

**АЛЕКСЕЕВ АЛЕКСЕЙ АНАТОЛЬЕВИЧ**

**РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО  
ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ НОВЫХ ПЕПТИДНЫХ ИНГИБИТОРОВ  
АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ**

14.04.01 – технология получения лекарств,  
14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научные руководители:**

**Павлова Людмила Анатольевна** – кандидат фармацевтических наук, доцент

**Королев Вячеслав Леонидович** – доктор химических наук

**Официальные оппоненты:**

**Ланцова Анна Владимировна** – кандидат фармацевтических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (– далее ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России), НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, лаборатория разработки лекарственных форм, старший научный сотрудник

**Пятин Борис Михайлович** – доктор фармацевтических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», руководитель опытно-технологического отдела

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г. в \_\_\_\_-\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.040.09 при ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 119019, г. Москва, Никитский бульвар, д. 13.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 119034, г. Москва, Zubovskiy бульвар, д. 37/1 и на сайте: [www.mma.ru](http://www.mma.ru).

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 208.040.09  
доктор фармацевтических наук,  
профессор

**Демина Наталья Борисовна**

## **ВВЕДЕНИЕ**

**Актуальность темы.** Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смертности населения в России [Ощепкова, 2013; Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. Geneva: World Health Organization. – 2011. – P. 164]. Доказано, что в основе сердечно-сосудистых заболеваний лежит атеротромбоз – процесс патологического тромбообразования, ведущий к инфаркту миокарда и инсульту [Badimon et al, 2008]. Существуют различные методы профилактики и лечения процессов тромбообразования, включая создание новых эффективных антиагрегационных лекарственных средств, основанных, в том числе, на ингибировании процесса тромбоза. В образовании тромба значимую роль играют гликопротеиновые рецепторы тромбоцитов. Ингибиторы GP IIb/IIIa-рецепторов тромбоцитов являются мощными антитромбоцитарными препаратами [Bussel et al., 2000]. С другой стороны, известно также, что ингибирование процессов тромбообразования происходит под воздействием оксида азота [Radomski et al, 1987]. Один из классов химических соединений, производные которых являются донорами оксида азота – фуроксаны [Feelisch et al, 1992].

Одним из современных направлений создания инновационных лекарственных средств является разработка «гибридных» молекул, в которых в одну молекулярную систему включено несколько фармакофорных фрагментов. Например, в случае лекарственных средств с антиагрегационной активностью это могут быть такие фармакофоры, как антагонисты GP IIb/IIIa рецепторов тромбоцитов пептидной природы и экзогенные доноры оксида азота на основе соединений фуроксанового ряда.

В настоящий момент на фармацевтическом рынке антиагрегационные препараты на основе пептидов представлены, как правило, в виде раствора для в/в введения. Однако, лекарственные препараты других фармакологических групп могут применяться как в виде лиофилизата, так и в виде суспензии наночастиц для пролонгирования действия лекарственного вещества (например «Бусерелин», «Бусерелин-депо»). Таким образом, разработка и исследование новых лекарственных препаратов на основе пептидов с антиагрегационной активностью как для экстренного воздействия (лиофилизат для приготовления раствора для инъекции), так и с пролонгированным действием на основе наночастиц является актуальной.

**Степень разработанности темы исследования.** Ингибиторы GP IIb/IIIa рецепторов тромбоцитов представлены в клинической практике такими препаратами, как абциксимаб (РеоПро), барбурин, эптифибатид (интегрелин), тирофибан (аггратат), выпускаемыми различными фармацевтическими фирмами [Литвинов, 2004]. Однако, для обеспечения антиагрегационного действия требуются постоянное инфузионное введение указанных препаратов. К настоящему времени доказана генерация азота тринитроглицерином и другими производными нитратов в результате энзиматической биотрансформации [Advald et al., 2002]. Однако их существенным недостатком является возникновение толерантности при длительном применении препаратов этой группы [Thatcher et al., 2004]. Поэтому разработка новых ингибиторов агрегации тромбоцитов обуславливает актуальность диссертационного исследования.

**Цели и задачи исследования.** Целью работы является получение и исследование новых антиагрегационных соединений на основе пептидных антагонистов GP IIb/IIIa рецепторов тромбоцитов и имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана, выявление *in vitro* наиболее активного соединения, а также разработка технологии лиофилизирования этого соединения и создания наночастиц на его основе. Для достижения цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести компьютерное моделирование пептидных антагонистов интегрин-рецепторов тромбоцитов и оценить возможность использования в качестве ингибиторов агрегации тромбоцитов производных имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана;
2. Выполнить синтез пептидных и гетеромерных пептидных ингибиторов агрегации тромбоцитов на основе имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана;
3. Установить строение синтезированных соединений с помощью физико-химических методов (спектроскопия ЯМР  $^1\text{H}$ , масс-спектрометрия и элементный анализ);
4. Исследовать антиагрегационную активность *in vitro* синтезированных соединений и выбрать для дальнейшего изучения наиболее активное;
5. Разработать технологию получения наночастиц гетеромерного пептида с целью создания его пролонгированной формы;
6. Разработать технологию получения лиофилизата для инъекционного введения и лиофилизата наночастиц гетеромерного пептида;

7. Оценить качество полученного лиофилизата для инъекционного введения и лиофилизата наночастиц гетеромерного пептида и их стабильность.

**Научная новизна результатов работы.** Научно обоснован спектр соединений для прогнозирования антиагрегационных свойств с помощью математического моделирования. Компьютерное моделирование выполнено для 20 000 пептидов, 24 производных фуросана и 48 000 гетеромерных пептидов, состоящих из двух фармакофорных групп: пептидной и фуросановой. Синтезировано 40 наиболее активных (согласно прогнозу) пептидов и гетеромерных пептидов, подтверждена их антиагрегационная активность. Разработаны стабильные лиофилизированные формы наиболее активного *in vitro* гетеромерного пептида: лиофилизат гетеромерного пептида для приготовления раствора для инъекции и лиофилизат гетеромерного пептида в наночастицах для приготовления суспензии для инъекции. Определены показатели качества для их стандартизации. Экспериментально подтверждена стабильность лиофилизатов в течение 2 лет. Приоритет проведенных исследований подчеркивается полученными патентами: РФ №2550223 «Гетеромерные пептиды на основе имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуросана, ингибирующие агрегацию тромбоцитов», РФ №2549355 «N-карб(аргинил)оксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуросан, ингибирующий агрегацию тромбоцитов», РФ №2544547 «N-карбоксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуросан», РФ №2502739 «N-карб(глутаминил)оксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуросан, ингибирующий агрегацию тромбоцитов».

**Теоретическое значение результатов работы.** Представленный в работе экспериментальный материал может служить теоретической базой для создания и исследования новых антиагрегационных лекарственных средств.

**Практическая значимость работы.** Получено 40 пептидных и гетеромерных пептидных антиагрегационных соединений. В эксперименте *in vitro* выявлено наиболее активное соединение, получены стабильные лиофилизаты данного соединения, в том числе в виде наночастиц. В работу лаборатории биологически активных соединений НИИ фармации ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России внедрены материалы исследования диссертационной работы (акт внедрения) и лабораторный регламент на «Гетеромерный пептид, лиофилизат для приготовления раствора для инъекции 8 мг».

**Методология и методы исследования.** При выполнении работы были использованы методы органического синтеза, хроматографии, комплекс физико-химических, биологических методов, методы компьютерного моделирования степени связывания антагонистов интегрин-рецепторов тромбоцитов, прогноза биологической активности фуроксанов, технологических испытаний, математические методы анализа и обработки результатов.

**Публикации.** По тематике диссертации опубликовано 15 печатных работ, из них 6 статей в рекомендованных ВАК изданиях, получено 4 патента РФ.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность полученных в ходе работы результатов обеспечивали определенным набором физико-химических, биологических и технологических методов исследования. Расчетный поиск потенциальных антагонистов интегрин-рецепторов тромбоцитов проводили с использованием современных методов компьютерного моделирования с помощью программы «Алгокомб». Прогноз биологической активности производных фуроксана выполняли с помощью программы PASS Professional 2010.1. Агрегацию тромбоцитов изучали с использованием турбидиметрического метода Борна. Строение синтезированных соединений подтверждали методами спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  (с привлечением методик  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -спектров COSY), масс-спектрометрии и элементным анализом. Для исследования влияния различных технологических факторов на качество лиофилизатов гетеромерного пептида использовали сертифицированное оборудование. Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием параметрического t-критерия Стьюдента. Обработка данных производилась с помощью программы Microsoft Excel XP. Статистически значимыми расценивались эффекты при  $p < 0,05$ .

**Апробация работы.** Основные положения диссертации представлены на конференции «Новые химико-фармацевтические технологии» (Москва, 2012, 2014); Конкурсе научных инновационных работ Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (диплом III степени) (Москва, 2012); Всероссийской медико-биологической научной конференции молодых ученых «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (XVI и XVII Всероссийская конференция «Человек и его здоровье») (Санкт-Петербург, 2013, 2014); III Всероссийской научной конференции с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2013); II Научно-практической

конференции: «Актуальные проблемы фармацевтической технологии и фармации» (Москва, 2013), а также на межкафедральных и лабораторных конференциях на базе НИИ фармации ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России.

**Личный вклад автора.** Данные, представленные в автореферате и диссертации, получены при непосредственном участии автора как на этапах постановки задач и разработки подходов к их выполнению, так и при получении результатов при проведении экспериментальных исследований, статистической обработке и анализе полученных результатов, написании публикаций. Диссертация и автореферат написаны лично автором.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Научные положения диссертации соответствуют формулам специальностей 14.04.01 – технология получения лекарств и 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, результаты проведенного исследования соответствуют областям исследования специальностей, конкретно пунктам 3, 4 паспорта «технологии получения лекарств» и 1, 4 паспорта «фармацевтическая химия, фармакогнозия».

**Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук.** Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематикой и планом ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова МЗ РФ «Развитие научных и научно-методических основ, базовых и инновационных подходов при разработке, внедрении и применении лекарственных средств» (№ государственной регистрации 01201261653).

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

- Структуры соединений для проведения компьютерного моделирования: пептидные антагонисты интегрин-рецепторов тромбоцитов и гетеромерные пептиды на основе имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана – донора оксида азота.

- Результаты изучения синтезированных соединений физико-химическими методами: масс-спектрометрией, ЯМР  $^1\text{H}$ -спектроскопией и элементным анализом.

- Результаты исследования антиагрегационных свойств синтезированных пептидных и гетеромерных пептидных соединений *in vitro*.

- Технология получения наночастиц гетеромерного пептида.

- Технологии получения лиофилизата гетеромерного пептида для приготовления

раствора для инъекции и лиофилизата наночастиц гетеромерного пептида для приготовления суспензии для инъекции.

- Результаты качественного и количественного анализа лиофилизатов гетеромерного пептида, изучения стабильности в процессе хранения.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 152 страницах, включает 35 рисунков и 30 таблиц. Список литературы содержит 144 источника.

## **СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ**

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Компьютерное моделирование антагонистов интегрин-рецепторов тромбоцитов.** Моделирование проводили с помощью программы «Алгокомб».

**Метод прогнозирования биологической активности фуруксанов.** Прогноз для фуруксанов выполняли с помощью программы PASS Professional 2010.1.

**Методика синтеза пептидов.** Пептиды синтезировали на пептидном синтезаторе ABI 433A PeptideSynthesizer (Applied Biosystems) по Fmoc-стратегии.

**Методика очистки полученных соединений.** Очистку осуществляли на высокоэффективном препаративном жидкостном хроматографе PuriFlash 450 (InterChim).

**Подтверждение строения соединений.** Строение подтверждали методами хромато-масс-спектрометрии (Waters MSD SQD-ESI (Waters)), ЯМР  $^1\text{H}$ -спектроскопии (с привлечением двумерных методик  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -спектров COSY) (Brucker Avance 600 mhz (Brucker)) и элементным анализом (CHN-анализатор Perkin Elmer 2400 (Perkin Elmer)).

**Определение антиагрегационной активности соединений в эксперименте *in vitro*.** Антиагрегационную активность соединений определяли турбидиметрическим методом Борна (Born, 1962) на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов/счетчик 230LA-2 (Биола).

**Степень включения гетеромерного пептида в наночастицы.** Степень включения пептида определяли методом ВЭЖХ в супернатанте, полученным при центрифугировании суспензии наночастиц на центрифуге Beckman L8-60M (Beckman).

**Оценка качества лиофилизатов.** Качество лиофилизатов оценивали с помощью



методик, описанных в фармакопейных статьях ГФ XII при определении растворимости в воде для инъекции (ч. 1, стр. 92), цветности (ч. 1, стр. 93), прозрачности (ч. 1, стр. 98), pH (ч.1, стр. 85), остаточного органического растворителя (ч. 1, стр. 115), стерильности (ч. 1, стр. 150), пирогенности (ч. 1, стр. 125), бактериальных эндотоксинов (ч. 1, стр. 128). Для определения потери в массе при высушивании и средней массы использовали методики ГФ XI (ч. 1, стр. 176, ч. 2, стр. 140).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **РАЗРАБОТКА СОЕДИНЕНИЙ – ИНГИБИТОРОВ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ**

#### **Пептидные ингибиторы агрегации тромбоцитов**

**Молекулярное моделирование пентапептидов.** Моделирование взаимодействия белка интегрин  $\alpha_{\text{IIb}}/\beta_3$  с пептидами проводили с помощью программы «Алгокомб», модифицированной для учета внутренних нековалентных взаимодействий лиганда и явного учета молекул воды в сайте связывания. Расчет оценки связывания [Ramensky et al, 2007] с белком проводили для пептидов вида «A-B-C-Asp-D», где «A», «B», «C», «D» – L-аминокислотные остатки; «C» – глицин или аланин. Наличие остатка аспарагиновой кислоты положительно влияет на связывание с белком (согласно визуальному анализу), так как он может образовывать ионную связь с ионом магния в активном сайте. Провели докинг 20 000 пептидов. В базе данных PDB представлено 17 комплексов белка интегрин  $\alpha_{\text{IIb}}/\beta_3$ . Для докинга и расчета оценки связывания были выбраны структуры с идентификаторами «2vdp» и «2vc2», так как комплекс «2vdp» состоит из белка-мишени и октапептида, а комплекс «2vc2» с лигандом близким по размеру к пентапептиду. Для всех рассматриваемых пептидов проведен докинг и рассчитана оценка связывания с конформациями белка  $\alpha_{\text{IIb}}/\beta_3$ . Для каждой конформации белка выбрано 60 веществ с наилучшими оценками связывания. Оценки связывания при докинге в комплекс «2vdp»: 16,52–13,89; при докинге в комплекс «2vc2»: 10,78–8,04. Бóльшая оценка связывания предполагает лучшую активность лиганда, поэтому результаты рассчитанных оценок связывания демонстрируют, что пептиды лучше располагаются в сайте комплекса «2vdp».

**Синтез пептидов с вероятной антиагрегационной активностью.** Синтез 20 наиболее эффективных (по результатам компьютерного моделирования) пептидов осуществляли с использованием Fmoc-стратегии (рис. 1).

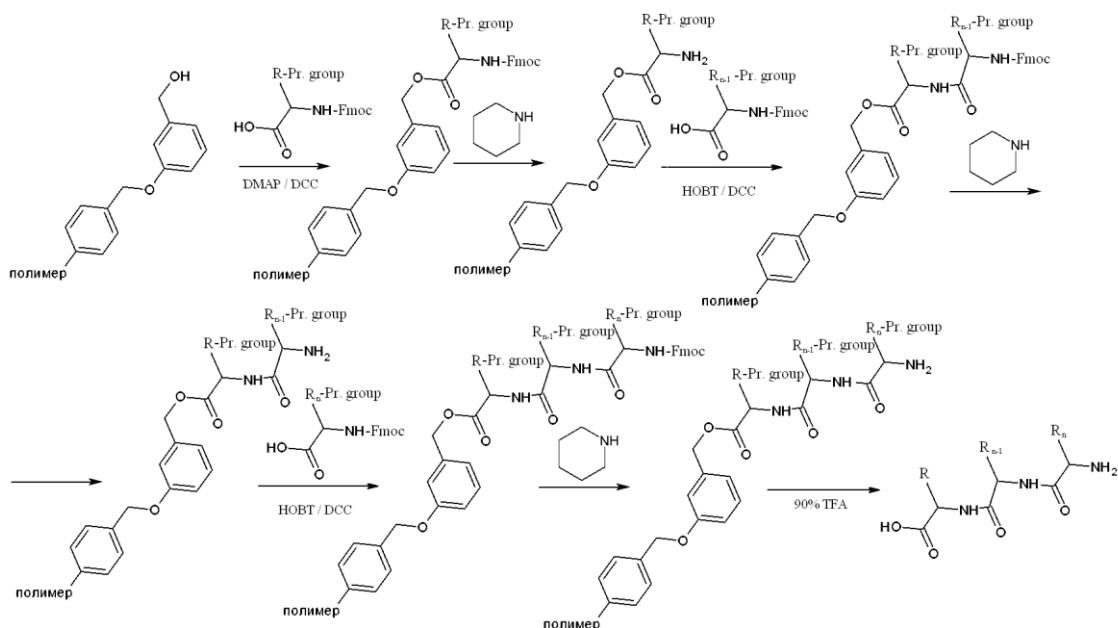


Рисунок 1. Схема синтеза пептидов, где R = остатки аминокислот, Pr. (protected) group = защитные группы аминокислот

**Определение антиагрегационной активности синтезированных пептидов *in vitro*.** Проведенные исследования свидетельствует о способности полученных соединений уменьшать агрегацию тромбоцитов (табл. 1).

Таблица 1. Данные синтезированных пептидов 1–20

№	Пептид	Оценка связывания	IC <sub>50</sub> , мкМ	№	Пептид	Оценка связывания	IC <sub>50</sub> , мкМ
1	Phe-Ile-Ala-Asp-Thr	15,39	12,53±0,09	11	Lys-Ile-Ala-Asp-Asp	15,47	14,68±0,13
2	Lys-His-Ala-Asp-Asp	16,52	11,13±0,25	12	Arg-Ser-Gly-Asp-Arg	15,42	41,95±0,08
3	His-Ile-Gly-Asp-Asp	16,20	15,47±0,11	13	Arg-Phe-Gly-Asp-Arg	15,39	26,15±0,09
4	Arg-Val-Gly-Asp-Arg	15,94	17,60±0,16	14	Arg-Trp-Gly-Asp-Trp	16,19	70,33±0,09
5	Cys-His-Ala-Asp-Asp	15,92	55,20±0,33	15	Arg-Ile-Gly-Asp-Trp	15,89	50,10±0,08
6	Arg-Phe-Ala-Asp-Asp	15,81	28,23±0,35	16	Arg-Tyr-Gly-Asp-Trp	15,46	32,56±0,09
7	Arg-Tyr-Gly-Asp-Arg	15,64	14,50±0,17	17	Tyr-Leu-Gly-Asp-Asp	15,36	42,59±0,14
8	Arg-Met-Ala-Asp-Asp	15,62	34,52±0,04	18	Leu-His-Gly-Asp-Asp	15,29	79,53±0,07
9	Arg-Phe-Gly-Asp-Asp	15,59	60,79±0,07	19	Arg-His-Gly-Asp-Arg	15,24	57,37±0,11
10	Met-His-Ala-Asp-Asp	15,58	58,39±0,11	20	Arg-Arg-Ala-Asp-Thr	15,00	68,28±0,09

Полученные результаты показали наличие дозозависимого ингибирования АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов крови здоровых доноров под действием пептидных ингибиторов GP IIb/IIIa-рецепторов.

### Исследование возможности использования имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с; 3,4-с']дифуроксанов как ингибиторов агрегации тромбоцитов

Одним из классов химических соединений, производные которых являются донорами оксида азота, являются фуроксаны. С помощью программы PASS Professional 2010.1 был выполнен прогноз биологической активности различных имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксанов и установлена высокая вероятность проявления ими

антиагрегационной активности. Соединения 21–42 (табл. 2) были синтезированы на кафедре химии ГБОУ ВПО Марийского государственного университета и предоставлены для установления антиагрегационной активности. Для получения соединений, влияющих на генерацию азота различными способами, нами были синтезированы гетеромерные пептиды 43 и 44. Особенностью соединений 43, 44 является то, что имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксанный фрагмент, относится к экзогенным донорам оксида азота, а аргинин и глутамин стимулируют эндогенную генерацию оксида азота. Гетеромерные пептиды 43, 44 (табл. 2) получали с использованием Fmoc-стратегии (рис. 2).

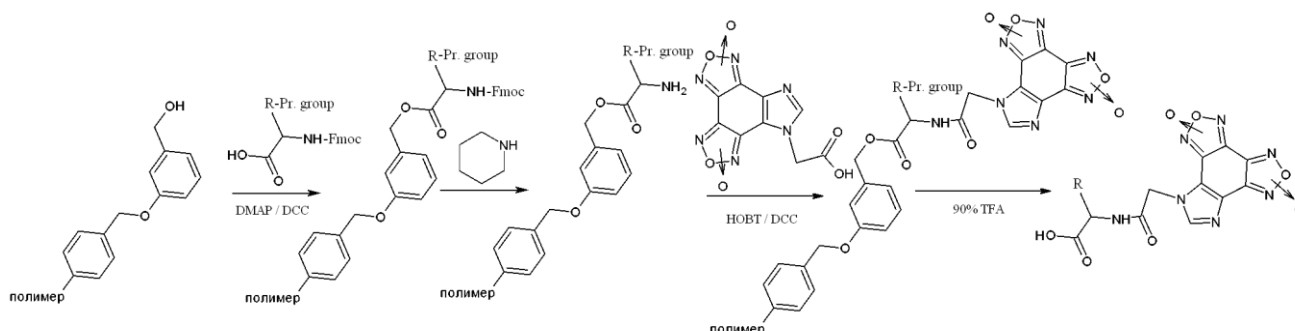
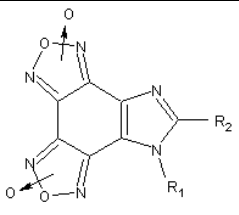


Рисунок 2. Схема синтеза гетеромерных пептидов 43 ( $R = -CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$ , Pr. group (protected group) = Pbf) и 44 ( $R = -CH_2CH_2C(O)NH_2$ , Pr. group = Trt).

Турбидиметрическим методом Борна подтвержден сделанный прогноз и доказано, что соединения 21–44 обладают выраженным антиагрегационным эффектом *in vitro* (табл. 2).

Таблица 2. Антиагрегационная активность соединений 21–44 *in vitro*

							
№	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	IC <sub>50</sub> , мкМ	№	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	IC <sub>50</sub> , мкМ
21	H	H	1,05±0,08	33	CH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>	H	1,21±0,01
22	H	CH <sub>3</sub>	0,41±0,01	34	CH <sub>2</sub> C(O)OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	0,11±0,01
23	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	1,81±0,01	35	CH <sub>2</sub> C(O)OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>	0,30±0,01
24	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	0,61±0,01	36	CH <sub>2</sub> C(O)OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0,71±0,02
25	H	<i>i</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	0,42±0,03	37	CH <sub>2</sub> C(O)OH	H	1,06±0,07
26	H	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	1,12±0,03	38	CH <sub>2</sub> C(O)OH	CH <sub>3</sub>	2,42±0,09
27	CH <sub>3</sub>	H	0,71±0,01	39	CH <sub>2</sub> C(O)OH	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	1,55±0,06
28	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	0,81±0,02	40	CH <sub>2</sub> CN	H	0,41±0,01
29	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	0,62±0,02	41	H	NO <sub>2</sub>	1,81±0,01
30	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	H	1,41±0,03	42	H	CH <sub>2</sub> OH	0,61±0,01
31	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	H	0,72±0,01	43	CH <sub>2</sub> C(O)-Arg	H	0,42±0,03
32	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	H	1,81±0,01	44	CH <sub>2</sub> C(O)-Gln	H	1,12±0,03

Таким образом, подтверждена возможность использования производных имидазобензодифуроксана в качестве ингибиторов агрегации тромбоцитов. Выявлено,

проявление более выраженной антиагрегационной активности соединения 43 по сравнению с базовым имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксаном (21). По результатам исследования антиагрегационная активность имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксанов ( $IC_{50}$  0,11–2,42) выше антиагрегационной активности пептидов 1–20 ( $IC_{50}$  11,13–79,53), и следовательно, имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксаны перспективны в качестве фармакофора при создании «гибридных» антиагрегационных соединений.

### **Гетеромерные пептиды на основе имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с'] дифуроксана и пептидных ингибиторов агрегации тромбоцитов**

Для создания соединений, обладающих более выраженными антиагрегационными свойствами по сравнению с пептидами, были исследованы вещества с двумя различными механизмами воздействия на агрегацию тромбоцитов, состоящие из двух фармакофорных групп: пептидной – ингибиторы GP IIb/IIIa-рецепторов тромбоцитов и фуроксановой – доноры оксида азота.

**Компьютерное моделирование гетеромерных пептидов.** С помощью программы «Алгокомб» выполнили компьютерное моделирование связывания гетеромерных пептидов с белком интегрин  $\alpha_{IIb}/\beta_3$ . Расчет оценки связывания с белком проводили для соединений вида «*Fur*-A-B-C-Asp-D» (табл. 3), где «*Fur*» – карбоксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксан; «A», «B», «C», «D» – L-аминокислотные остатки; «C» – глицин или аланин. Всего было сконструировано 48 000 молекул. Для докинга из базы данных PDB выбрали комплекс белка «2vdp». Докинг начинали с правильного расположения кислотного фрагмента гетеромерного пептида для учета наличия ионной связи лиганда с ионом магния в активном сайте. В процессе докинга учитывали наличие двух молекул воды в активном сайте белка.

Таблица 3. Данные гетеромерных пептидов 45–64

№	Пептид	Оценка связывания	$IC_{50}$ , мкМ	№	Пептид	Оценка связывания	$IC_{50}$ , мкМ
45	<i>Fur</i> -Phe-Ile-Ala-Asp-Thr	13,51	1,74±0,01	55	<i>Fur</i> -Lys-Ile-Ala-Asp-Asp	14,04	1,95±0,02
46	<i>Fur</i> -Lys-His-Ala-Asp-Asp	17,30	1,52±0,01	56	<i>Fur</i> -Arg-Ser-Gly-Asp-Arg	6,06	1,74±0,01
47	<i>Fur</i> -His-Ile-Gly-Asp-Asp	13,30	2,83±0,02	57	<i>Fur</i> -Arg-Phe-Gly-Asp-Arg	7,99	2,13±0,02
48	<i>Fur</i> -Arg-Val-Gly-Asp-Arg	13,72	2,95±0,02	58	<i>Fur</i> -Arg-Trp-Gly-Asp-Trp	10,83	2,65±0,02
49	<i>Fur</i> -Cys-His-Ala-Asp-Asp	13,06	3,28±0,01	59	<i>Fur</i> -Arg-Ile-Gly-Asp-Trp	13,95	3,35±0,03
50	<i>Fur</i> -Arg-Phe-Ala-Asp-Asp	7,72	2,03±0,02	60	<i>Fur</i> -Arg-Tyr-Gly-Asp-Trp	9,64	2,95±0,02
51	<i>Fur</i> -Arg-Tyr-Gly-Asp-Arg	8,11	1,78±0,01	61	<i>Fur</i> -Tyr-Leu-Gly-Asp-Asp	11,19	2,78±0,02
52	<i>Fur</i> -Arg-Met-Ala-Asp-Asp	7,52	1,92±0,01	62	<i>Fur</i> -Leu-His-Gly-Asp-Asp	9,42	2,81±0,02
53	<i>Fur</i> -Arg-Phe-Gly-Asp-Asp	8,89	2,41±0,01	63	<i>Fur</i> -Arg-His-Gly-Asp-Arg	6,64	2,54±0,02
54	<i>Fur</i> -Met-His-Ala-Asp-Asp	9,59	2,26±0,02	64	<i>Fur</i> -Arg-Arg-Ala-Asp-Thr	7,54	2,61±0,01

В результате эксперимента выявлено, что гетеромерный пептид – *Fur*-Lys-His-

Ala-Asp-Asp (46) – имел оценку связывания 17,3, что выше, чем лучший из пептидов, построенных из стандартных аминокислот (16,5). При этом отмечается, что гетеромерные пептиды удачно размещаются в имеющейся на белке полости, а имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксановый фрагмент не мешает связыванию.

**Синтез гетеромерных пептидов 45–64** проводили по Fmoc-стратегии.

**Определение специфической активности гетеромерных пептидов *in vitro*.** В процессе эксперимента выявлено, что антиагрегационная активность, определенная *in vitro*, для смоделированных соединений (45–64: IC<sub>50</sub> 1,52–3,35) намного превосходит антиагрегационную активность базовых пентапептидов (1–20: IC<sub>50</sub> 11,1–79,5). Выявлено, что наиболее активным ингибитором среди гетеромерных пептидов оказалось соединение *Fur*-Lys-His-Ala-Asp-Asp (46) (IC<sub>50</sub> 1,52 мкМ), что соответствует результатам прогноза выполненного математического моделирования.

**Исследование растворимости и химической стабильности гетеромерных пептидов.** Соединения мало растворимы в воде при 20°C (1:100-1:120), растворимы в воде при 50°C (1:30-1:40) и 70°C (1:20-1:30), растворимы в этиловом спирте (1:20-1:35), легко растворим в диметилформамиде (1:3-1:10), очень мало растворимы в эфире диэтиловом (1:1000-1:1100) и гексане (1:1150-1:1300), практически нерастворимы в хлороформе (1:10000) и дихлорметане (1:10000). Химическую стабильность указанных соединений проверяли в буферных растворах с различными значениями pH, соответствующими средам желудочно-кишечного тракта: желудочному соку и соку двенадцатиперстной кишки и тонкого кишечника. Для этих целей использовали 0,1 М раствор HCl с добавлением пепсина активностью не более 750 000 Ед/л и буферные растворы с pH 6,8-7,8 с добавлением панкреатина активностью не более 1750 Ед/л. С помощью метода ВЭЖХ выявлено гидролитическое разрушение гетеромерных пептидов (контрольные точки: 1, 2, 5, 10, 30, 60 мин) во всех исследованных средах.

**Доказательство структуры полученных соединений.** Строение соединений 1-20 подтверждали методами хромато-масс-спектрометрии, ЯМР <sup>1</sup>H-спектроскопии (с привлечением методик <sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H-спектров COSY), элементного анализа. Фуроксановое кольцо в молекуле производных бензофуроксана обладает способностью к таутомеризации в свою вторую форму, содержащую N-оксидную группу на другой

стороне цикла азота [Королев, 2003]. Для N-карбоксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с; 3,4-с']дифуроксана возможно существование четырех таутомерных форм. В этой связи вследствие сложности распознавания спектров ЯМР  $^1\text{H}$  строение синтезированных соединений 45-64 подтверждали только методами хромато-масс-спектрометрии и элементного анализа. Содержание основного вещества (ВЭЖХ-УФ; ВЭЖХ-МС) для всех синтезированных соединений составляло более 98%.

#### **РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИОФИЛИЗАТА ГЕТЕРОМЕРНОГО ПЕПТИДА ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАСТВОРА ДЛЯ ИНЪЕКЦИИ**

Исходя из полученных в экспериментальных исследованиях данных, для создания лиофилизатов и дальнейших технологических исследований был выбран гетеромерный пептид *Fur-Lys-His-Ala-Asp-Asp* (шифр *ИБДФ-II-46*), который проявил наибольшую антиагрегационную активность среди гетеромерных пептидов.

**Получение лиофилизата гетеромерного пептида.** В связи с низкой стабильностью в буферных растворах, соответствующим среде желудочно-кишечного тракта, был выбран парентеральный путь введения *ИБДФ-II-46*. Обоснование дозы действующего вещества, проводили по литературным данным по аналогии с веществом такой же фармакологической группы: эптифибатид (интегрелин) [Tcheng et al., 1995; Phillips et al., 1997] и на основании собственных исследований *in vitro*. Для интегрелина ( $\text{IC}_{50}$  0,16 мкМ), доза лекарственного вещества составляет 0,75 мг/мл. Учитывая разницу в  $\text{IC}_{50}$  для *ИБДФ-II-46* была выбрана доза в 8 мг/мл.

Принимая во внимание, что гетеромерный пептид мало растворим в воде и его доза мала, была исследована возможность использования при разработке технологии лиофилизирования различных вспомогательных веществ, выполняющих функции структурообразователей и стабилизаторов. Для подбора оптимального состава лиофилизата гетеромерного пептида, удовлетворяющего показателям качества, были приготовлены составы с различным содержанием вспомогательных веществ, традиционно используемых в технологии лиофилизации соединений белковой природы и аминокислот: поливиниловый спирт (ПВС), поливинилпирролидон (ПВП), D-маннитол в концентрациях 15, 20, 30 мг/мл. В ходе проведенных исследований было отмечено, что составы с ПВС представляли собой непрозрачные растворы, содержащие нерастворившиеся частицы

после интенсивного встряхивания с водой для инъекций в течение 10 мин; данные составы не соответствовали таким показателям, как прозрачность, цветность, растворимость. Растворы ПВП и D-маннитола в концентрациях 15, 20, 30 мг/мл были свободны от указанных недостатков. Полученные растворы фильтровали через мембранные фильтры «MF-Millipore» 0,22 мкм в стерильные сборники. Для получения стабильной лекарственной формы растворы пептида лиофилизировали, варьируя режимы замораживания и лиофилизации раствора. По окончании процесса оценивали показатели качества: внешний вид, потерю в массе при высушивании, растворимость в растворителе для инъекций, прозрачность раствора, pH, количественное содержание.

**Подбор режима замораживания.** Для исследования влияния режима замораживания на качество лиофилизата варьировали скорость заморозки.

Медленное замораживание (рис. 3) – пептид загружали на полки лиофильной сушилки при  $+20\div+22^{\circ}\text{C}$ , охлаждали до  $-22\div+25^{\circ}\text{C}$  за 1 час и выдерживали 1,5 ч. Далее охлаждали до  $-33\div+35^{\circ}\text{C}$  за 1 час и выдерживали 1,5 ч, затем охлаждали до  $-42\div+45^{\circ}\text{C}$  за 1 час и выдерживали 1,5 ч, охлаждали до  $-48\div+50^{\circ}\text{C}$  за 1 час и выдерживали 5 ч.

Быстрое замораживание (рис. 4) – пептид загружали на полки лиофильной сушилки при температуре  $+20\div+22^{\circ}\text{C}$ , охлаждали полки за 1-1,5 час до  $-22\div+25^{\circ}\text{C}$ , за 1 час до  $-31\div+35^{\circ}\text{C}$ , за 1 час до  $-40\div+45^{\circ}\text{C}$ , и за 1 час до  $-48\div+50^{\circ}\text{C}$  и выдерживали 5 ч.

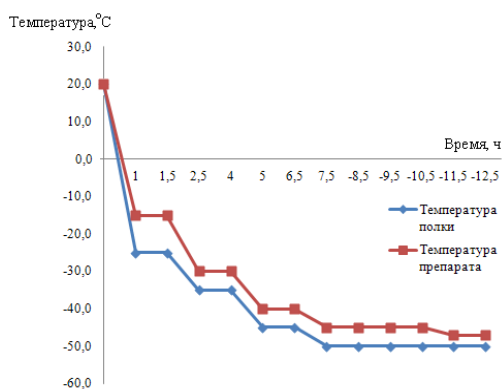


Рисунок 3. Медленное замораживание

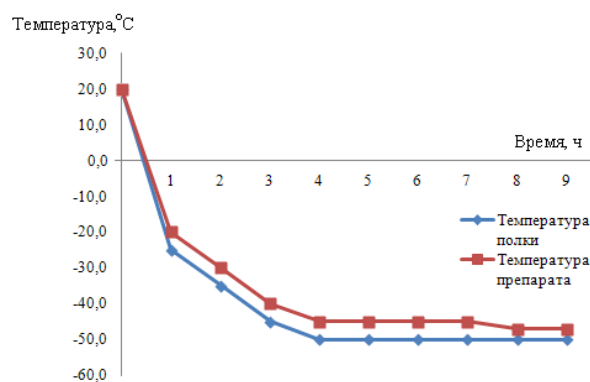


Рисунок 4. Быстрое замораживание

Полученные лиофилизаты гетеромерных пептидов анализировали с помощью ВЭЖХ. Анализ показал, что в составах с ПВП неудовлетворительное содержание пептида (менее 90%). Лيوфилизаты с D-маннитола, полностью соответствовали всем показателям качества. Концентрация D-маннитола не оказывала влияния на качество лиофилизата, поэтому концентрация 15 мг/мл была признана оптимальной. Поскольку

режим замораживания не влиял на качество конечного продукта, в качестве наиболее технологичного метода целесообразно использовать быстрое замораживание продукта.

**Разработка режима лиофильной сушки.** Для исследования влияния режимов лиофилизации раствор гетеромерного пептида лиофилизировали, варьируя изменение температуры полки лиофильной сушилки (рис. 5-8, табл. 4).

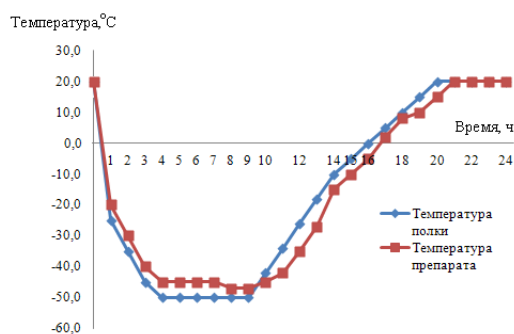


Рисунок 5. Температурный режим №1

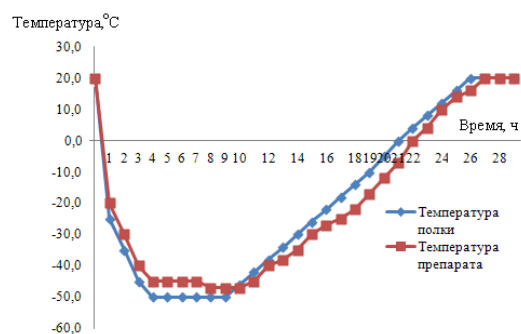


Рисунок 6. Температурный режим №2

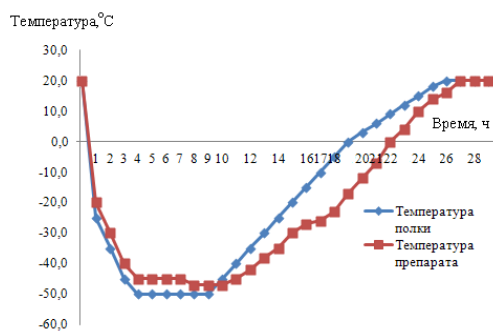


Рисунок 7. Температурный режим №3

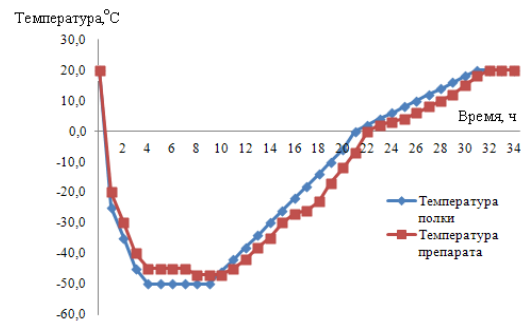


Рисунок 8. Температурный режим №4

Таблица 4. Сравнение режимов лиофилизации растворов гетеромерного пептида

Температура, °C	Режим лиофилизации гетеромерного пептида и скорость нагрева полки лиофильной сушилки (°C/ч)			
	№1 (рис. 5)	№2 (рис. 6)	№3 (рис. 7)	№4 (рис. 8)
-50	Выдержка в течение 5 часов при давлении 0,01 мБар			
от -50 до -10	8	4	5	4
от -10 до 0	4	5		
от 0 до +20	5	4	3	2
+20	Выдержка в течение 4 часов при давлении 0,01 мБар			

Анализируя результаты эксперимента, необходимо отметить, неудовлетворительное качество (по тесту прозрачности растворов) лиофилизатов, полученных при использовании режима №3. Показатели качества лиофилизатов, полученных при использовании режимов №1, 2 и 4 соответствовали нормам для инъекционных лекарственных форм. В целях экономии электроэнергии было признано целесообразным использование режима №1.

На основании проведенных исследований составлена технологическая схема получения лиофилизата, которая состоит из следующих этапов: приготовление раствора пептида, стерильная фильтрация раствора, наполнение ампул, лиофилизация, фасовка, упаковка и маркировка готового продукта (рис. 9).



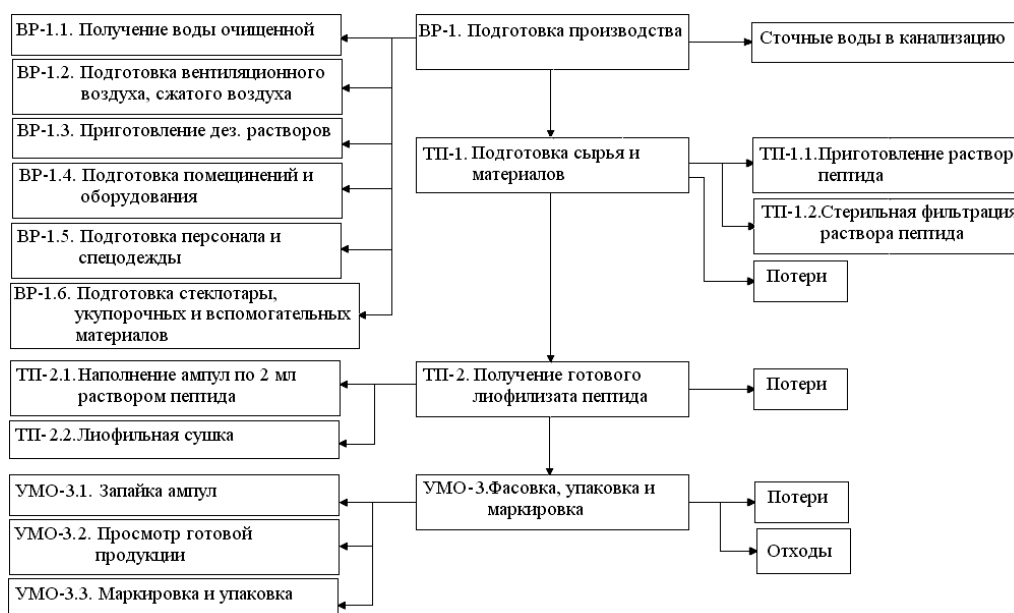


Рисунок 9. Технологическая схема производства лиофилизата *ИБДФ-П-46*

## РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИОФИЛИЗАТА НАНОЧАСТИЦ ГЕТЕРОМЕРНОГО ПЕПТИДА ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ СУСПЕНЗИИ ДЛЯ ИНЪЕКЦИИ

Для пролонгирования фармакологического эффекта в настоящее время используется, среди иных, такой технологический прием, как включение биологически активного соединения в наночастицы. Кроме пролонгирования, этот технологический прием позволяет изменить фармакокинетический профиль соединения за счет изменения профиля терминального участка кривой [Блынская, 2010]. Для соединений пептидной природы, и, в частности, пептида антиагрегационного действия, этот факт является очень важным, позволяя избежать резких колебаний вещества в крови.

При разработке технологии включения *ИБДФ-П-46* в состав наночастиц принимались во внимание физико-химические свойства пептида и требования к носителю: отсутствие токсичности, его биodeградируемость. Поэтому для создания наночастиц был выбран сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA 50/50). Учитывая растворимость *ИБДФ-П-46*, в качестве метода создания наночастиц был выбран метод двойного эмульгирования, используемый для лабильных соединений, при котором обеспечивается диффузия органического растворителя в водную фазу. Учитывая низкую токсичность и низкую температуру кипения, в качестве органического растворителя для PLGA использовали дихлорметан.

**Подбор концентрации PLGA 50/50.** К 9,6 мл раствора PLGA в дихлорметане добавляли по каплям 8,40 мл водный раствор *ИБДФ-П-46* (концентрация 0,029 мг/мл) при

перемешивании на магнитной мешалке IKA RST basic (IKA). Влияние PLGA на включение гетеромерного пептида в наночастицы исследовали в диапазоне соотношений – *ИБДФ-П-46* : PLGA 50/50 (табл. 5), при этом соотношение 1:4 отмечено как оптимальное.

Таблица 5. Результаты исследования соотношения *ИБДФ-П-46* и PLGA 50/50

Соотношение	1:0,25	1:0,5	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6
Степень включения, %	4,1±0,2	4,3±0,1	5,5±0,2	6,1±0,2	8,5±0,3	25,0±0,2	9,5±0,2	9,2±0,1

**Получение первичной эмульсии типа «вода/масло».** К 9,6 мл раствора полимера PLGA 50/50 (концентрация 0,10 мг/мл) в дихлорметане добавляли по каплям 7,20 мл водный раствор *ИБДФ-П-46* (концентрация 0,029 мг/мл) при постоянном перемешивании на магнитной мешалке IKA RST basic (IKA). Продолжали перемешивание погружным гомогенизатором IKA Ultra-Turrax T-25 при 24 тыс. об./мин. В процессе приготовления эмульсии варьировали скорость перемешивания магнитной мешалки и режим перемешивания погружного гомогенизатора (табл. 6). Готовность эмульсии определяли по образованию пенистой массы белого цвета и под микроскопом. Наиболее технологичным признан режим №3, так как время получения однородной эмульсии наименьшее, а размер наблюдаемых частиц в среднем составляло 250±3,7 нм.

Таблица 6. Режимы получения эмульсии типа «вода/масло»

	Режим №1	Режим №2	Режим №3
Скорость перемешивания магнитной мешалки, об/мин	250	250	500
Дискретность перемешивания погружного гомогенизатора	Перемешивание в течение 4 мин	3 раза по 30 сек – перемешивание, 2 раза по 30 сек – перерыв	3 раза по 30 сек – перемешивание, 2 раза по 30 сек – перерыв
Время приготовления	25 мин ± 10 сек	20 мин ± 10 сек	12 мин ± 10 сек

**Выбор стабилизатора для вторичной эмульсии.** В качестве стабилизаторов эмульсии, на основании данных литературы, были выбраны для исследования такие вспомогательные вещества, как: ПВС, метилцеллюлоза (МЦ), ПВП в соотношениях *ИБДФ-П-46* : стабилизатор – 1:1, 1:3, 1:5. В результате было выявлено, что оптимальным является использование ПВС при соотношениях 1:3 и 1:5, размер частиц эмульсии при этом не превышал 300±2,5 нм. В дальнейших экспериментах было использовано соотношение 1:3.

**Получение вторичной эмульсии типа «вода/масло/вода».** К 144,0 мл 0,5% водного раствора ПВС добавляли по каплям 16,8 мл первичной эмульсии при перемешивании на магнитной мешалке в течение 3 мин. Варьировали скорость и время перемешивания магнитной мешалки (табл. 7). Далее при помощи погружного гомогенизатора IKA Ultra-Turrax T-25 при 24 тыс. об./мин получали двойную эмульсию. Режим перемешивания: 3 раза по 30 сек с двумя перерывами по 30 сек. Время получения эмульсии

Таблица 7. Режимы получения эмульсии типа «вода/масло/вода»

	Режим №1	Режим №2	Режим №3
Скорость перемешивания магнитной мешалки, об/мин	350	700	1000
Время перемешивания на магнитной мешалке	20 мин ± 10 сек	14 мин ± 10 сек	14 мин ± 10 сек

режимами №2 и 3 одинаковое, поэтому был выбран режим №2 как наиболее технологичный.

Получали эмульсию, в состав которой входили частицы размеров: от 350 до 2010 нм.

**Дополнительное диспергирование.** Для повышения устойчивости эмульсии проводили дополнительную гомогенизацию ультразвуком (УЗ-гомогенизатор Bandelin Sonopuls HD 3100 (Bandelin) с рабочей частотой 20 кГц) в течение 10 минут. Дополнительная гомогенизация за счет уменьшения размера крупных частиц позволила повысить однородность эмульсии и, как следствие, устойчивость эмульсии возросла до 20 минут.

Далее дихлорметан упаривали на роторном испарителе IKA RV-10 (IKA) при 40°C. Вторичную эмульсию фильтровали через стеклянный фильтр 40 мкм. Фильтрат собирали в круглодонную колбу на 250 мл с водным раствором 3,20 мл D-маннитола (концентрация 0,15 мг/мл) и перемешивали в течение 15 мин. Полученную смесь лиофилизировали.

**Подбор режима лиофилизации.** Использовали режимы, в которых варьировали изменение температуры полки лиофильной сушилки во времени (рис. 10-12, табл. 8).

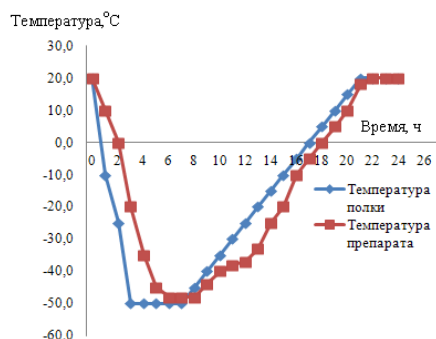


Рисунок 10. Температурный режим №1

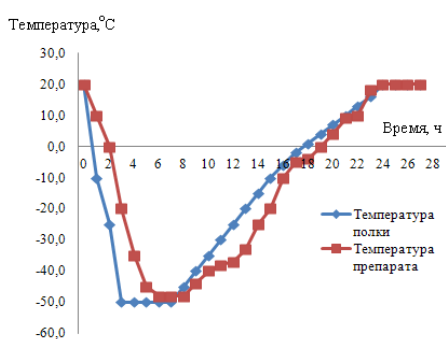


Рисунок 11. Температурный режим №2

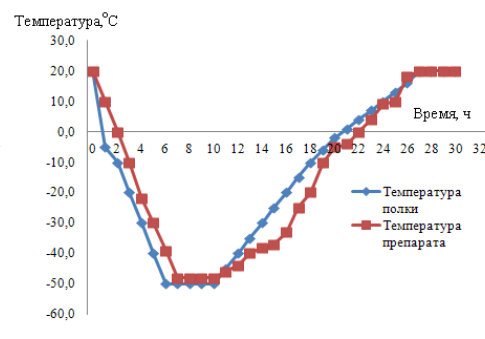


Рисунок 12. Температурный режим №3

Таблица 8. Сравнение режимов лиофилизации гетеромерного пептида в наночастицах

Температура, °C	Режим лиофилизации и скорость нагрева полки лиофильной сушилки (°C/ч)		
	№1 с быстрым замораживанием	№2 с быстрым замораживанием	№3 с медленным замораживанием
-50	Выдержка в течение 5 часов при давлении 0,01 мБар		
от -50 до -10	5	5	5
от -10 до 0		4	4
от 0 до +20		3	3
+20	Выдержка в течение 4 часов при давлении 0,01 мБар		

По окончанию процесса лиофилизации оценивали влияние режимов по следующим показателям оценки качества лиофилизатов: внешний вид, pH, потеря в массе при высушивании, размеры частиц, суспендируемость, количественное содержание ИБДФ-П-46. В результате эксперимента было выявлено, что при использовании режимов

№1, 2 получался лиофилизат наночастиц удовлетворительного качества. При температурных режимах №3 наблюдалось разделение фаз. В результате исследований наиболее технологичным оказался режим лиофилизации №1.

Получение наночастиц подтверждали с помощью анализатора частиц Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments Ltd.). Размеры частиц:  $304,5 \pm 4,20$  нм.

**Технология получения лиофилизата наночастиц ИБДФ-П-46.** Лиофилизат наночастиц получали в асептических условиях в стерильных боксах. На основании проведенных исследований разработана технологическая схема получения лиофилизата наночастиц (рис. 13), которая состоит из следующих этапов: приготовления растворов ПВС, пептида, полимера PLGA 50/50, D-маннитола; получения первичной и вторичной эмульсий, дополнительного диспергирования, удаления органического растворителя, фильтрования реакционной смеси, смешивания с D-маннитолом, наполнения ампул, лиофилизации, фасовки, упаковки и маркировки.

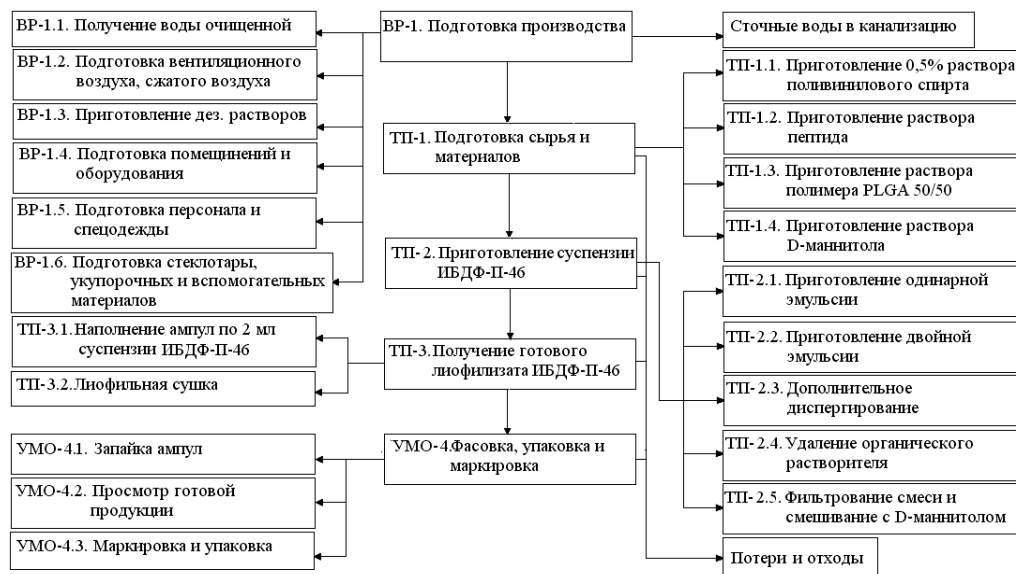


Рисунок 13. Технологическая схема производства лиофилизата наночастиц ИБДФ-П-46

Таким образом, в ходе экспериментальных исследований разработаны и оптимизированы технологии получения наночастиц гетеромерного пептида и лиофилизата наночастиц гетеромерного пептида ИБДФ-П-46 для приготовления суспензии для инъекции.

#### ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЛИОФИЛИЗАТОВ ГЕТЕРОМЕРНОГО ПЕПТИДА

**Изучение физико-химических свойств.** Внешний вид – все образцы представляли собой массы белого цвета. Средняя масса для лиофилизата ИБДФ-П-46 –  $0,023 \pm 0,002$  г/амп, для лиофилизата наночастиц ИБДФ-П-46 –  $0,08 \pm 0,005$  г/амп. Отклонения от средней массы не превышали  $\pm 10\%$ .

**Прозрачность, цветность и растворимость лиофилизата ИБДФ-П-46.** При добавлении к содержимому ампулы воды для инъекций и встряхивании в течение 3 мин образовывался прозрачный раствор. По показателю цветности раствор был бесцветным. При растворении лиофилизата в воде для инъекций значение pH составляло от 6,5 до 7,0.

**Определение размеров наночастиц.** Для определения размеров наночастиц использовали анализатор частиц Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments Ltd.), а также субмикронный лазерный спектрометр Coulter N4MD (Coulter Electronics) (табл. 9, рис. 14).

Таблица 9. Основные численные данные размеров наночастиц ИБДФ-П-46

№	Основные численные данные анализа*								
	T, °C	Диаметр частиц, нм	Индекс полидисперсности	d <sup>1</sup> , нм	d <sup>2</sup> , нм	d <sup>3</sup> , нм	S <sup>1</sup> , %	S <sup>2</sup> , %	S <sup>3</sup> , %
1	25	301,7±1,4	0,212±0,02	325,2±2,3	4462±12,4	0	95,4±1,1	4,6±0,1	0
2	25	306,4±2,1	0,181±0,01	384,5±1,7	0	0	100±1,5	0	0
3	25	305,5±1,7	0,2±0,01	331,4±2,1	5005±17,3	0	97,8±1,2	2,2±0,1	0

\* T – температура образца при анализе; d<sup>1</sup>, d<sup>2</sup>, d<sup>3</sup> – средние значения диаметров для основного пика, для 2-го по величине пика и для 3-го по величине пика при максимуме интенсивности светорассеяния; S<sup>1</sup> – площадь под кривой основного пика; S<sup>2</sup> – площадь под кривой 2-го по величине пика; S<sup>3</sup> – площадь под кривой 3-го по величине пика.

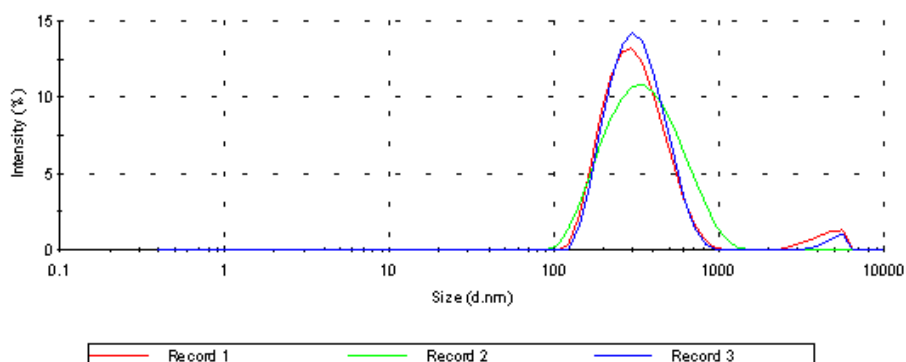


Рисунок 14. Распределение размеров наночастиц ИБДФ-П-46 по интенсивности светорассеяния

**Суспендируемость.** К лиофилизату наночастиц добавляли 1 мл воды и визуально наблюдали образование однородной суспензии. Суспензия устойчива не менее 20 мин.

**Подлинность.** Подлинность лиофилизатов гетеромерного пептида подтверждали методом ВЭЖХ. Хроматограммы и масс-спектр для гетеромерного пептида ИБДФ-П-46 представлены на рис. 15-17.

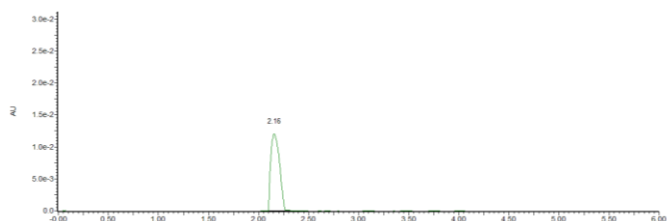


Рисунок 15. Хроматограмма:  
спектрофотометрический детектор

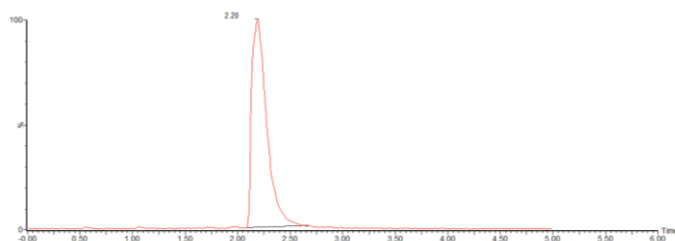


Рисунок 16. Хроматограмма:  
масс-спектрометрический детектор

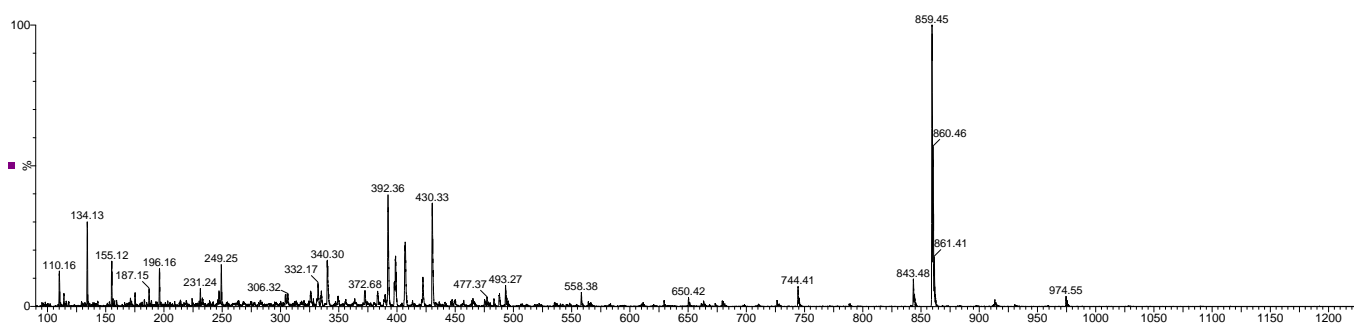


Рисунок 17. Масс-спектр  $[M + H]^+$  859,45;  $[M + 2H]^{2+}$  430,33 ( $t_{уд}$  2,20 мин)

**Количественное определение ИБДФ-П-46.** Определение проводили методом ВЭЖХ по градуировочному графику (зависимость площади пика на хроматограмме от концентрации пептида). Количественное содержание гетеромерного пептида в наночастицах определяли в надосадочной жидкости. Пробоподготовку осуществляли следующим образом: к содержимому ампулы добавляли 2 мл диметилформамида (ДМФ) и переносили в мерную колбу на 10 мл, объем доводили до метки и проводили интенсивное перемешивание на магнитной мешалке. После этого отбирали 1 мл смеси, разбавляли в три раза раствором вода : ДМФ (2 : 3) и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 3 мин. Количественное содержание гетеромерного пептида в лиофилизатах: 0,0079 – 0,0081 г/амп.

**Определение содержания посторонних (химических) примесей.** Определение проводили методом ВЭЖХ. Для исключения влияния D-маннитола на результаты анализа, его анализировали отдельно. На хроматограммах протонированный молекулярный ион не проявлялся, а депротонированный регистрировался в мертвом объеме ( $t_{уд}$  0,40 мин), поэтому D-маннитол не мешал анализу пептида ( $t_{уд}$  2,20 мин). При анализе установили отсутствие химических примесей (фрагментов пептида).

**Определение остаточного органического растворителя.** В процессе получения наночастиц гетеромерного пептида использовали дихлорметан, относящийся ко 2 классу (негенотоксичный) растворителей. Исследование проводили на хроматографе Кристалл 2000 М (Хроматэк) с капиллярной колонкой фирмы HP-FFAP 50м × 0,32мм, используя дозатор равновесного пара. Время удерживания (дозатор равновесного пара, нагретый до 80°C; температура испарителя 160°C; детектора 200°C; газ-носитель – азот; время испарения 16,0мин) составило 5,4 мин. Содержание дихлорметана не превышало 600 ppm (предельно допустимое содержание).

**Потери в массе при высушивании.** Показатель определяли сушкой лиофилизатов в вакуум-сушильном шкафу над  $P_2O_5$  при комнатной температуре и

остаточном давлении 5 мм рт.ст. до постоянной массы. Потеря в массе не превышала 3,0%.

**Механические включения.** В лиофилизатах механических включений не обнаружено.

**Стерильность, пирогенность, бактериальные эндотоксины.** Стерильность определяли методом прямого посева. Пирогенность изучали по изменению температуры тела у кроликов до и после инъекции. Определение содержания бактериальных эндотоксинов проводили с помощью ЛАЛ-реактива. 10 серий полученных лиофилизатов стерильны, апиrogenны; бактериальных эндотоксинов обнаружено не было.

**Изучение стабильности и установление сроков годности.** Лيوфилизаты гетеромерного пептида соответствовали всем показателям качества через 6, 12, 18 и 24 месяца (срок наблюдения). На основании полученных данных был установлен предварительный срок годности – 2 года.

Таблица 10. Показатели качества лиофилизатов гетеромерного пептида *ИБДФ-П-46*

Показатели	Полученные данные		Методы анализа
	Леофилизат <i>ИБДФ-П-46</i>	Леофилизат <i>ИБДФ-П-46</i> в наночастицах	
Внешний вид	Масса белого цвета	Масса белого цвета	Визуальный метод
Растворимость и время растворения в растворителе (вода для инъекций)	Прозрачный раствор после интенсивного встряхивания с растворителем в течение 3 мин	—	ГФ XII, часть 1, с. 92
Подлинность	Хроматограмма соответствует раствору стандартного образца		ВЭЖХ
Средняя масса и отклонение от средней массы	0,023±0,002 г/амп ±10%	0,08±0,005 г/амп ±10%	ГФ XI, часть 2, стр. 140
Прозрачность раствора	Прозрачный раствор	—	ГФ XII, часть 1, стр. 98
Цветность	Бесцветный раствор	—	ГФ XII, часть 1, стр. 93
pH (потенциометрически)	6,5 – 7,0		ГФ XII, часть 1, стр. 85
Посторонние (химические) примеси	Не обнаружено		ВЭЖХ
Количественное содержание	0,0079 – 0,0081 г/амп		ВЭЖХ
Размеры частиц (диаметр), нм	—	304,5±4,20	Метод динамического светорассеяния
Суспендируемость	—	Удовл., устойчива 20 мин.	Визуальный метод
Потеря массы при высушивании	Не более 3%		ГФ XI, часть 1, стр. 176
Остаточный органический растворитель	—	Не более 600 ppm	ГФ XII, часть 1, стр. 115
Механические включения	Не обнаружены		РД 42-501-98
Стерильность	Стерилен		ГФ XII, часть 1, стр. 150
Пирогенность	Апиrogenен		ГФ XII, часть 1, стр. 125
Бактериальные эндотоксины	Не содержит		ГФ XII, часть 1, стр. 128
Хранение	В сухом защищенном от света месте при температуре -20°C.		

### **ОБЩИЕ ВЫВОДЫ**

1. С применением программы «Алгокомб» и PASS Professional 2010.1 впервые выполнено компьютерное моделирование ингибиторов агрегации тромбоцитов: 20 000 пептидов, 24 производных фуросана и 48 000 гетеромерных пептидов.

2. С использованием автоматизированного пептидного синтезатора ABI 433 PeptideSynthesizer по Fmoc-стратегии синтезированы 40 наиболее активных (согласно

компьютерному моделированию) пептидов и гетеромерных пептидов.

3. Строение синтезированных пептидов подтверждено с помощью методов спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  (с привлечением двумерных методик  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -спектров COSY), масс-спектрометрии и элементного анализа; гетеромерных пептидов с помощью масс-спектрометрии и элементного анализа.

4. Турбидиметрическим методом Борна подтверждена антиагрегационная активность синтезированных соединений *in vitro* и выявлен наиболее активный гетеромерный пептид – *Fur-Lys-His-Ala-Asp-Asp*.

5. Разработана технология получения наночастиц гетеромерного пептида методом двойного эмульгирования с диффузией органического растворителя в водную фазу.

6. Разработаны технология получения лиофилизата гетеромерного пептида для приготовления раствора для инъекции и лиофилизата наночастиц гетеромерного пептида для приготовления суспензии для инъекции.

7. Определены показатели качества для стандартизации лиофилизата гетеромерного пептида и лиофилизата наночастиц гетеромерного пептида. Установлено сохранение показателей качества в течение 2 лет на серии лиофилизатов гетеромерного пептида.

### **СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. **Алексеев, А.А.** Пептидные и модифицированные пептидные ингибиторы агрегации тромбоцитов: математическое моделирование и синтез / **А.А. Алексеев**, М.И. Брылев, В.Л. Королев, Д.С. Лоторев, А.Ю. Лизунов, Е.А. Батуев, Л.А. Павлова // Сб. докл. научно-практической конференции «Новые химико-фармацевтические технологии» – Москва. – 2012. – С. 178-182.

2. **Алексеев, А.А.** Пептидные ингибиторы агрегации тромбоцитов: математическое моделирование, синтез и оценка специфической активности новых соединений в условиях *in vitro* / **А.А. Алексеев**, М.И. Брылев, В.Л. Королев, Д.С. Лоторев, А.Ю. Лизунов, Е.А. Батуев, Л.А. Павлова // **Бутлеровские сообщения**. – 2012. – Т.32, №11. – С. 96-100.

3. Патент 2502739 Российская Федерация, МПК C07D 498/14, A61K 31/4245, A61P 7/02. N-карб(глутаминил)оксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксан, ингибирующий агрегацию тромбоцитов / **А.А. Алексеев**, М.И. Брылев, В.Л. Королев, Д.С. Лоторев, Е.А. Батуев, Л.А. Павлова, Н.Н. Белушкина; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. – №2012146266/04; заявл. 31.10.2012; опубл. 27.12.2013, Бюл. №5. – 7 с.: ил.

4. **Алексеев, А.А.** Пептидные ингибиторы агрегации тромбоцитов / **А.А. Алексеев**, М.И. Брылев, В.Л. Королев, Д.С. Лоторев, А.Ю. Лизунов, Е.А. Батуев, Л.А. Павлова // **Ученые записки. Электронный научный журнал Курского государственного университета**. – 2013. – Т.2, №3 (27). – С. 32-37.

5. **Алексеев, А.А.** Исследование ингибиторов агрегации тромбоцитов пептидной природы / **А.А. Алексеев** // Сб. докл. 80-ой Юбилейной Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицины». – Иркутск. – 2013. – С. 374-375.

6. **Алексеев, А.А.** Синтез и изучение биологической активности новых антиагрегационных пентапептидов / **А.А. Алексеев**, М.И. Брылев, В.Л. Королев, Д.С. Лоторев, Л.А. Павлова // Сб. докл.



Первой Всероссийской научно-практической конференции «Проблемы разработки новых лекарственных средств». – Москва. – 2013. – С. 5.

7. **Алексеев, А.А.** Гликопротеиновые GP IIb/IIIa рецепторы тромбоцитов – потенциальная мишень для антиагрегационных препаратов / **А.А. Алексеев**, В.Л. Королев, Л.А. Павлова // Сб. докл. VI Архангельской международной медицинской научной конференции молодых ученых и студентов. – 2013. – №1. – С. 160-161.

8. **Алексеев, А.А.** Молекулярное моделирование, синтез и оценка биологической активности новых антагонистов GPIIb/IIIa рецепторов тромбоцитов / **А.А. Алексеев**, М.И. Брылев, В.Л. Королев, Д.С. Лоторев, А.Ю. Лизунов, Е.А. Батуев, Л.А. Павлова // **Молекулярная медицина**. – 2013. – №5. – С. 61-63.

9. **Алексеев, А.А.** Синтез антитромботических пептидов / **А.А. Алексеев**, М.И. Брылев, В.Л. Королев, Д.С. Лоторев, А.Ю. Лизунов, Е.А. Батуев, Л.А. Павлова // **Вопросы медицинской, биологической и фармацевтической химии**. – 2014. – №6. – С. 22-25.

10. **Алексеев, А.А.** Разработка технологии получения лиофилизата гетеромерного пептида для приготовления раствора для инъекции. / **А.А. Алексеев**, Л.А. Павлова, В.Л. Королев // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2015. – №3 (12). – С. 72-79.

11. **Алексеев, А.А.** Математическое моделирование антитромботических пептидов / **А.А. Алексеев** // Сб. докл. III Всероссийской научной конференции с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – Санкт-Петербург. – 2013. – С. 4.

12. **Алексеев, А.А.** Разработка антитромботических пептидов / **А.А. Алексеев**, М.И. Брылев, В.Л. Королев, Д.С. Лоторев, Л.А. Павлова // Сб. докл. I Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновация в здоровье нации». – Санкт-Петербург. – 2013. – С. 83-84.

13. **Алексеев, А.А.** Новые гетеромерные пептиды с имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с'] дифуроксановым фрагментом – ингибиторы агрегации тромбоцитов / **А.А. Алексеев**, М.И. Брылев, В.Л. Королев, Д.С. Лоторев, А.Ю. Лизунов, Н.И. Зайцева, Л.А. Павлова, В.П. Ившин // Сб. докл. научно-практической конференции «Новые химико-фармацевтические технологии». – Москва. – 2014. – С. 143-145.

14. **Алексеев, А.А.** Математическое моделирование новых антитромботических гетеромерных соединений на основе N-карбоксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана и пентапептидов / **А.А. Алексеев** // Сб. докл. Всероссийской медико-биологической научной конференции молодых ученых «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (XVII Всероссийская конференция «Человек и его здоровье»). – Санкт-Петербург. – 2014. – С. 14-15.

15. **Алексеев, А.А.** Разработка новых антиагрегационных гетеромерных пептидов с имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксановым фрагментом / **А.А. Алексеев**, М.И. Брылев, В.Л. Королев, Д.С. Лоторев, А.Ю. Лизунов, Л.А. Павлова, В.П. Ившин, О.Ю. Домашева // **Бутлеровские сообщения**. – 2014. – Т.38. №4. – С. 16-19.

16. Патент 2544547 Российская Федерация, МПК C07D 498/14. N-карбоксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксан / В.Л. Королев, В.В. Топоров, В.М. Даниленко, В.П. Ившин, **А.А. Алексеев**, Л.А. Павлова; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. – №2014105524/04; заявл. 17.02.2014; опубл. 20.03.2015, Бюл. №8. – 4 с.: ил.

17. **Алексеев, А.А.** Разработка технологии получения готовых лекарственных форм гетеромерного пептида / **А.А. Алексеев**, Л.А. Павлова, В.Л. Королев, Д.С. Лоторев // **Современные проблемы науки и образования**. – 2015. – №1. – Режим доступа: <http://science-education.ru/125-19778>

18. Патент 2549355 Российская Федерация, МПК C07D 498/14, A61K 31/4245, A61P 7/02N-карб(аргинил)оксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксан, ингибирующий агрегацию тромбоцитов / **А.А. Алексеев**, М.И. Брылев, В.Л. Королев, Д.С. Лоторев, Е.А. Батуев, Л.А. Павлова; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. – №2014105523/04; заявл. 17.02.2014; опубл. 27.04.2015, Бюл. №12. – 7 с.: ил.

19. Патент 2550223 Российская Федерация, МПК C07K 7/06, C07D 498/14, A61K 38/08, 31/4245, A61P 7/02. Гетеромерные пептиды на основе имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана, ингибирующие агрегацию тромбоцитов / В.Л. Королев, В.В. Топоров, В.М. Даниленко, В.П. Ившин, **А.А. Алексеев**, Л.А. Павлова; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. – №2014116844/04; заявл. 28.04.2014; опубл. 10.05.2015, Бюл. №13. – 9 с.: ил.