интактной группе.

При оценке влияния на жировой обмен выявлено, что соединение NP-0006, но не метформин, статистически значимо снижало массу тела животных, находящихся на высокожировой диете. При анализе удельных масс печени и основных депо висцеральной жировой ткани выявлено, что снижение массы тела соединением NP-0006 в первую очередь связано с выраженным уменьшением мезентериальных и ретроперитонеальных жировых отложений (34,8% и 36,4% от группы контрольной группы, соответственно). При этом как метформин, так и NP-0006 нормализовали концентрацию триглицеридов в плазме крови, но только введение NP-0006 было ассоциировано с повышением содержания триглицеридов в

печени. Ранее при исследовании биопсий человеческой печени выявлена ассоциация экспрессии глюкокиназы с повышением *de novo* липогенеза [Peter и др., 2011], также высказывались опасения о риске развития стеатоза печени при применении активаторов GSK [Rees, Gloyn, 2013]. С другой стороны, в работе Nakamura и соавт. [Nakamura и др., 2011] даже 20-недельное введение мышам активатора GSK не вело к негативным эффектам на липидный профиль крови и функции печени. Очевидно, что влияние NP-0006 на липиды печени требует особого внимания при дальнейшем изучении.

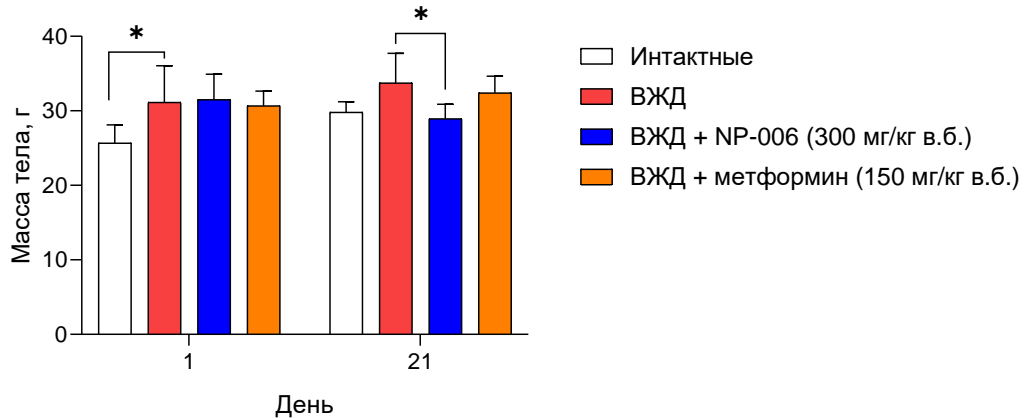


Рисунок 32 – Влияние соединения NP-0006 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на массу тела животных с СД2 во время курсового введения. Данные представлены как среднее±SD (n = 6). Статистическая значимость (2-сторонний ANOVA с пост-тестом Туки) к группе ВЖД.

При оценке иммунного статуса животных показано, что NP-0006, как и метформин, корректировало маркеры хронического подострого воспаления, характерного для метаболического синдрома. Выявлено снижение доли сегментоядерных нейтрофилов и восстановление нормального содержания лимфоцитов при падении уровня циркулирующих иммунных комплексов до нормальных значений.

Отдельно изучено влияние NP-0006 на процессы пролиферации β -клеток поджелудочной железы. При однократном введении мышам со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом в дозе 50 мг/кг внутрибрюшинно NP-0006 достоверно увеличивало удельное количество β -клеток на 86,2% к контрольной группе и снижало удельное количество глюкагон-продуцирующих клеток на 43,8%. Интересно отметить, что введение NP-0006 вело к росту числа внеостровковых β -клеток в ацинарной ткани поджелудочной железы и рядом с панкреатическими протоками в 5,6 раза, тогда как для соединения сравнения PF-04937319 рост составлял 1,8 раза.

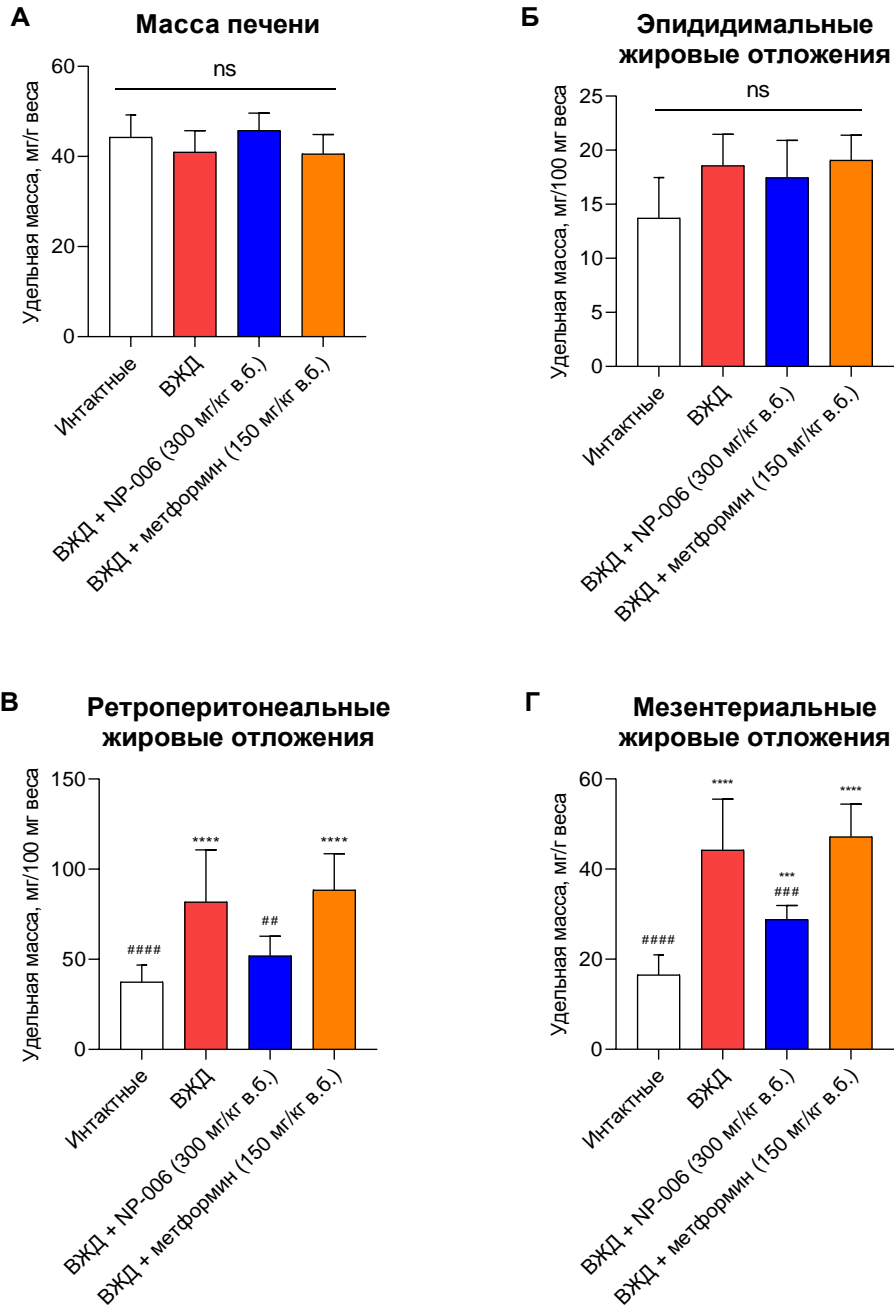


Рисунок 33 – Влияние соединения NP-0006 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на массу мезентериальных (а), эпидидимальных (б) и ретроперитонеальных (в) жировых отложений у животных с СД2 после курсового введения. Данные представлены как среднее±SD (n = 6). Статистическая значимость (непарный t-тест): *p < 0,05, **p < 0,01 к группе ВЖД; #p < 0,05, ##p < 0,01 к интактной группе.

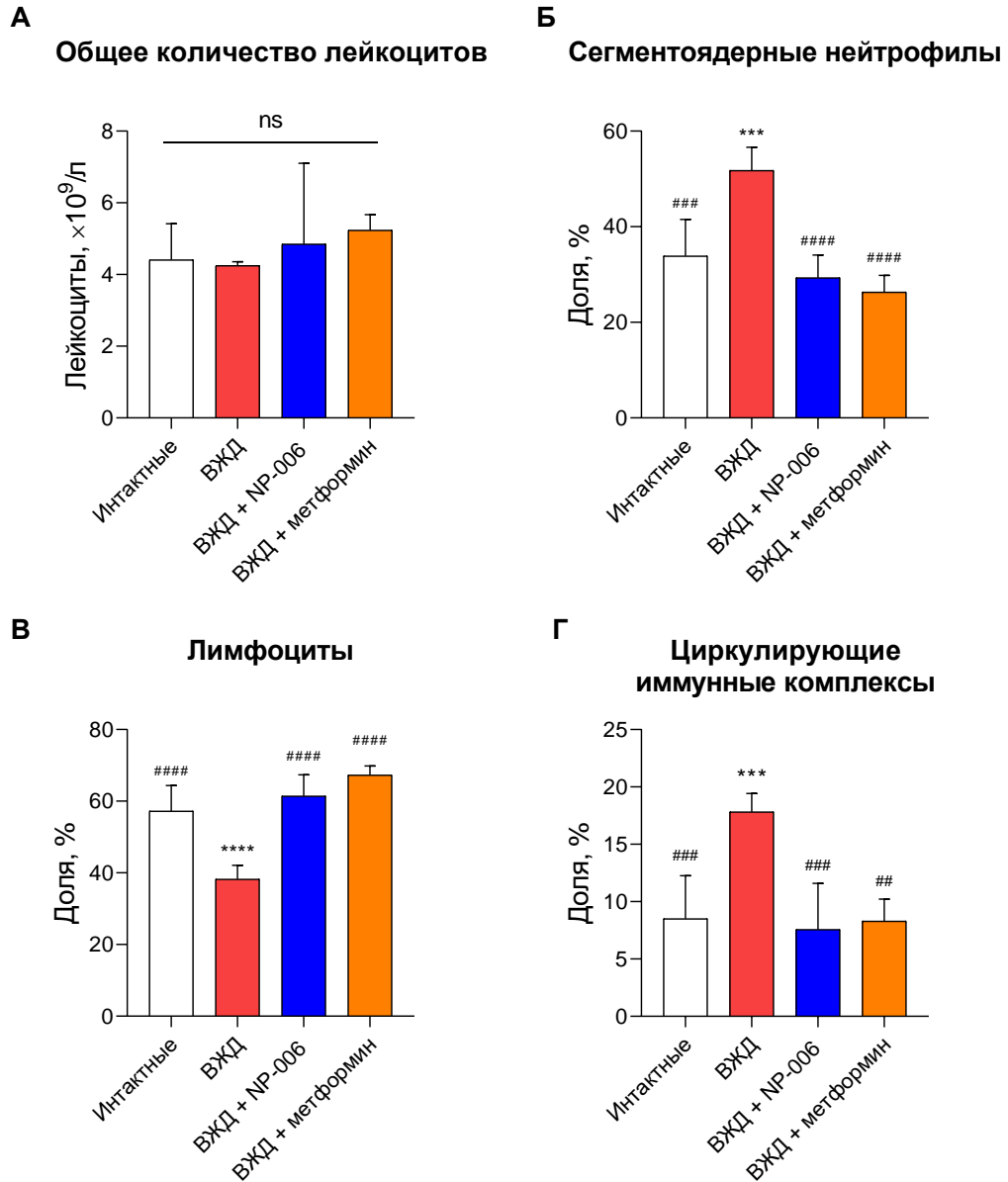


Рисунок 34 – Влияние соединения NP-0006 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на общее количество лейкоцитов (а), уровень сегментоядерных нейтрофилов (б) и лимфоцитов (в) у животных с СД2. Данные представлены как среднее \pm SD (n = 6). Статистическая значимость (непарный t-тест): *p < 0,05, **p < 0,01 к группе ВЖД; #p < 0,05, ###p < 0,01 к интактной группе.

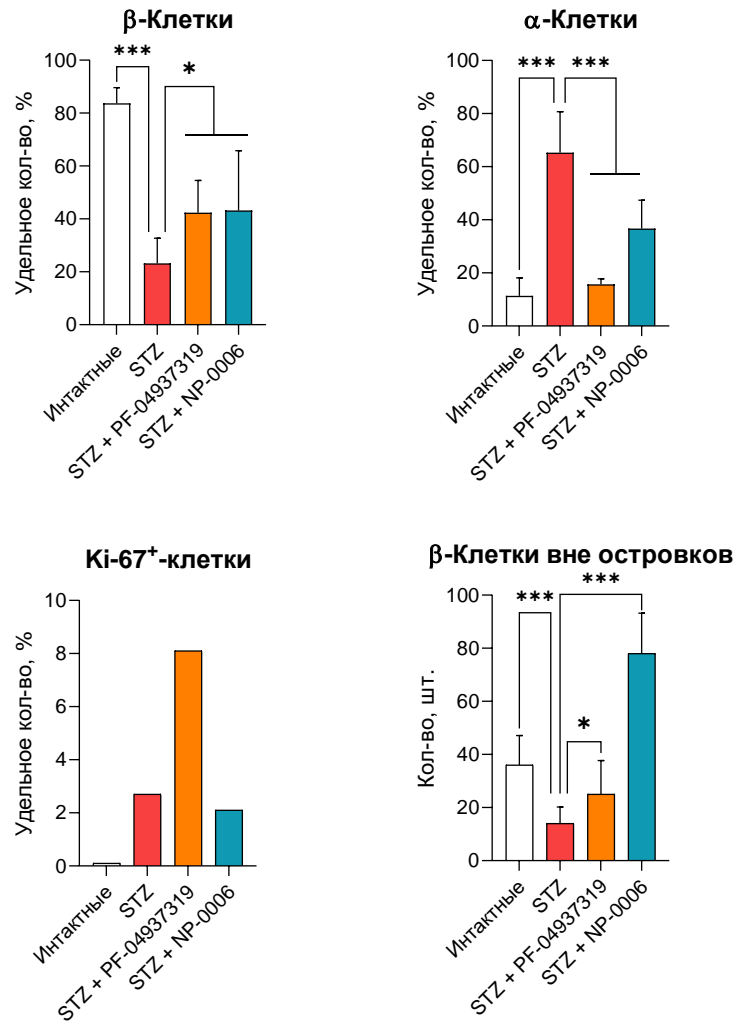


Рисунок 35 – Влияние соединения NP-006 и PF-04937319 на удельное количество инсулин-позитивных и глюкагон-позитивных клеток поджелудочной железы. Данные представлены как среднее \pm SD ($n = 8$). Статистическая значимость (непарный t-тест): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Таким образом, в результате направленного скрининга и валидации выявлен неизвестный ранее класс бис-пиридоксиновых активаторов GSK. Соединение-лидер NP-0006 не только снижает секреторную нагрузку на β -клетки, но и стимулирует их регенерацию, нормализуя периферическую чувствительность к инсулину, гликемию натощак и способствуя снижению висцеральных жировых отложений и массы тела у мышей с экспериментальным СД2. Низкая острая токсичность делает его перспективным кандидатом для дальнейшей оптимизации, которая должна быть направлена на достижение пероральной биодоступности и, возможно, ограничения влияния на липогенез в печени.

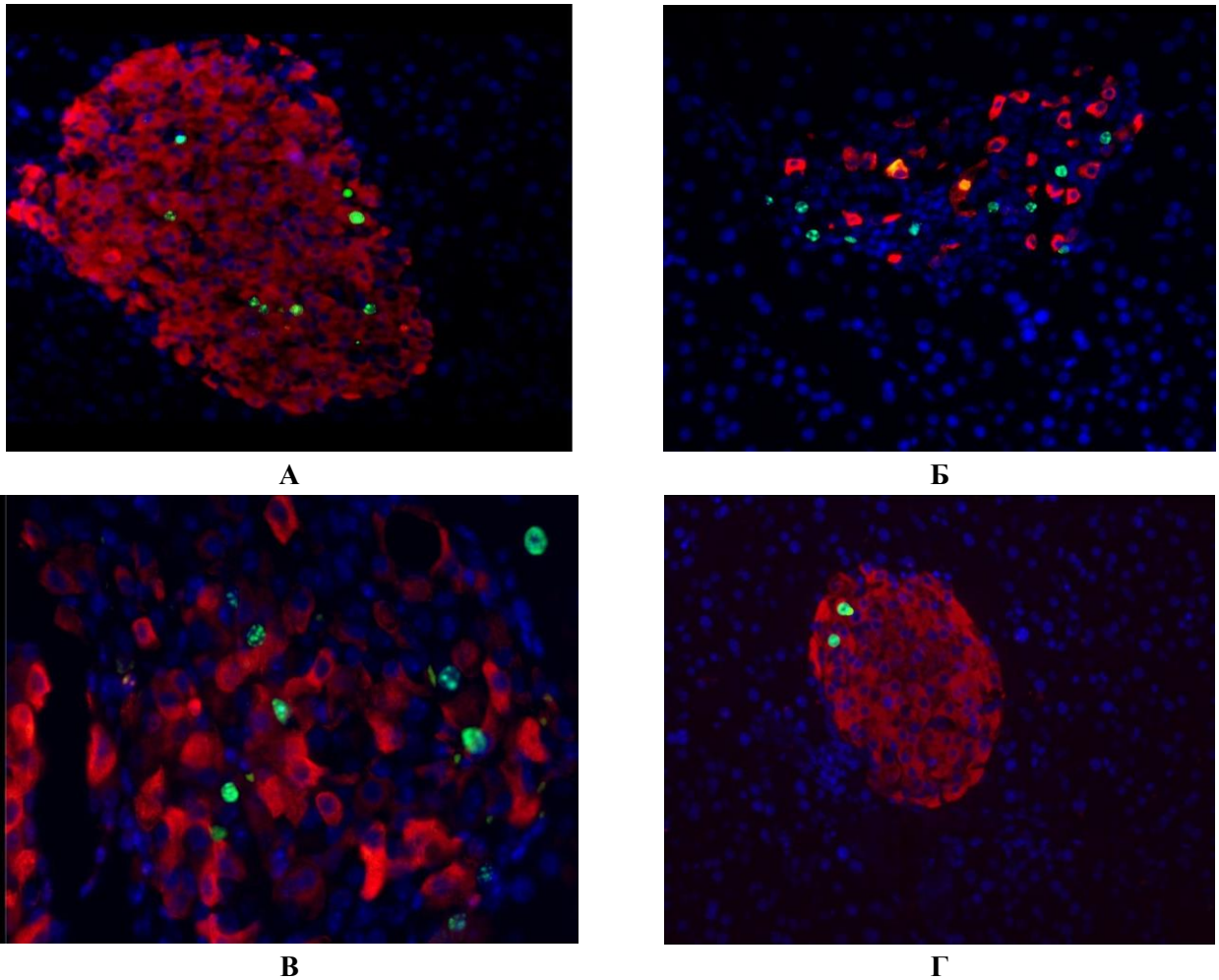


Рисунок 36 – Панкреатические островки, иммунное окрашивание первичными антителами к Ki-67 (зеленый), инсулину (красный), докраска ядер DAPI (синий). Окуляр $\times 10$, объектив $\times 20$. А). Интактный контроль. Выраженная экспрессия протеина Ki-67 в ядрах единичных инсулоцитов. Б). STZ-индуцированный сахарный диабет. Увеличение количества клеток с Ki-67-позитивными ядрами. Г). STZ + NP-0006. Единичные инсулоциты с выраженной экспрессией белка Ki-67.

В **обсуждении** приводится обобщение результатов, полученных в ходе исследования, их интерпретация с учетом литературных данных. Показана важность терапевтических стратегий, направленных на сохранение функций и сохранение массы β -клеток. Обоснована перспективность фармакологического воздействия на киназные каскады для коррекции метаболических нарушений, связанных с инсулинорезистентностью, и противодействия системному воспалению и метавоспалению, а также поддержанию или восстановлению функциональной массы β -клеток, т.е. плеiotропному воздействию на ключевые факторы и звенья патогенеза СД2. Обоснована необходимость рационального выбора мишеней для разработки ЛС, предложенная технология мишень-ориентированного поиска сопоставлена с аналогичными подходами. Обобщены и обсуждены в сравнении с литературными данными результаты изучения антидиабетической активности соединений-лидеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе разработана оригинальная система мишень-ориентированного поиска антидиабетических соединений с использованием информационных технологий и хемоинформатики. В результате валидации по совокупности показателей в качестве перспективных и приоритетных были выбраны четыре мишени: АМФ-активируемая протеинкиназа (АМПК), глюкокиназа GSK, GSK3B, Протеинтирозинфосфатаза типа 1B (PTP1B), отличающиеся наиболее широким влиянием на иммунометаболические нарушения при СД2

Отбор соединений для экспериментального исследования, т.е. скрининга на целевых мишенях, проводился с учетом критериев лекарственного подобия GSK3 и Ro4 и подструктурных маркеров токсичности. Не отвечающие им соединения исключались из исследования как неперспективные. Далее проводили поиск наиболее активных ранее описанных низкомолекулярных ингибиторов или активаторов выбранных мишеней в публичной базе данных ChEMBL и использовали их скаффолды как образец для виртуального скрининга библиотеки исследуемых соединений. В результате формировали фокусированные мишень-специфические библиотеки для экспериментального скрининга. Выявленные активные соединения служили основой для формулирования закономерностей структура-активность и выбора соединений для дальнейшей валидации на клеточных и животных моделях. Одной из наиболее удобных клеточных моделей служили ЛПС-активированные первичные макрофаги мышей C57bl/6j, которые позволяют параллельно оценить цитотоксичность и противовоспалительную активность соединений, важную в контексте способности соединений подавлять системное хроническое метавоспаление и индуцированную M1-макрофагами периферическую инсулинорезистентность. Далее проводилась оценка расчетных параметров фармакокинетики и безопасности соединений-лидеров. Наконец, оценивали их фармакологическую активность на животных моделях СД с определением мишень-специфических аспектов влияния на β -клетки и маркеры углеводного и жирового обмена.

Предложенная оригинальная система выбора мишеней, виртуального и экспериментального скрининга позволила идентифицировать соединения, которые действуют через валидированные мишени и обладают плеiotропной антидиабетической активностью, нормализуя углеводный и жировой обмен, уменьшая системное воспаление и способствуя снижению массы тела животных с экспериментальным СД2 (Таблица 2). Активатор глюкокиназы NP-0006 стимулирует образование новых β -клеток поджелудочной железы у мышей с СД1, эффект защиты β -клеток от апоптоза описан в литературе для ингибиторов GSK3B. В сочетании с низкой острой токсичностью полученные данные позволяют рекомендовать выявленные соединения-лидеры для дальнейшей оптимизации и полного доклинического изучения как инновационных антидиабетических средств.

Прогресс, достигнутый в изучении молекулярных механизмов инсулинорезистентности, глюко- и липотоксичности, дисфункции и регуляции пролиферации β -клеток, роли метаболических и иммунометаболических изменений в макрофагах, адипоцитах и гепатоцитах, создает фундаментальную основу создания новых антидиабетических средств, способных преодолеть ограничения существующих препаратов. Выбранные в работе биологические мишени регулируют активность сигнальных путей инсулина (GSK3B, PTP1B), лептина (PTP1B) и метаболических каскадов глюкозы и липидов (АМПК, GSK). Регуляция их тканеспецифических функций ведет к развитию комплементарных фармакологических эффектов, направленных на нормализацию углеводного, липидного и энергетического

гомеостаза клеток, а также коррекцию системного воспаления. Идентифицированные в настоящей работе ингибиторы и активаторы мультифункциональных киназ корректируют системный гомеостаз глюкозы и липидов, устраняют повреждающие β -клетки факторы и стимулируют их регенерацию, доказывая возможность и перспективность плеiotропного воздействия на метаболические дефекты СД2 через регуляцию активности внутриклеточных сигнальных каскадов, что является принципиально новым подходом к лечению СД2.

Таблица 2 – Сравнение антидиабетической активности соединений-лидеров на животных моделях СД2

Фармакологический показатель	Соединение (мишень)		
	К-167 (GSK3B)	AZH-141a (AMPK/PTP1B)	NP-0006 (GCK)
Гликемия натощак	↓↓↓	↓↓	↓↓↓
Толерантность к глюкозе	↑↑↑	↑	↑↑
Гиперинсулинемия	↓↓↓	н.д.	↓↓
Инсулинорезистентность	↓↓	н.д.	↓↓↓
Липиды крови	–	↓↓↓	↓
Триглицериды печени	↓↓	н.д.	↑
Масса висцерального жира	↓↓	↓↓	↓↓↓
Масса тела	–	↓↓	↓↓
Системное воспаление	↓↓	н.д.	↓
Пролиферация β -клеток	н.д.	н.д.	↑↑

«н.д.» – нет данных;

«–» – нет значимого эффекта.

ВЫВОДЫ

1. Разработана оригинальная система мишень-ориентированного поиска антидиабетических соединений с использованием информационных технологий, включающая выбор валидированных мишеней, представляющих наибольший интерес для разработки новых ЛС, ранний отсев неперспективных соединений по расчетным критериям лекарственного подобию и токсичности, отбор соединений для экспериментального изучения на основании фармакофорной схожести к скаффолдам ранее описанных модуляторов мишени, валидацию активных соединений для выявления ложноположительных результатов, оценку активности и цитотоксичности на клеточных моделях, расчет ADMET-характеристик, последовательное определение эффективности соединений-лидеров при однократном и хроническом введении животным с экспериментальным СД2.

2. Выявлен перспективный скаффолд ингибиторов GSK3B – 3-арилиден-2-оксиндолы, показана важность электронодонорного заместителя в 3-арилиденовом фрагменте и возможность введения ацетамидных и карбаматных заместителей в положении 5 2-оксиндольного ядра для увеличения растворимости. Валидированы 16 активных соединений из 42 (38,1%), отобранных для изучения. Найден новый перспективный скаффолд активаторов АМРК – бифенил-2'-карбонитрил-конъюгированные бензо[*d*]имидазо[1,2-*a*]имидазолы. Валидированы 8 активных соединений из 83 (9,6%), отобранных для изучения. Идентифицирован новый класс ингибиторов РТР1В – бифенил-замещенные 2-аминобензимидазолы и 2-иминобензимидазолы, допускающие разнообразную природу линкерных фрагментов и заместителей в боковых цепях. Эффективность скрининга составила 17,6% (валидированы 9 активных соединений из 51 исследованного). Выявлен ранее неизвестный скаффолд активаторов GSK – бис-пиридоксиновые соединения с линкерным серусодержащим алифатическим фрагментом. При этом их аналоги, имеющие кислородсодержащий или азотсодержащий линкерный фрагмент, проявляют в 2-5 раз меньшую активность. Найдено 27 активных соединений из 127 (21,3%), отобранных для изучения. Общая результативность скрининга после отсева ложноположительных соединений составила 19,8% (60 активных соединений из 303 исследованных).

3. Соединение К-167 (*Z*-3-(пиридин-2-илметил)индолин-2-он) является наномолярным ингибитором GSK3B (IC_{50} 4 нМ) и обладает плеiotропной антидиабетической активностью на животной модели сахарного диабета 2-го типа (мыши C57BL/6J с алиментарным ожирением) при 3-х месячном пероральном введении в дозе 30 мг/кг. Показано значительное снижение уровня инсулина плазмы крови ($770,6 \pm 106$ пкг/мл против $3553 \pm 324,1$ пкг/мл в группе контроля), а также инсулинорезистентности по показателю HOMA-IR ($5,29 \pm 0,67$ усл. ед против $7,47 \pm 0,41$ усл. ед в группе контроля). Соединение улучшает толерантность к глюкозе сопоставимо с препаратом сравнения метформином в дозе 150 мг/кг перорально (площадь под кривой глюкоза-время –15,0% против –12,9%) на 3-й месяц введения. Показано уменьшение массы висцеральных жировых отложений: ретроперитонеальных на 34,9%, мезентериальных на 33,54% и эпидидимальных на 36,9% по сравнению с группой сахарного диабета. Выявлено значимое сокращение содержания триглицеридов печени на 24,3% от группы сахарного диабета. Отмечалось снижение признаков системного воспалительного процесса: достоверное восстановление количества сегментоядерных

нейтрофилов ($18,6 \pm 3\%$ против $30,0 \pm 1,6\%$) и лимфоцитов ($76,6 \pm 3,1\%$ против $63,0 \pm 2,0\%$) по отношению к группе контроля. Соединение К-167 привело к достоверному подавлению секреции ФНО- α ($39,4\%$) и оксида азота ($59,3\%$). На клеточных моделях выявлено отсутствие иммунотоксичности (перитонеальные макрофаги и нейтрофилы), гепатотоксичности (НерG2), а также влияния на быстропролиферирующие линии клеток (неонатальные фибробласты) вплоть до концентрации 100 мкМ. К-167 предотвращает индуцированную бактериальным липополисахаридом провоспалительную активацию макрофагов, при этом не влияя на процесс фагоцитоза. Соединение К-167 в дозе 30 мг/кг оказало более выраженное антитромботическое действие, чем препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в дозе 150 мг/кг (продолгование времени окклюзии сонной артерии, индуцированной аппликацией 50% раствора FeCl_3 $78,51 \pm 19,48\%$ и $68,4 \pm 16,4\%$, соответственно). К-167 относится к 5-му классу токсичности (нетоксичные соединения), $\text{LD}_{50} > 5000$ мг/кг при пероральном введении мышам.

4. Соединения ВIF-68 и ВIF-69 (гидробромид 4'-(3,4-дигидро-пиримидо-[1,2-а]бензимидазол-10(2H)-ил-метил)бифенил-2-карбонитрила и гидробромид 4'-(2,3,4,5-тетрагидро-11H[1,3]дiazеино[1,2-а]-бензимидазол-11-ил-метил)бифенил-2-карбонитрила) являются субмикромольными активаторами АМПК (EC_{50} 0,34 мкМ и 0,44 мкМ, соответственно), а также равноэффективно ингибируют синтез оксида азота ЛПС-стимулированными макрофагами с IC_{50} 5,3 мкМ и 5,0 мкМ, соответственно, проявляя низкую цитотоксичность ($\text{CC}_{50} > 100$ мкМ согласно МТТ-тесту). При этом соединения не проявили гипогликемической активности на животных при внутрибрюшинном введении. Согласно АDМЕТ-прогнозу, это может быть связано с недостаточной клеточной проницаемостью.

5. Соединение АZH-141a (1-(2-диметиламиноэтил)-3-(бифенил-4-ил)метил-2-иминобензамидазолия гидробромид) является микромольным ингибитором РТР1В (IC_{50} 30,5 мкМ) и микромольным активатором АМПК (EC_{50} 21,7 мкМ) и обладает плеiotропной антидиабетической активностью на животной модели сахарного диабета 2-го типа (крысы с алиментарным ожирением и индукцией стрептозотоцином) при 21-дневном пероральном введении в дозе 30 мг/кг. Показано значимое улучшение толерантности к глюкозе, несколько уступающее эффекту препарата сравнения метформина в дозе 300 мг/кг перорально (площадь под кривой глюкоза-время $-19,8\%$ против $-31,0\%$) и нормализация гликемии натощак ($-41,7\%$ против $-22,7\%$) на 21-ый день введения. Соединение АZH-141a вызвало падение массы висцеральных жировых отложений: ретроперитонеальных на 43,1%, мезентериальных на 19,1% и эпидидимальных на 42,9% по сравнению с группой сахарного диабета, и общее снижение массы тела ($-23,9\%$ против $-28,2\%$ в группе метформина). Выявлено значимое уменьшение содержания общего холестерина и липопротеинов низкой плотности на 57,9% и 44,3% от группы сахарного диабета, соответственно, при повышении содержание липопротеинов высокой плотности в 1,9 раза. АZH-141a относится к 3-му классу токсичности (умеренно токсичные соединения), LD_{50} $163,8 \pm 24,5$ мг/кг при пероральном введении мышам.

6. Соединение NP-0006 (бис[3,4-дигдроксиметил-5-гидрокси-6-метилпиридин-2-илметил]сульфан) является микромольным активатором GCK (EC_{50} 18,6 мкМ; E_{max} $150,6 \pm 1,8\%$) и обладает плеiotропной антидиабетической активностью на животной модели сахарного диабета 2-го типа (мышь C57BL/6J с алиментарным ожирением) при 3-х недельном внутрибрюшинном введении. Показано значительное снижение гиперинсулинемии ($5,57 \pm 2,6$ мкЕд/мл против $16,3 \pm 2,38$ мкЕд/мл в группе контроля), а также

инсулинорезистентности по показателю НОМА-IR ($1,36 \pm 0,64$ усл. ед. против $4,93 \pm 1,9$ усл. ед. в группе контроля). Соединение обладает выраженной способностью улучшать толерантность к глюкозе, сопоставимой с таковой у препарата сравнения метформина в дозе 150 мг/кг внутривнутрибрюшинно (площадь под кривой глюкоза-время $-27,9\%$ против $-31,3\%$). Кроме того, выявлено восстановление синтеза гликогена ($1,85 \pm 0,05$ мМ против $1,52 \pm 0,05$ мМ), ингибирование глюконеогенеза и активирование глюкокиназы печени ($12,1 \pm 3,36$ мЕД/мг белка против $6,79 \pm 2,64$ мЕД/мг белка) по отношению к группе контроля. Показано снижение массы тела животных ($28,9 \pm 1,8$ г против $33,4 \pm 4,3$ г у группы контроля, $p < 0,05$), в основном за счет ретроперитонеальных и мезентериальных висцеральных жировых отложений (в 1,6 и 1,5 раз, соответственно, по сравнению с группой сахарного диабета). В то же время, отсутствовало влияния на уровень холестерина и ЛПНП при незначимом сокращении содержания триглицеридов в плазме крови. Отмечалось подавление системного воспалительного процесса: показано достоверное восстановление количества сегментоядерных нейтрофилов ($29,3 \pm 4,7\%$ против $51,8 \pm 5,8\%$) и лимфоцитов ($61,4 \pm 5,8\%$ против $38,25 \pm 3,8\%$) по отношению к группе контроля, статистически незначимое снижение уровня палочкоядерных нейтрофилов ($2,67 \pm 1,3\%$ против $4,25 \pm 1,25\%$ у группы контроля), а также уменьшение содержания циркулирующих иммунных комплексов в 2,4 раза. NP-0006 повышает пролиферативную активность β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы мышей с сахарным диабетом 1-го типа при однократном введении в дозе 50 мг/кг. Отмечалось увеличение удельного количества инсулин-позитивных клеток, сопоставимое с таковым у препарата сравнения – активатора глюкокиназы PF-04937319 ($43,2 \pm 22,6\%$ против $42,4 \pm 12,1\%$). NP-0006 относится к 4-му классу токсичности (малотоксичные соединения), $LD_{50} > 2000$ мг/кг при пероральном введении мышам, $LD_{50} > 1000$ мг/кг при внутривнутрибрюшинном введении.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендуется использовать разработанную систему мишень-ориентированного поиска антидиабетических соединений для эффективного выявления новых валидированных фармакологически активных веществ и сокращения объема экспериментальных исследований.
2. Целесообразно продолжить поиск новых ингибиторов GSK3 β среди производных 3-арилиден-2-оксиндола, замещенных по 5-му положению и/или арильному радикалу. Целесообразен поиск и оптимизация новых активаторов АМПК в ряду бифенил-2'-карбонитрил-конъюгированных бензо[*d*]имидазо[1,2-*a*]имидазолов, при этом важно учитывать фактор клеточной проницаемости. Рекомендуется синтез новых бифенил-замещенных 2-аминобензимидазолов и 2-иминобензимидазолов для поиска ингибиторов РТР1 β , в том числе одновременно являющихся прямыми активаторами АМПК. Целесообразно направить усилия на оптимизацию бис(пиридоксиновых) соединений для разработки новых активаторов GSK с пероральной биодоступностью и/или на разработку соответствующих систем доставки.
3. Целесообразно проведение полных доклинических исследований плеiotропного антидиабетического соединения ингибитора GSK3 β К-167 (Z-3-(пиридин-2-илметил)индолин-2-он), сочетающего инсулин-сенситизирующее действие, способность нормализовать обмен глюкозы и липидов с противовоспалительным и антитромботическим действием.
4. Рекомендуется проведение полных доклинических исследований плеiotропного антидиабетического соединения активатора GSK NP-0006 (бис[3,4-дигидроксиметил-5-гидрокси-6-метилпиридин-2-илметил]сульфан), обладающего выраженной способностью нормализовывать показатели углеводного обмена, чувствительности к инсулину, корректировать системное воспаление и стимулировать образование новых β -клеток в условиях сахарного диабета.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. **Babkov D. A.**, Zhukovskaya O. N., Borisov A. V., Babkova V. A., Sokolova E. V., Brigadirova A. A., Litvinov R. A., Kolodina A. A., Morkovnik A. S., Sochnev V. S., Borodkin G. S., Spasov A. A. Towards multi-target antidiabetic agents: Discovery of biphenyl-benzimidazole conjugates as AMPK activators // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2019. № 17 (29). С. 2443–2447.
2. Dzyurkevich M. S., **Babkov D. A.**, Shtyrlin N. V., Mayka O. Y., Iksanova A. G., Vassiliev P. M., Balakin K. V., Spasov A. A., Tarasov V. V., Barreto G., Shtyrlin Y. G., Aliev G. Pyridoxine dipharmacophore derivatives as potent glucokinase activators for the treatment of type 2 diabetes mellitus // *Scientific Reports*. 2017. № 1 (7).
3. Klochkov V. G., Bezsonova E. N., Dubar M., Melekhina D. D., Temnov V. V., Zaryanova E. V., Lozinskaya N. A., **Babkov D. A.**, Spasov A. A. Towards multi-target antidiabetic agents: In vitro and in vivo evaluation of 3,5-disubstituted indolin-2-one derivatives as novel α -glucosidase inhibitors // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2022. (55).
4. Lozinskaya N. A., **Babkov D. A.**, Zaryanova E. V., Bezsonova E. N., Efremov A. M., Tsymlyakov M. D., Anikina L. V., Zakharyasheva O. Y., Borisov A. V., Perfilova V. N., Tyurenkov I. N., Proskurnina M. V., Spasov A. A. Synthesis and biological evaluation of 3-substituted 2-oxindole derivatives as new glycogen synthase kinase 3β inhibitors // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2019. № 9 (27). С. 1804–1817.
5. Spasov A. A., Geisman A. N., Kosolapov V. A., **Babkov D. A.**, Rashchenko A. I., Babkova V. A., Zakhar'yashcheva O. Y., Ozerov A. A. Synthesis and Antiglycation Activity of Novel S-Carboxyalkyl Derivatives of 2-Thiouracil // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019. № 7 (53). С. 610–615.
6. Spasov A. A., Khaliullin F. A., **Babkov D. A.**, Timirkhanova G. A., Kuznetsova V. A., Naumenko L. V., Muleeva D. R., Maika O. Y., Prokhorova T. Y., Sturova E. A. Synthesis and Antidiabetic Activity of Thiazolo[2,3-f]Purine Derivatives and Their Analogs // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2017. № 7 (51). С. 533–539.
7. Spasov A. A., Kosolapov V. A., **Babkov D. A.**, Maika O. Y. Effect of GRP119 Receptor Agonist, Compound MBX-2982, on Activity of Human Glucokinase // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2017. № 5 (163). С. 695–698.
8. Spasov A. A., Kosolapov V. A., **Babkov D. A.**, Maika O. Yu. Glucokinase activators - A promising class of antidiabetic drugs // *Problemy Endokrinologii*. 2018. № 3 (64). С. 180–187.
9. Spasov A. A., Lobasenko V. S., Kosolapov V. A., **Babkov D. A.**, Kuznetsova V. A., Maika O. Y., Popov Y. V., Korchagina T. K. Synthesis and Pharmacological Activity of 3-Phenoxybenzoic Acid Derivatives // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020. № 3 (54). С. 229–235.
10. Spasov A. A., Popov Y. V., Lobasenko V. S., Korchagina T. K., Vassiliev P. M., Kuznetsova V. A., Brigadirova A. A., Rashchenko A. I., **Babkov D. A.**, Kochetkov A. N., Kovaleva A. I., Efremova O. S. Synthesis and pharmacological activity of 3-phenoxybenzoic acid derivatives // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2017. № 2 (43). С. 163–169.
11. Spasov A. A., Zhukovskaya O. N., **Babkov D. A.**, Brigadirova A. A., Babkova V. A., Morkovnik A. S., Litvinov R. A., Sokolova E. V. 2-Amino- and 2-hydroxymethylbenzimidazolium bromides as protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors and other targets associated with diabetes mellitus // *Russian Chemical Bulletin*. 2020. № 4 (69). С. 774–780.

12. Spasov A. A., Zhukovskaya O. N., Brigadirova A. A., Abbas H. S. A., Anisimova V. A., Sysoeva V. A., Rashchenko A. I., Litvinov R. A., Mayka O. Y., **Babkov D. A.**, Morkovnik A. S. Synthesis and pharmacological activity of 2-(biphenyl-4-yl)imidazo[1,2-a]benzimidazoles // Russian Chemical Bulletin. 2017. № 10 (66). С. 1905–1912.
13. Spasov A. A., Zhukovskaya O. N., Gurova N. A., Naumenko L. V., Eliseeva N. V., Kucheryavenko A. F., Kosolapov V. A., Yakovlev D. S., Muravyeva V. Y., Babkova V. A., **Babkov D. A.**, Lifanova J. V., Morkovnik A. S. Pharmacological Properties of 2-Aminobenzimidazole Halides and Imidazo[1,2-a]Benzimidazole Derivatives // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2022. № 2 (48). С. 281–291.
14. Vasilyev P. M., Luzina O. A., **Babkov D. A.**, Appazova D. T., Salakhutdinov N. F., Spasov A. A. Studying Dependences Between the Chemotype Structure of Some Natural Compounds and the Spectrum of Their Targeted Activities Correlated with the Hypoglycemic Effect // Journal of Structural Chemistry. 2019. № 11 (60). С. 1827–1832.
15. Zhukovskaya N., Spasov A. A., Gurova N. A., Kosolapov V. A., Kucheryavenko A. F., Yakovlev D. S., Babkova V. A., **Babkov D. A.**, Salaznikova O. A., Murav'eva V. Yu., Brigadirova A. A., Agatsarskaya I. V., Vishnevskaya V. V., Morkovnik A. S. Pharmacological activity of 1,3-dihydro-2h- benzimidazole-2-thione derivatives // Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya. 2019. № 7 (82). С. 3–9.
16. Zhukovskaya O. N., Spasov A. A., Kuz'menko T. A., Morkovnik A. S., Kucheryavenko A. F., Anisimova V. A., Salaznikova O. A., Gaidukova K. A., Kuznetsova V. A., **Babkov D. A.**, Grechko O. Y., Eliseeva N. V., Rashchenko A. I. Synthesis and Pharmacological Activity of Trifluoromethyl-Containing Imidazo[1,2-A]Benzimidazoles // Pharmaceutical Chemistry Journal. 2018. № 5 (52). С. 385–391.

Патенты

1. Способ лечения сахарного диабета. Лозинская Н. А., Зарянова Е. В., **Бабков Д. А.**, Клочков В. Г., Спасов А. А., Ефремов А. М., Безсонова Е. Н., Цымляков М. Д. Патент на изобретение RU 2734495 С1, 19.10.2020.
2. Бромиды производных бензимидазолия в качестве ингибиторов протеин-тирозинфосфатазы типа 1В (РТР1В). Жуковская О. Н., Спасов А. А., **Бабков Д. А.**, Морковник А. С., Бригадирова А. А. Патент на изобретение RU 2652112 С1, 25.04.2018.
3. Антидиабетическое средство. Кузьменко Т. А., Жуковская О. Н., Морковник А. С., Спасов А. А., **Бабков Д. А.**, Бригадирова А. А. Патент на изобретение RU 2657832 С1, 15.06.2018.
4. Гидробромид 4'-(2,3-дигидро-9н-имидазо[1,2-а]бензимидазол-9-ил-метил)бифенил-2-карбонитрил, проявляющий свойства активатора амф-активируемой протеинкиназы (АМПК). Жуковская О. Н., Спасов А. А., **Бабков Д. А.**, Морковник А. С. Патент на изобретение RU 2650877 С1, 18.04.2018.
5. 7-(4-Метоксифенил)-5-фенил-4,5-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидин как активатор глюкокиназы и ингибитор дипептидилпептидазы типа 4 и способ его получения. Распутин Н. А., Демина Н. С., Иргашев Р. А., Русинов Г. Л., Русинов В. Л., Спасов А. А., **Бабков Д. А.**, Майка О. Ю. Патент на изобретение RU 2642432 С1, 25.01.2018.
6. Соединения на основе пиридоксина, обладающие способностью активировать фермент глюкокиназу. Спасов А. А., Штырлин Ю. Г., **Бабков Д. А.**, Балакин К. В., Дзюркевич М. С., Иксанова А. Г., Майка О. Ю., Павельев Р. С., Петров В. И., Штырлин Н. В. Патент на изобретение RU 2644355 С1, 09.02.2018.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ADMET	– англ. Absorbtion, distribution, metabolism, excretion, toxicity – «абсорбция, распределение, метаболизм, выведение, токсичность»
АКТ	– протеинкиназа В типа α
АМРК	– АМФ-активируемая протеинкиназа
AUC	– англ. Area under curve – «площадь, ограниченная кривой и осью абсцисс»
DMEM	– англ. Dulbecco's modified Eagles medium
DPP-4	– дипептидилпептидаза-4
GCK	– глюкокиназа
GLP-1	– глюкагоноподобный пептид-1
GSK3B	– Киназа-3 бета гликогенсинтазы
GWAS	– англ. Genome-wide association studies – «исследования полногеномной ассоциации»
НОМА-IR	– англ. Homeostasis model assessment of insulin resistance – «гомеостатическая модель оценки резистентности к инсулину»
IKK β	– ингибитор β -субъединицы киназы NF- κ B
IRS1/2	– субстрат рецептора инсулина 1 и 2
JNK	– N-концевая киназа c-Jun
NEMO	– регуляторная субъединица γ протеинкиназы IKK
NF- κ B	– ядерный фактор κ B
PDX1	– фактор транскрипции 1 промотора инсулина
PPAR α	– рецептор типа α , активируемый пероксисомным пролифератором
PTP1B	– протеинтирозинфосфатаза 1B
TLR4	– толл-подобный рецептор 4
БСА	– бычий сывороточный альбумин
ДМСО	– диметилсульфоксид
ДТТ	– дитиотреитол
ЛПВП	– липопротеины высокой плотности
ЛПНП	– липопротеины низкой плотности
ЛС	– лекарственное средство
СД2	– сахарный диабет 2-ого типа

Бабков Денис Александрович

**МИШЕНЬ-ОРИЕНТИРОВАННЫЙ ПОИСК АНТИДИАБЕТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ
И ИХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА**

3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора фармацевтических наук