

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Тольяттинский государственный университет»

Институт химии и энергетики

(наименование института полностью)

Центр медицинской химии

(наименование)

04.03.01 Химия

(код и наименование направления подготовки, специальности)

Медицинская и фармацевтическая химия

(направленность (профиль) / специализация)

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
(БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА)**

на тему Определение липофильности ингибиторов карбоангидразы

Студент

М.И. Давлатмуродова

(И.О. Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

к.б.н., Д.А. Хоченков

(ученая степень, звание, И.О. Фамилия)

Консультант

к.х.н., О.Б. Григорьева

(ученая степень, звание, И.О. Фамилия)

Аннотация

Данная исследовательская работа изложена на 46 страницах, содержит 9 рисунков, 7 таблиц. В ходе литературной проработки был изучен 41 литературный источник.

Объектами исследования в работе являются производных тетрагидроизохиналинов, которые могут обладать различной биологической активностью, в том числе они могут быть использованы в качестве ингибиторов киназ. В связи с пероральным способом приема, важной характеристикой при разработке ингибиторов является значение липофильности.

Дипломная работа содержит пояснительную записку, три основные части, содержащие 46 страниц, 9 рисунков, 8 таблиц, список из 41 литературных источников, 39 из которых являются иностранными.

Первая часть описывает основные понятия липофильности как одной из составляющих правил Липинского. Обобщены основные методы экспериментального определения липофильности, а также рассмотрен принцип использования правил Липинского в дизайне ингибиторов киназ.

Вторая часть описывает методики определения коэффициента распределения методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, расчёта факторов удерживания исследуемых объектов, вычисления теоретических значений липофильных свойств через программное обеспечение ChemDraw.

Третья часть содержит анализ полученных результатов в ходе экспериментов, сопоставления экспериментально полученных и расчетных значений гидрофобности.

Основываясь на полученных данных, можно сделать вывод: Сопоставление ингибирующей активности по отношению к СА II, СА IX и СА XII рассмотренных соединений с параметрами гидрофобности показывает, что наблюдается закономерность в увеличении ингибирующей способности для соединений с более высокими параметрами гидрофобности.

Abstract

The title of the graduation work is Determination of lipophilicity of carbonic anhydrase inhibitors.

The graduation work consists of an explanatory note, three parts on 46 pages, 9 figures, 8 tables, the list of 41 references including foreign sources.

The aim of this work is to determine experimental values of lipophilicity of tetrahydroisoquinoline derivatives.

The object of the senior thesis is derivatives tetrahydroisoquinoline, which can have various biological activities. They can be used as inhibitors of kinases. An important characteristic in the development of inhibitors is the importance of lipophilicity.

The first part describes in details the base of lipophilicity as one of the components of Lipinski's rules. The main methods for the experimental determination of lipophilicity are summarized, and the principle of using Lipinski's rules in the design of kinase inhibitors are considered.

The second part considers the methods determination of the partition coefficient $\log P$ involves method-phase HPLC, calculation of parameters of base objects, calculation of theoretical values of lipophilic properties through ChemDraw products.

The third part deals with results obtained during experiments, comparison of experimentally obtained and calculated values of hydrophobicity

Based on the data obtained, it can be concluded that comparison of inhibitory activity in suspected CA II, CA IX and CA XII appears in combination with hydrophobicity parameters. The inhibitory dependence of properties on the structures and properties of molecules is more complex and multifactorial and requires more experimental data.

Перечень условных сокращений

ADMET – адсорбция, распределение, метаболизм, экскреция, токсичность;

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

ЖХ-МС – жидкостная хроматография в тандеме с масс-спектрометром;

КА – карбоангидразы;

Содержание

Введение	6
1 Литературный обзор.....	7
1.1 Понятие липофильности (гидрофобности).....	7
1.2 Методы определения липофильности	9
1.2.1 Экспериментальное определение коэффициента распределения в системе «н-октанол – вода».....	9
1.2.2 Хроматографические методы в оценке гидрофобности	10
1.2.3 Расчетные способы определения липофильности.....	13
1.3 Карбоангидраза и её биологическая роль	18
1.4 Ингибиторы карбоангидразы	20
2 Экспериментальная часть	29
2.1 Реагенты и оборудование.....	29
2.2 Объекты исследования.....	29
2.3 Методика проведения эксперимента	30
3 Обсуждение результатов.....	32
Список используемой литературы	41

Введение

Разработка новых кандидатов в лекарственные препараты - очень дорогостоящий процесс, требующий времени и усилий. Следовательно, существует острая необходимость в разработке новых методов, способных быстро и более точно предсказывать важные фармакокинетические свойства лекарств перед их синтезом. Постоянная потребность в новых и улучшенных лекарствах привела к внедрению множества новых технологий в фармацевтической промышленности.

Разработка ингибиторов карбоангидразы – перспективный метод для лечения многих заболеваний, например, рака груди, глаукомы, сахарного диабета и многих других. По этой причине в данном обзоре будут рассмотрены основные хроматографические методы, которые могут применяться для проведения лабораторных исследований ингибиторов карбоангидраз, таких как проницаемость, метаболическая стабильность, коэффициент распределения.

Цель работы: определение экспериментальных значений липофильности для производных тетрагидроизохинолинов

Задачи работы:

1. Снять УФ-спектры исследуемых соединений
2. Определить факторы удерживания при различном соотношении метанол-вода
3. По уравнению для расчета гидрофобности рассчитать эти значения для анализируемых соединений.
4. Сопоставить полученные экспериментальные значения с рассчитанными квантово-химическим методом
5. Исследовать возможные корреляции липофильности с ингибирующей способностью тетрагидроизохинолинов

1 Литературный обзор

1.1 Понятие липофильности (гидрофобности).

Липофильность – проявление родства органических веществ к жирам, растительным маслам – является по сути синонимом гидрофобности. Величина, определяемая экспериментально, также может быть рассчитана с помощью табличных данных.

Основные особенности липофильности:

– физико-химическое свойство, характеризует способность химического соединения растворяться в жирах, маслах, липидах и неполярных растворителях, например, в толуоле или гексане.

– имеет принципиальное значение при разработке лекарств. Это свойство влияет на фармацевтическое, фармакодинамическое поведение вещества.

– отражает сродство молекулы или её фрагмента с липофильной средой. Для некоторых веществ именно наличие этого свойства является необходимым условием проявления фармакологической активности.

– является продолжением гидрофобного эффекта и включает в себя взаимодействия растворенного вещества и растворителя, которые способствуют распределению растворенного вещества между водой и органическим растворителем.

Непременным компонентом рационального дизайна лекарств является изучение фармакокинетики потенциальных лекарств на основе параметров ADME/Tox. Эти физико – химические и физиологические показатели характеризуют абсорбцию (absorption), распределение (distribution), метаболизм (metabolism), выделение (excretion) и токсичность (toxicity) [1-2].

- эффективная проницаемость в тонкой кишке человека;
- проницаемость через кожу;
- липофильность;
- растворимость в воде;

- проницаемость через гематоэнцефалический барьер.
- связывание с белками плазмы крови и некоторые другие [3].

Среди физико-химических показателей особое внимание уделяется таким параметрам как логарифмический коэффициент распределения между октанолом и водой ($\log P$), являющийся показателем липофильности вещества, и логарифмический коэффициент растворимости вещества в воде ($\log S$).

Именно липофильность и растворимость определяют способность вещества проходить через мембрану и, соответственно, проникать внутрь клетки, следовательно, являются определяющими для предсказания биодоступности препарата [4-5].

Экспериментальное значение коэффициента липофильности чаще всего определяется с помощью стандартной системы н-октанол – вода. Соотношение растворимости вещества в органическом и водном слоях имеет название парциального коэффициента (P). Этот коэффициент характеризует родство молекулы к липидной фазе по сравнению с водной и является количественной характеристикой липофильности [6].

После того, как С. Hansch обнаружил корреляцию между биологической активностью вещества и константой его распределения в системе н-октанол-вода (P_o/w), значения $\log P_o/w$ стали использоваться как параметр липофильности.

С ростом липофильности биологически активных веществ происходит их накопление в жировых тканях организма, уменьшается растворимость в воде, растет скорость проникновения вещества через кожу и увеличивается мера связывания их с белками плазмы крови [6-7].

Статистически установлено, что основные физико-химические параметры препаратов, в том числе показатели ADME, находятся в допустимых пределах значений

Допустимые значения таких физико-химических показателей, как $\log P$, молекулярная масса, число атомов, а также стабильность вещества

физиологическом растворе и отсутствие реакционноспособных химических групп [9]

Липофильность обычно описывается процессами распределения между двумя фазами – неполярной (органическая фаза) и полярной (в основном, водная). Количественная характеристика липофильности – коэффициент распределения P – определяется как отношение концентраций нейтрального соединения в органическом ($C_{\text{орг}}$) и водном ($C_{\text{водн}}$) растворах в равновесных условиях.

$$P = \frac{C_{\text{орг}}}{C_{\text{вод}}} \quad (1)$$

Как правило, коэффициент распределения выражается в логарифмическом виде ($\log P$). Чаще всего указывается как $\log P$, $\log K$, $\log D$, часто с индексом O или W . $\log P$ обычно используется для обозначения любого коэффициента распределения и $\log K$ - любой константы равновесия. Также используется $\log D$, который выражает вклад всех нейтральных и ионизированных частиц, присутствующих при заданном pH. $\log P$ является компонентом правила Липински. Это эмпирическое правило, позволяющее оценить биодоступность химического соединения с определенным набором фармакологических и биологических активностей и его способность быть лекарственным средством. Правило сформулировал Кристофер А. Липински в 1997 году [10].

1.2 Методы определения липофильности

1.2.1 Экспериментальное определение коэффициента распределения в системе «н-октанол – вода»

Экспериментальное определение $\log P$ может происходить методом «shakeflask». Он заключается в растворении вещества в объеме н-октанола и

воды и последующем измерении концентрации растворенного вещества в каждом из растворителей [11]. Наиболее распространенным методом измерения распределения растворенного вещества между фазами является спектрофотометрический метод. Минусом является то, что этот метод считается весьма трудоемким и дорогостоящим. Кроме того, необходимо полное разделение слоев, так как любая капля октанола в водной фазе может содержать большое количество образца. Измерения должны быть проведены при концентрациях ниже водного предела растворимости.

Ускоренный метод экспериментального определения коэффициента распределения основан на использовании высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). При этом $\log P$ исследуемого вещества находится путем сопоставления его времени удерживания с временами удерживания схожих соединений, значения $\log P$ которых уже известны из литературных источников или баз данных [12].

1.2.2 Хроматографические методы в оценке гидрофобности

Поскольку на ранних этапах разработки фармацевтических препаратов упор делается на высокопроизводительные измерения и универсальность методов для работы с различными соединениями, в последние годы были разработаны альтернативные подходы к определению липофильности, направленные на обеспечение более быстрого и удобного для пользователя подхода.

Появившаяся не так давно новая методика измерения липофильных свойств соединений на основе ВЭЖХ, позволяет определить коэффициент распределения $\log P$ соединений с различной молекулярной структурой в интервале $\log P$ от 1.5 до 7, что превосходит возможность «классического» определения величин на несколько порядков [13].

Установлено, что модифицирование мобильной фазы метанолом делает более приближенными показатели $\log k_w$ к имитации параметра коэффициента распределения $\log P$. Было предложено объяснение такого явления увеличением концентрации метанола на поверхности неподвижной

фазы (адсорбция) и воздействием на ход удерживания, определяющим взаимодействие ВЭЖХ.

1.2.2.1 Высокоэффективная жидкостная хроматография

Высокоэффективная жидкостная хроматография – методика проведения анализа и разделения достаточно сложных соединений, где подвижной фазой является жидкость. Подвижная фаза выполняет различные функции в ЖХ: 1) осуществляет перенесение поглощённых веществ, покинувших поверхность фазы (десорбированных молекул) по колонке; 2) устанавливает баланс между константами равновесия, а также удерживания в процессе взаимодействия неподвижной фазы с частицами разделяемых соединений [13].

Основным методом для определения ADMET-характеристик является ВЭЖХ. В последнее время производительность анализа была значительно увеличена за счет сокращения времени выполнения ВЭЖХ. Образцы можно анализировать по одному или в виде смесей всего за 30 секунд на образец. Такие быстрые анализы достигаются с использованием коротких хроматографических колонок (2.1×20 мм; размер частиц 3 или 5 мкм) [14].

В работе Караукса и коллег описан метод синтеза ингибиторов карбоангидраз, которые представляют собой различные замещенные производные первичных сульфонамидов. Для всех полученных соединений были определены ADMET-характеристики. Связывание синтезированных ингибиторов с альбумином сыворотки человека определяли хроматографическим методом. Характеристики связывания белков оценивали путем корреляции их хроматографических времен удерживания на колонке с иммобилизованным человеческим сывороточным альбумином (HSA) с временами удерживания ряда стандартных соединений с известными свойствами связывания с белками. Используемый метод представляет собой метод градиентной ВЭЖХ. Хроматографическое удерживание оценивалось с использованием колонки «ChromTech Chiral HSA» (3,0 мм×50 мм, 5 мкм) с подвижной фазой, содержащей смесь водного раствора ацетата аммония (pH

= 7.4) и пропанола-2 [15].

В работе Новака описаны методы синтеза ингибиторов карбоангидраз, которые помогают при глаукоме. Для определения метаболической стабильности авторы использовали метод ВЭЖХ. Исследуемый образец растворяли в ДМСО и добавляли к микросомам печени человека. Полученную реакционную массу инкубировали в течении заданного времени при температуре 37 °С. Реакцию останавливали добавлением к смеси холодного ацетонитрила. Содержание метаболитов определяли хроматографическим анализом с использованием градиентного элюирования, при этом элюент I представлял собой чистый ацетонитрил, а элюент в водный раствор муравьиной кислоты (0,1%). Разработанные препараты показали плохие значения метаболической стабильности в клетках печени, поэтому авторы дорабатывают молекулярную структуру разработанных кандидатов [15].

Одной из важных характеристик ADMET является распределение. То есть после того, как лекарство попадает в системный кровоток, оно распределяется по тканям организма. Распределение лекарства в организме оценивается такой функцией как коэффициент распределения (LogD).

В своей работе Сэлмон также определил коэффициенты распределения для синтезированных лекарств-кандидатов. Коэффициенты распределения (Log D) были определены хроматографическим путем в ходе сравнения их времен удерживания с временами удерживания стандартных соединений с известными коэффициентами распределения. Данные были собраны с использованием прибора Waters 2795 HPLC с двухканальным УФ-анализатором Waters 2487. Подвижная фаза представляла собой водный буфер (ацетат аммония, pH = 7,4) и ацетонитрил с градиентом ацетонитрила от 0 до 100% в течение 10 минут. В качестве сравнения коэффициенты распределения были определены дополнительно по методу встряхивания, а также в программном обеспечении ChemDraw. Результаты для лучших кандидатов представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Коэффициенты распределения исследуемых соединений, найденные методом ВЭЖХ, методом встряхивания и в программном обеспечении ChemDraw

Соединение	LogD (определяли методом ВЭЖХ)	LogD (определяли методом встряхивания)	LogD (определяли в программном обеспечении ChemDraw)
1	2.9	2.9	2.8
2	2.9	3.0	2.8
3	2.3	2.4	2.5

Как видно из данных таблицы, коэффициента распределения, найденные, различными методами хорошо коррелируют между собой. Но, авторы отмечают, что использование метода ВЭЖХ в данном эксперименте позволяет экономить время на анализ [17].

1.2.3 Расчетные способы определения липофильности

Значение $\log P$ рассчитывается как практически, так и теоретически с применением специальных программ, например, ACD/LogP и Instant JChem [16,17]. Точность расчета значений $\log P$ и $\log S$ чрезвычайно важна при разработке лекарственных препаратов.

В процессе поиска лекарственных соединений (и последующей разработки лекарственных препаратов) возникает насущная потребность проверки свойств большого количества (сот тысяч) соединений, поэтому экспериментальная оценка физико-химических параметров ADME для такой выборки является чрезвычайно ресурсной и время затратной

Учитывая это, исследователи все большее внимание уделяют разработке компьютерных методов расчета (оценки) физико-химических свойств соединений, по которым можно предусматривать ADME/Tox свойства кандидатов на лекарственные средства [18].

Это значительно ускоряет и удешевляет процесс разработки лекарственных препаратов.

Все методы расчета $\log P/S$ делятся на две большие группы:

– первая — методы, основанные на анализе подструктур, входящих в

состав молекулы (substructure based methods),

– вторая группа методов основана на определенных свойствах исследуемых соединений (property based методов).

Методы анализа подструктур в свою очередь делятся на фрагментные и атомные в зависимости от того, подструктуры какого уровня (химические группы или отдельные атомы) рассматриваются в исследуемой молекуле.

Окончательное значение $\log P$ рассчитывается путем суммирования вкладов отдельных подструктур [19]. Используются также комбинированные атом – фрагментные подходы.

Методы, основывающиеся на свойствах молекул, также делятся на три большие группы: методы, основанные на эмпирических данных, методы, использующие особенности пространственной структуры молекулы, и методы, которые основываются на использовании топологических дескрипторов [19]. Вангом и коллеги [20] разработали методы расчета коэффициента распределения октанол/вода, XLOGP3 и XLOGP2. Эти подходы называются атомарными методами.

Значение $\log P$ получается в качестве суммы двух компонентов. Первый – вклад в $\log P$ различных групп и атомов, второй – сумма коррекционных факторов:

$$\log P = \sum_i a_i A_i + \sum_j b_j B_j, \quad (2)$$

где A_i – вклад определенного атома;

a_i – количество их атомов;

B_j – вклад определенного корректирующего коэффициента;

b_j – количество j – х атомов.

Коэффициенты получают путем построения многомерной регрессивной модели для большого количества органических соединений. XLOGP3 является следующим поколением метода XLOGP2 и имеет принципиальное отличие от предшественника.

В XLOGP3 в качестве отправной точки для расчета используют схожую молекулу с уже известным значением $\log P$. Соответственно значение известной молекулы $\log P_0$ к уровню является:

$$\log P_0 = \sum_i a_i A_i + \sum_j b_j B_j \quad (3)$$

Чтобы рассчитать $\log P$ неизвестной молекулы по методу XLOGP3, необходимо вычесть формулу 5 из формулы 4 [20]

$$\log P = \log P_0 + \sum_i a_i (A_i A_i) + \sum_j b_j (B_j B_j) \quad (4)$$

Мейлан и Говард разработали комбинированный атом - фрагментный (atom/fragment contribution, AFC) метод оценки $\log P$, KOWWIN. основанный на использовании множественной линейной регрессии и известных достоверных значений $\log P$.

Тренировочный сет состоял из 2473 преимущественно простых веществ, тогда как валидационная выборка составляла 10589 соединений простого, сложного и комплексного строения. Модель содержит 150 типов атомов и 250 типов корректирующих факторов, которые и определяют суммарное значение $\log P$ [21].

Регрессии строили в два последовательных этапа. В первой регрессии рассчитывали корреляцию между значениями атом - фрагментных взносов и соответствующими значениями $\log P$, во второй - между корректирующими факторами и $\log P$. Расчет $\log P$ проводили простым суммированием атом - фрагментного вклада и вклада корректирующих факторов, содержащихся в структуре молекулы.

Кроме того, простые фрагменты комбинировали между собой во избежание ситуации, когда нет значения элементарного фрагмента для расчета $\log P$ молекулы.

Формула для расчета методом KOWWIN:

$$\log P = \sum(f_i n_i) + \sum(c_j n_j) + 0.229, \quad (5)$$

где f_i — вклад соответствующего атома – фрагмента;

c_j — вклад соответствующего корректирующего фактора;

n_i, n_j — количество соответствующих значений атом-фрагментного вклада и корректирующих факторов;

0,229 — выводимая регрессией константа.

Метод KOWWIN разработан для расчета $\log P$ органических, кремнийорганических соединений и некоторых солей органических молекул с использованием соответствующих инструментальных значений. Экспериментальные значения для неорганических соединений не использовали [22].

Метод расчета $\log P$, предложенный специалистами компании «ChemAxon» (www.chemaxon.com), является комбинированным атом-фрагментным подходом.

Каждому атому и фрагменту опытной молекулы присваивается определенный тип. Атомные взносы соответствуют модифицированным типам атомов, предложенным Вышвандханом и соавторами [22].

Модификации в основном касаются атомов с делокализованной электронной плотностью, а также определенных ионных форм. Вклады отдельных фрагментов и функциональных групп учитываются по Хлопману [23].

Окончательное значение $\log P$ рассчитывается как сумма вкладов отдельных атомов и фрагментов, представленных в молекуле. В более новых версиях JCHEM используют «trainable $\log P$ », где пользователь может сам выбрать выборку, по которой будут рассчитываться значения $\log P$, что может значительно улучшить точность метода. Пользователь может, как выбирать из готовых выборок, так и создавать свои выборки.

Метод ALOGPS, разработанный Тетко и соавторами с использованием

ассоциативной нейронной сети (associative neural network), относится к так называемым электротопологическим и сочетает в себе подходы для расчета коэффициента распределения октанол/вода $\log P$ коэффициента растворимости в воде $\log S$ [24].

Авторами показано, что для корректного моделирования $\log P$ и $\log S$ важно учитывать молекулярную массу. Дополнительно к молекулярной массе введены два простых параметра – количество атомов водорода и количество тяжелых атомов. Важными входными данными для программы являются электротопологические индексы атомов и связей [25].

Индексы рассчитываются из входного формата SMILES. Для расчета $\log P$ использовали 75 электротопологических индексов и принимали 64 нейронные сети. Последующая генерация методов ALOGPS, реализованная на веб - портале Ochem (далее — методы OCHEM) [26], также позволяет оценивать как показатели $\log P$, так и показатели $\log S$ для опытных соединений.

При большом разнообразии методов и подходов, применяемых к вычислению параметров липофильности и растворимости, возникает проблема в выборе оптимального метода расчета, поскольку существующие методы оценивают величины $\log P$ и $\log S$ с определенным расхождением, хотя при этом статистически достоверны на больших выборках веществ.

Кроме того, существует проблема границ применения тех или иных методов вычисления $\log P/S$ — практически каждый из разработанных подходов не срабатывает на определенных веществах/классах веществ.

Авторы [28] в своей работе провели анализ расчетных методов определения $\log P$ и $\log S$ и оценили их согласование с экспериментальными данными для существующих лекарственных препаратов, тем самым установив границы применения этих методов.

1.3 Карбоангидраза и её биологическая роль

Карбоангидразы (СА) катализируют гидратацию диоксида углерода до бикарбонат-иона и протонов. Они образуют семейство металлсодержащих ферментов и могут быть обнаружены у бактерий и эукариот. Карбоангидраза человека входит в класс α -карбоангидразы. Реакция, катализируемая карбоангидразами, участвует во многих важных процессах: газообмен, транспорт CO_2 и бикарбонат-иона между метаболизирующими тканями и легкими, биосинтетические реакции в глюконеогенезе, липогенезе [29].

Пока что на данный момент изучены семь классов карбоангидраз – α , β , γ , δ , ζ , η , θ . Классы разделяются благодаря их свойствам: трехмерной структуры, аминокислотной последовательности белков, каталитической функции и строения активного сайта. 1 класс α -карбоангидраза обычно находится у млекопитающих, 2 класс β -карбоангидраза - чаще всего у бактерий и растений, и, наконец, 3 класс γ -карбоангидраза, которая находится у архей в глубинах океана, и в горячих источниках. Остальные же классы мало изучены и не представляют нам интереса. Главная функция фермента у млекопитающих состоит во взаимном преобразовании бикарбоната и углекислого газа для сохранения кислотно-щелочного баланса (рН) в крови и в других тканях, а также для ускорения реакции транспортировки углекислого газа из тканей [29]. Структура карбоангидразы показана на рисунке 1.

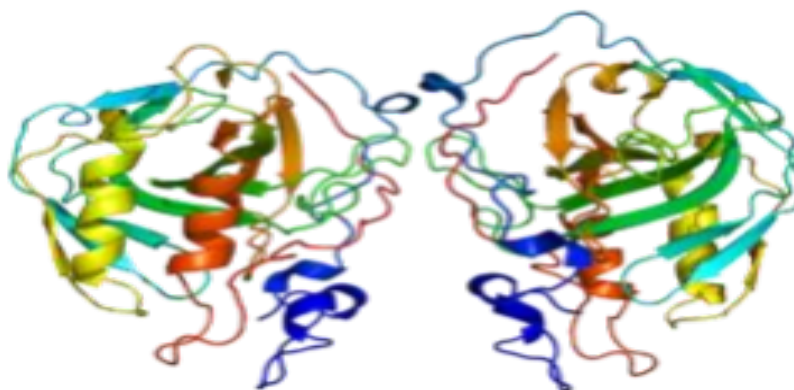


Рисунок 1 – Структура карбоангидразы

Все карбоангидразы клеток млекопитающих принадлежат к α -карбоангидразам, которые делят на 4 подкласса, в которые входят по меньшей мере 14 изоформ

- цитозольные (I, II, III, VII и XIII);
- митохондриальные (VA и VB);
- мембрано-ассоциированные (IV, IX, XII, XIV и XV);
- секретированная карбоангидраза (VI).

Среди этих изоформ есть такие, которые еще называют «акаталитическими» карбоангидразами (VIII, X, и XI), функция которых остается неизвестной. По данным разных авторов [30]-[31], в клетках слюнных желез млекопитающих экспрессируются 8 изоформ карбоангидраз: I, II, III, IV, VI, VII, VIII, IX, XII и VB.

Многие из карбоангидраз, участвующих в этих процессах, являются важными терапевтическими мишенями. Когда связанные с опухолью СА ингибируются, рост первичных опухолей и метастаз блокируется. Также уменьшается популяция раковых стволовых клеток. Нацеливание на каталитическую активность карбоангидраз на клеточной поверхности было и продолжает считаться многообещающим терапевтическим подходом в области противоопухолевых препаратов, либо для подавления роста опухоли, либо для преодоления лекарственной устойчивости раковых клеток. Таким образом, этот класс ингибиторов ферментов оказывает благоприятное противораковое действие [32].

СА II, которая является физиологически преобладающей изоформой карбоангидраз, обнаруживается в эритроцитах и многих других тканях, и ее ингибиторы нашли широкий спектр медицинских применений в качестве диуретиков, противоглаукомных и противосудорожных средств [33]. Однако ингибиторы СА, которые использовались до сих пор, не были достаточно безопасными соединениями. Они плохо выводятся из организма человека. Например, коммерчески доступные ингибиторы СА II, такие как

ацетазоламид (AZA), метазоламид (MZA) и этоксзоламид (EZA), являются сильными ингибиторами, но не специфичны. Эти соединения не только ингибируют ферменты СА II, но и другие изоферменты, и в результате этого могут наблюдаться различные побочные эффекты, такие как сонливость, пожелтение, депрессия, усталость, потеря веса, желудочно-кишечные расстройства, метаболический ацидоз, миопия. Топирамат как другой ингибитор СА II также имеет очень слабую эффективность [34]. Все эти ситуации побуждают исследователей разрабатывать новые ингибиторы с улучшенными ADMET-характеристиками.

1.4 Ингибиторы карбоангидразы

Ингибиторы карбоангидразы — это класс терапевтических препаратов, которые подавляют деятельность карбоангидразы. Было изучено, их использование на человеке для лечения глаукомы глаз, горной болезни, желудочный дуоденальный язвы, идиопатической внутричерепной гипертензии, неврологического расстройства и остеопороза. Существует два главных класса ингибиторов СА: металл-комплексообразующие анионы и незамещенные сульфонамиды и их производные, которые соединяются с ионом цинка этого фермента или путем присоединения к металлической координационной сфере, или путем замещения небелкового цинкового лиганда [35]. Но большой существенной проблемой при разработке этих ингибиторов является большое число их изоферментов, разбросанная локализация в тканях и отсутствие какой-либо селективности к изоферментам у известных нам ингибиторов.

Все шесть классических ингибиторов карбоангидразы (дихлорфенамид, метазоламид, этоксзоламид, дорзоламид, ацетазоламид и дихлорфенамид), используемые в клинической практике или в роли средств диагностики, показывают различные ингибирующие свойства в отношении роста опухолевых клеток

Классическими ингибиторами данного вида являются первичными сульфаниламидами, имеющими формулу RSO_2NH_2 - они используются в клинической практике уже более 50 лет в качестве диуретиков и системно-действующих антиглаукомных препаратов. На рынке существует на данный момент около 30 клинически используемых препаратов (или находящиеся в клинической разработке), которые принадлежат к классу сульфаниламидов или сульфаматов, которые проявляют значительную ингибирующую активность СА. Также, недавно выяснилось, что они обладают потенциалом в качестве противосудорожных, противовоспалительных, противоопухолевых, антипаиновых и противоифекционных препаратов [36].

Производные 1-5 (схема 1), селективно ингибирующие некоторые изоформы СА могут быть использованы и для ингибирования против изоформ XIII млекопитающих, а также могут быть использованы для структурно-ориентированного дизайна лекарств нового поколения, селективных к изоформам ингибиторов. Старые эффективные диуретики такие как -трихлорметиазид 1, хлорталидон 2, индапамид 3 и фуросемид 4, были обнаружены еще в 60-70-х годах, когда мало что было известно о различных изоформах СА, и считалось, что эти препараты существенно не взаимодействуют с САс млекопитающих [37].

А вот сульфаниламидные CAIS, такие как ацетазоламид, являются эффективными антиглаукомными агентами, но имеют ограниченное применение из-за многочисленных побочных эффектов, возникающих при ингибировании САс, - камни в почках. Местное дозирование в глаз CAIs возможно с водорастворимыми препаратами, такими как дорзоламид 6, и бринзоламид 7 совместно с β -блокаторами, такими как тимолол, ианалоги PGF 2 α , латанопрост и травопрост. Данные соединения широко используются для контроля динамики влажности и внутриглазного давления у пациентов с гипертонической глаукомой. Недавно был предложен другой подход для получения антиглаукомных CAIS - были получены гибридные молекулы, которые включают каркас дорзоламида 5, к которому прикреплены нитратные

эфиры, что приводит к соединениям типа **6** (схема 2) [38].

Схема 1

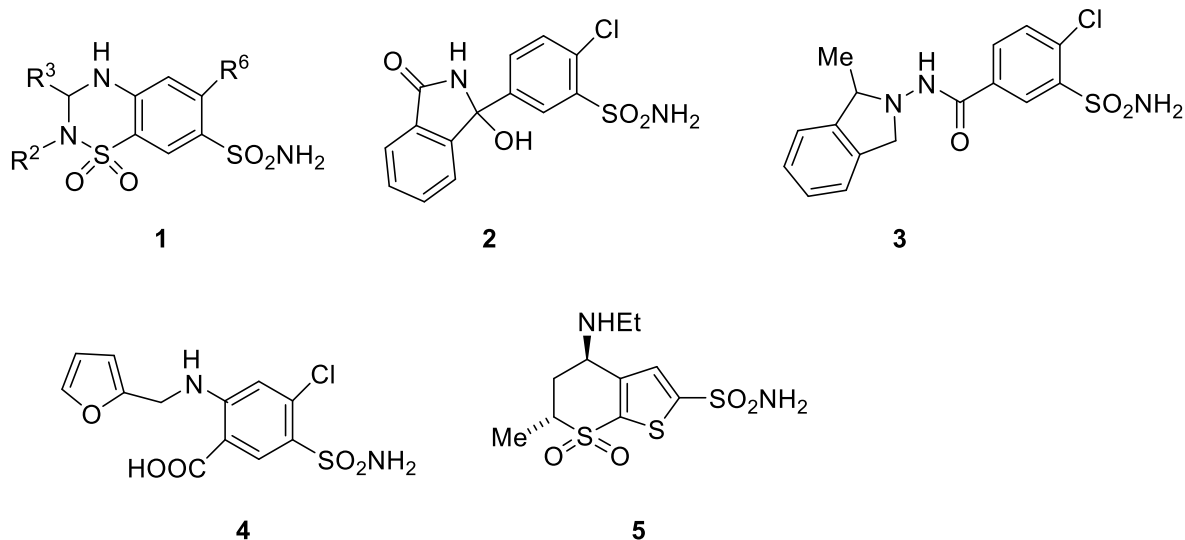
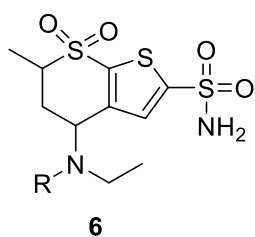


Схема 2

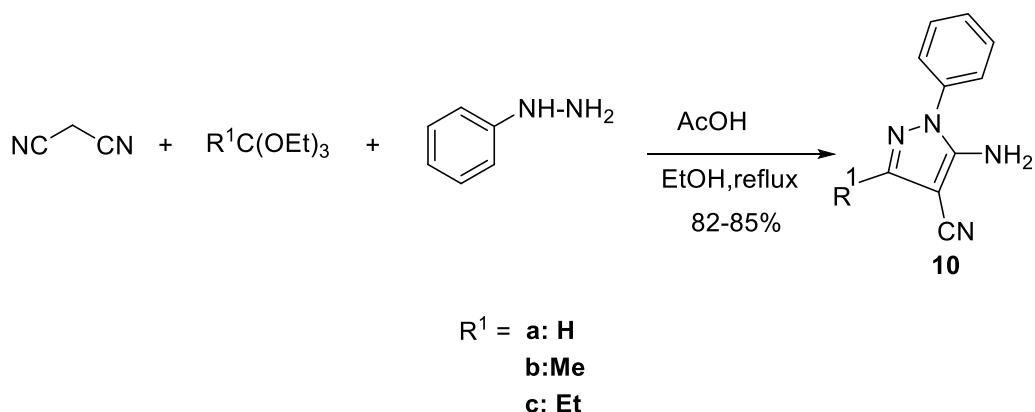


- a: R=CO(CH₂)₅ONO₂ (NCX274)
- b: R=CO-p-(C₆H₄)-CH₂ONO₂(NCX 265)
- c: R=COO(CH₂)₃ ONO₂ (NCX 278)
- d:R=COO(CH₂)₄ ONO₂(NCX 245)
- e:R=COOCH₂ CH(ONO₂)CH₂ONO₂ (NCX 201)

Allouche и др. предложили удобный способ получения замещенных 2-амино-3-цианопиразолов посредством реакции малонитрила **7** с ортоэфирами **8** и фенилгидразином **9** в кислых условиях. Несколько типов CAIS с гипотетически новым механизмом действия были успешно получены с использованием этого многокомпонентного подхода. В частности, реакция с участием фенилгидразинов **9** была реализована в этаноле при нагревании в присутствии уксусной кислоты в результате чего были получены *N*-фенилзамещенные аминоцианопиразолами **10** (схема 3). Ингибирующие

свойства этих соединений по отношению к карбоангидразе человека (*hCA*) затем оценивали с помощью классического анализа гидратации CO_2 с остановленным потоком

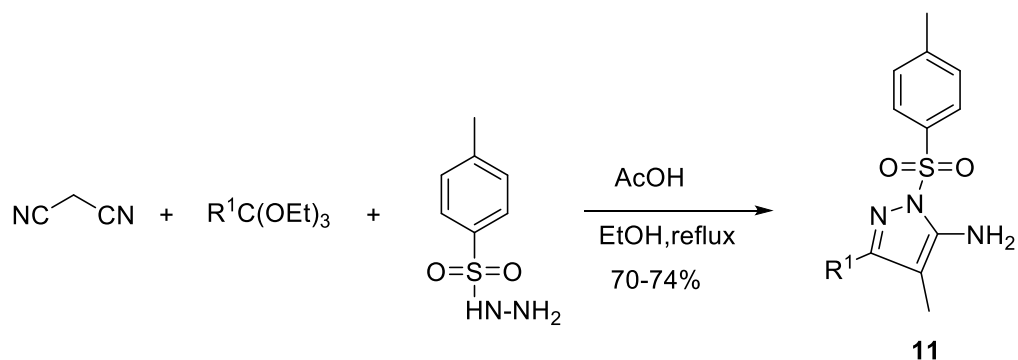
Схема 3



Также, аминоцианопиразолы **10** обладали микромолярной и субмикромолярной ингибирующей активностью в отношении цитозоли (*hCA* I и II) и трансмембран (*hCA* IX и XII). Авторы предположили, что соединение **10** связывается с ферментом аналогично недавно зарегистрированным ингибиторам полиаминового спермина, которые закрепляются на цинк-координированной молекуле воды. Однако механизм ингибирующего действия **10** должен быть подтвержден рентгеновской кристаллографией ингибитор-белковых комплексов.

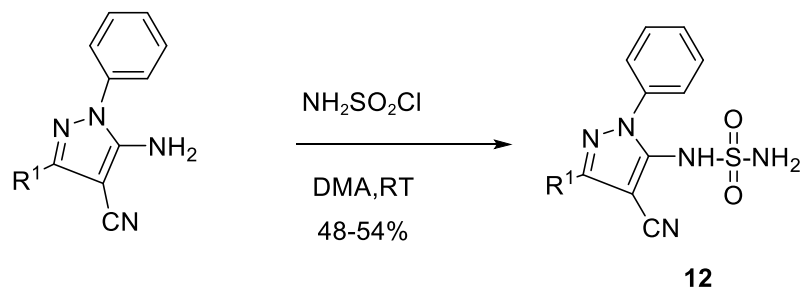
Кроме того, как было показано *Alp N*-сульфонилпиразолы, родственные соединению **10**, могут действовать как CAIs, взаимодействуя с сайтом связывания кумарина у входа в его сайт связывания. Этот способ действия был предложен для *N*-тозилзамещенных аминоцианопиразолов **11**, синтезированных аналогичной реакцией с участием тозилгидразина (схема 4).

Схема 4



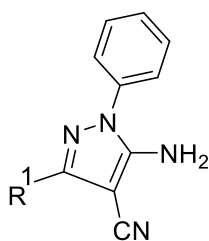
Производные *N*-сульфонамида **12**, полученные из **10** в результате реакции с сульфоилхлоридом (схема 5), ингибируют лекарственно значимые изоформы hCA, благодаря механизму связывания сульфонамида с ЦИНКОМ.

Схема 5

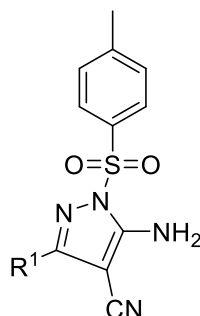


Было установлено, что значения K_i сульфаниламидных производных **6-4** находятся в низком наномолярном диапазоне. Лучшие представители каждого хемотипа ингибитора СА, полученные автором Allouche показаны на схеме 6.

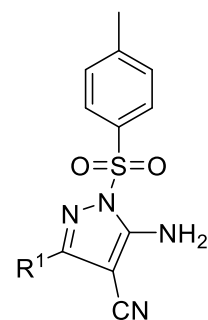
Схема 6



9.4 (hCA I)
5.3 7(hCA II)
0.27 (hCA IX)
0.44 (hCA XII)



3.1 (hCA I)
0.82 (hCA II)
0.47 (hCA IX)
0.15 (hCA XII)



0.080 (hCA I)
0.024 (hCA II)
0.010 (hCA IX)
0.010 (hCA XII)

Совсем недавно было опубликовано доказательство того, что мощные ингибиторы СА IX действительно могут проявлять противоопухолевые эффекты – используя мембранопроницаемые производные на основе ацетазоламидного каркаса, к которому были присоединены либо флуоресцеинкарбоновая кислота, либо альбумин связывающие фрагменты, они продемонстрировали сильную задержку опухоли у мышей с ксенотрансплантатами почечной линии ясенклеточного рака SK-RC-52 [39]

Рана и коллеги с помощью технологии фагового дисплея идентифицировали новый пептид со сродством к карбоангидразе IX человека. Целью их исследования было охарактеризовать сайт связывания пептида с карбоангидразой IX, чтобы в дальнейшем оптимизировать связывающие и метаболические свойства и использовать найденный белок в качестве ингибитора. В своей работе они определили метаболическую стабильность синтезированного пептида в микросомах печени человека и в сыворотке крови [40].

В работе Гренера описывается проблема, связанная с карбоангидразой IX. Карбоангидраза IX – трансмембранный фермент, который регулирует рН в гипоксических опухолях и способствует выживанию опухолевых клеток, что приводит к возникновению метастазов и летальному исходу. Авторы

разработали ряд эффективных ингибиторов, которые могут блокировать действие карбоангидразы IX. Для прогнозирования свойств данных ингибиторов в организме были определены некоторые ADMET-характеристики, такие как метаболическая стабильность в клетках печени и сыворотке крови человека [41].

Деятельность CA IX ориентирована на высокую необходимость клетки в нейтрализации его рН в кислой среде. Однако экспрессия фермента связана с разными физиологическими процессами и метаболическими путями, включая липогенез, глюконеогенез, уреогенез и костная резорбция ткани. Особенно важна роль этого фермента при регулировании рН в раковых клетках, подверженных воздействию ацидозу ткани, обусловленными метаболическими процессами продуктов гликолиза [40].

Роль гипоксии в опухолевых клетках является важным физиологическим аспектом для роста опухоли, из-за нее клетка выбирает либо умереть, либо приспособиться к таким условиям. Механизмы приспособления опухоли включают, способность сопротивляться ацидозу с помощью иных метаболических путей (окислительного фосфорилирования и активного анаэробного гликолиза). Так как в обычных клетках идет медленный гликолиз и окисление пирувата в митохондриях, где происходит потребления кислорода. Клетки опухоли даже при насыщенном количестве кислорода все равно используют не стандартные пути, все это называется эффектом Варбурга. Хотя гликолиз производит меньшее количество энергии в виде АТФ, чем окислительное фосфорилирование, этот процесс имеет важное значение для опухолевых клеток, так как из-за него начинает производиться нужная биомасса для их распространения. При гликолизе как лишний продукт реакции выделяется молочная кислота хоть ее и много также при этом образуется избыток протонов и CO_2 . Чтобы сохранить внутри клетки слабощелочной или нейтральный рН, необходимый для более эффективной реакции, а также ее выживаемости, опухолевые клетки развили транспортный механизм. Он делится на два главных пути: импорт бикарбоната и экспорт

молочной кислоты и протонов. Карбоангидраза IX является основным ферментом упрощения дыхания и получением всевозможных жидкостей организма, хотя существуют также другие физиологически важные изоферменты, такие как СА IV-VII и XII-XIV. Эти изоферменты осуществляют патогенез таких болезней, как отек, остеопетроз, глаукома, отказ почек и т. д. На самом деле, СА IX – уникальный металлофермент, он главным образом связан с опухолевыми клетками и редко находится в здоровых тканях. СА IX обширно встречается в разнообразных твердых опухолях и его присутствие в опухолевых клетках часто соотносится с агрессивной формой опухоли из-за сильной регуляции эффекта гипоксии [41].

Выводы по разделу:

– После почти двух десятилетий обширных исследований было обнаружено, что роль карбоангидраз в развитии рака и многих других заболеваниях сложнее, чем предполагалось изначально. Обилие экспериментальных данных демонстрирует окончательную зависимость экспрессии, сборки и активности КА от гипоксического микроокружения. Примечательно, что его прямая связь с опухолевой гипоксией и ацидозом микроокружающей среды, как было экспериментально доказано, способствует развитию стрессовых состояний, токсичных для нормальных клеток, но не для адаптируемых раковых клеток.

– Таким образом, КА представляют собой идеальную мишень для противоопухолевой терапии. Важно, чтобы новые соединения, которые будут использоваться в качестве ингибиторов карбоангидраз были селективны и обладали благоприятными свойствами абсорбции, распределения, метаболизма, экскреции и токсичности.

– В ходе проделанной поисковой работы было установлено, что наиболее эффективным методом для определения некоторых параметров является хроматография. Данный метод может быть использован для определения таких характеристик, как проницаемость, метаболическая стабильность в микросомах печени человека и в сыворотке крови,

липофильность. На сегодняшний день наиболее выигрышной комбинацией для анализа ингибиторов является высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометром в качестве детектора.

– Главными преимуществами хроматографических методов анализа является высокая производительность и эффективность, низкое потребление анализируемых веществ и универсальность. Даже не смотря на некоторое вытеснение хроматографических методов компьютерным моделированием и вычислением, благодаря своей точности, метод до сих пор пользуется спросом у многих исследователей для разработки лекарственных препаратов.

2 Экспериментальная часть

2.1 Реагенты и оборудование

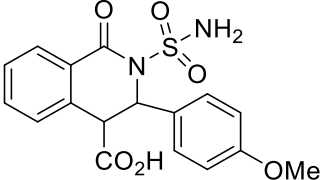
Реагенты использовались коммерчески доступные, без дополнительной очистки.

1. Жидкостный хроматограф фирмы Agilent Technologies 1220 Infinity LC;
2. Колонка хроматографическая ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (100x4.6 мм), с размером частиц 5 мкм;
3. Микрошприц Agilent объёмом 50 мкл;
4. Метанол для ОФ ВЭЖХ, 99.9 %;
5. Ультразвуковая ванна «Сапфир»;
6. Вода дистиллированная;
7. Нитрит натрия, х. ч.;

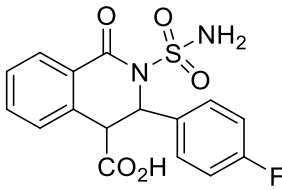
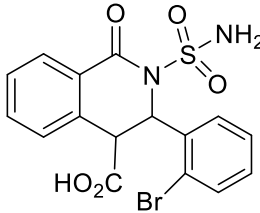
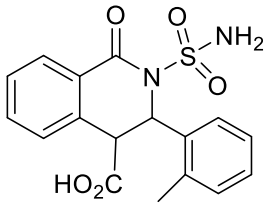
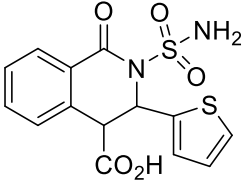
2.2 Объекты исследования

В качестве объектов исследования были взяты соединения КЕМ-455, КЕМ-466, КЕМ-467, КЕМ-469 и КЕМ-472, структура которых представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Характеристики исследуемых образцов.

Название	Код	Формула	Молекулярная масса, г/моль
1	2	3	4
3(-4-метоксифенил)-1-оксо-2-сульфамойл-1,2,3,4-тетрагидроизахинолин-4-карбоновая кислота	КЕМ-455		376,3909

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4
3(-4- фторфенил)-1-оксо-2-сульфамойл-1,2,3,4-тетрагидроизахинолин-4-карбоновая кислота	КЕМ-466		364,3548
3(-2- бромфенил)-1-оксо-2-сульфамойл-1,2,3,4-тетрагидроизахинолин-4-карбоновая кислота	КЕМ-467		425,2604
1-оксо -сульфамойл -3-(о-толил)- 1,2,3,4-тетрагидроизахинолин-4-карбоновая кислота	КЕМ-469		360,3915
1-оксо -сульфамойл -3-(тиофен-2-ил)- 1,2,3,4-тетрагидроизахинолин-4-карбоновая кислота	КЕМ-472		352,3901

2.3 Методика проведения эксперимента

Исследования проводили на жидкостном хроматографе фирмы Agilent Technologies 1220 Infinity LC с хроматографической колонкой (неподвижная фаза) Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 4,6 ×100 мм, размер частиц сорбента 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали смесь метанол – вода в различных соотношениях: 90 : 10, 80: 20, 75 : 25, 70 : 30, , 60 : 40 (об. %).

Опыты проводили при комнатной температуре, расход элюента составляет 1 мл/мин. Детектирование проводили при длине волн УФ – детектора, равной 200–260 нм.

В работе определены максимумы поглощения исследуемых соединений в УФ - области. Данные приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты хроматографических исследований

№ соединения	λ
КЕМ-455	280 нм
КЕМ-466	257 нм
КЕМ-467	259 нм
КЕМ-469	268 нм
КЕМ-472	260 нм

По экспериментальным данным был проведён расчёт факторов удерживания (k) исследуемых объектов и соответственно $\log k$. В качестве несорбирующегося вещества был использован нитрит натрия (NaNO_2).

Определение значения фактора удерживания

Фактор удерживания был рассчитан по формуле:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}, \quad (9)$$

где t_R – время удерживания исследуемых соединений, с;

t_M – время удерживания несорбирующегося соединения (NaNO_2), с.

Для каждого эталонного соединения и изучаемых соединений рассчитаны факторы удерживания k , а также $\log k$ при всех исследуемых соотношениях метанол–вода (таблица 4).

Таблица 4 – Рассчитанные величины логарифма от фактора удерживания для изучаемых соединений при различных соотношениях метанол-вода.

Исследуемое соединение	Значение $\log k$				
	(90:10)	(80:20)	(75:25)	(70:30)	(60:40)
КЕМ-455	-0.95±0.01	-0.76±0.01	-0.58±0.01	-0.55±0.01	-0.52±0.01
КЕМ-466	-1.15±0.02	-0.74±0.01	-0.63±0.01	-0.52±0.01	0.45±0.01
КЕМ-467	-1.09±0.01	-0.82±0.01	-0.79±0.01	-0.67±0.01	0.58±0.01
КЕМ-469	-1.39±0.01	0.95±0.01	-0.79±0.01	-0.69±0.02	0.60±0.02
КЕМ-472	-1.52±0.01	-1.95±0.01	-0.88±0.01	-0.79±0.02	-0.76±0.02

3 Обсуждение результатов

В литературном обзоре было показано, что для определения липофильности можно использовать хроматографический метод анализа. Метод основан на измерении времен удерживания стандартных соединений и исследуемых образцов. По полученным значениям времен удерживания стандартных веществ с известными значениями липофильности ранее было получено уравнение, связывающее фактор удерживания с $\log P$:

$$\log P_{o/w} = 0.8879 \log(k_0) + 0.6099, \quad (1)$$

где $\log P_{o/w}$ – логарифм коэффициента распределения вещества;

$\log k_0$ – логарифм фактора удерживания вещества.

Для исследуемых образцов КЕМ-455, КЕМ-466, КЕМ-467, КЕМ-469 и КЕМ-472 нами были построены графические зависимости $\log k$ от доли метанола в подвижной фазе. Полученные графики представлены на рисунках 2 - 6.

По найденным зависимостям для производные тетрагидроизохинолинов были найдены значения $\log k_0$. Найденные значения $\log k_0$ были подставлены в качестве переменных в ранее выведенное уравнение для расчета липофильности исследуемых соединений.

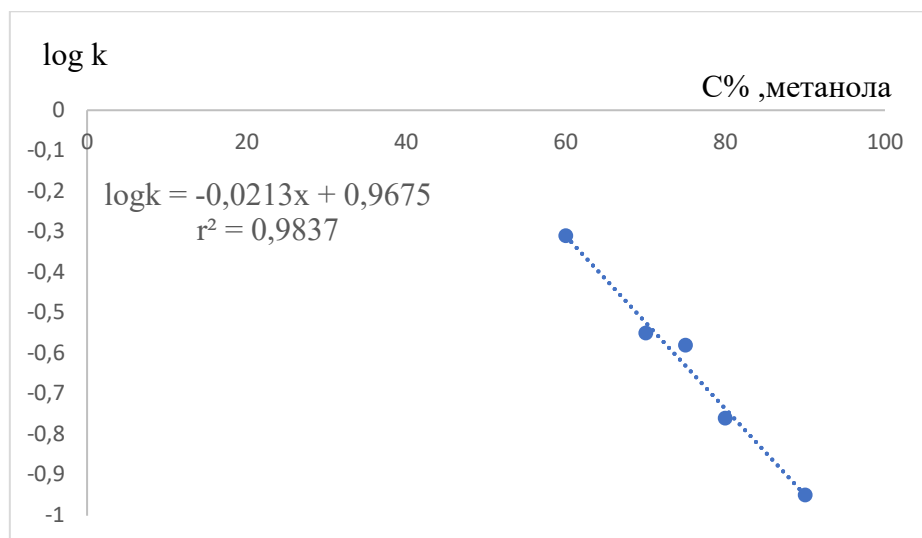


Рисунок 2 – Зависимость фактора удерживания КЕМ-455 от доли метанола в составе подвижной фазы

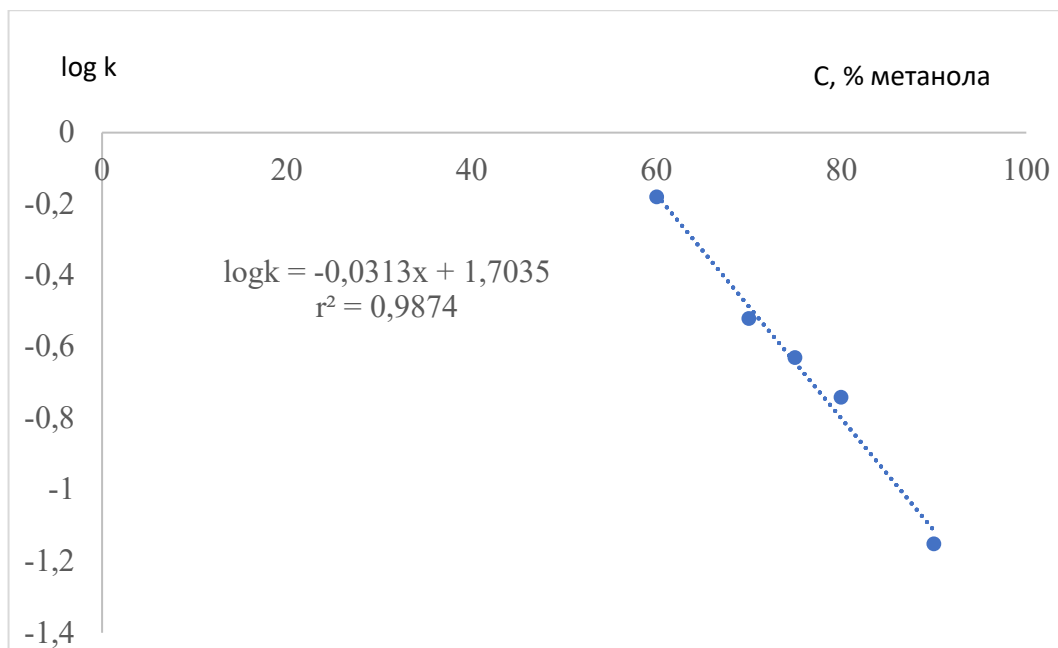


Рисунок 3 – Зависимость фактора КЕМ-466 метанола в составе подвижной фазы

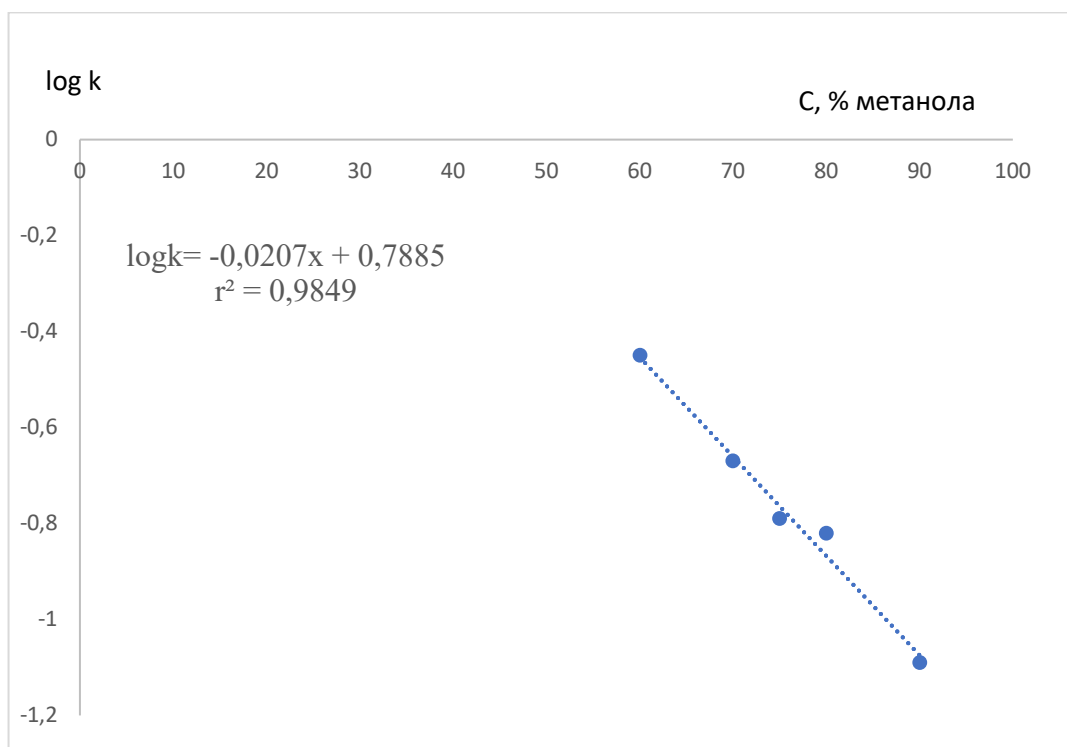


Рисунок 4 – Зависимость фактора КЕМ-467 метанола в составе подвижной фазы

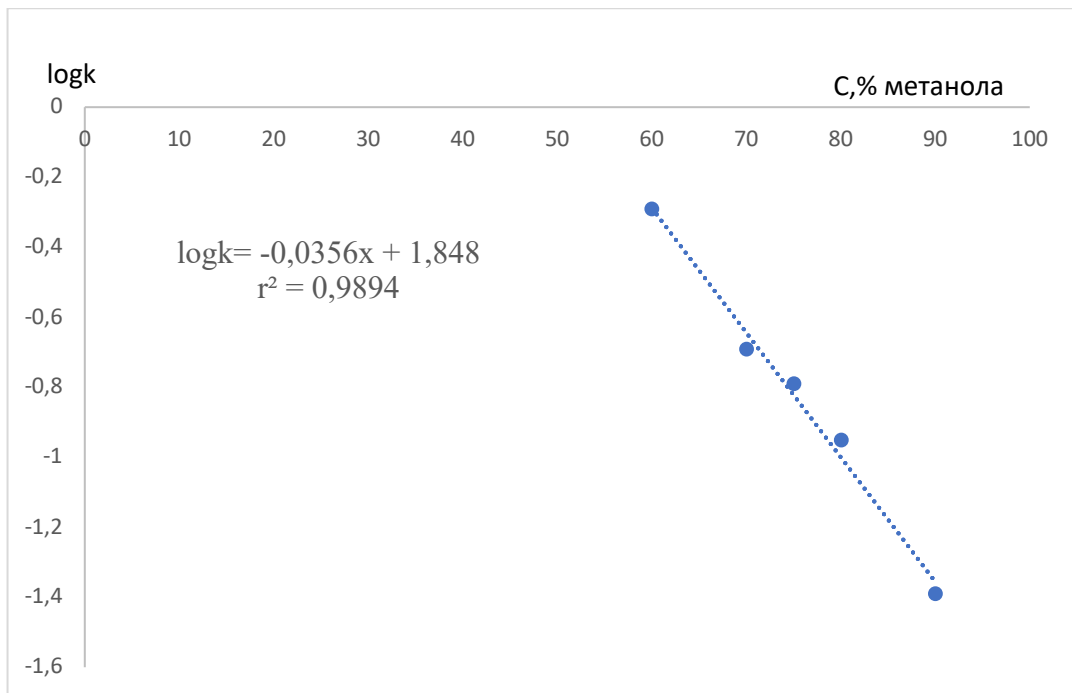


Рисунок 5 – Зависимость фактора КЕМ-469 метанола в составе подвижной фазы

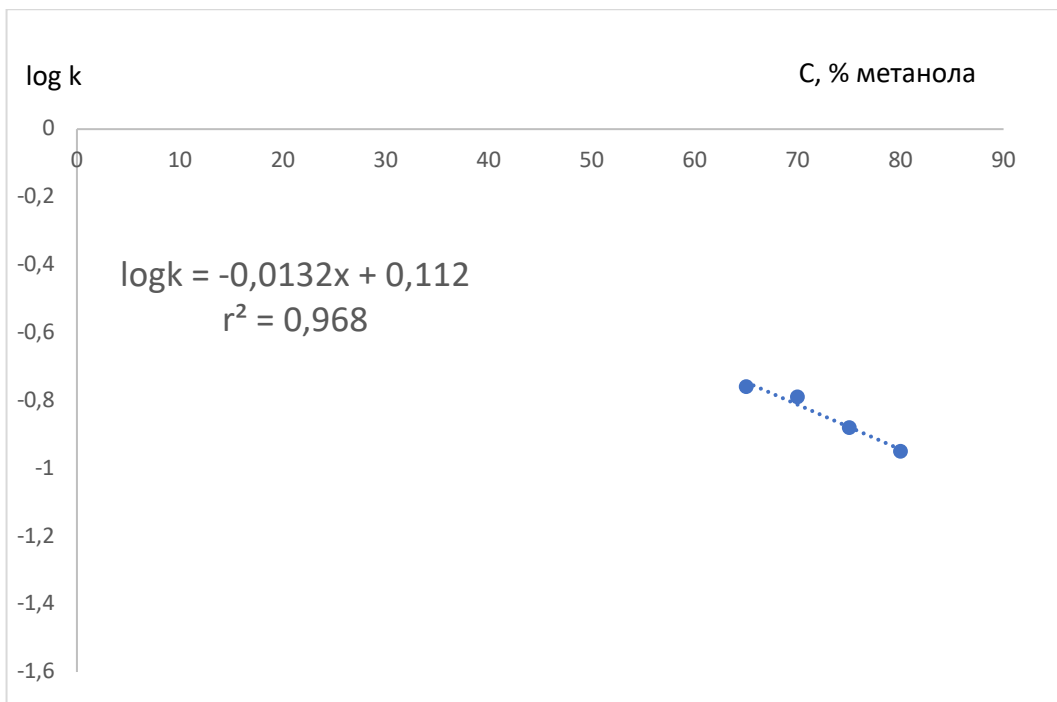
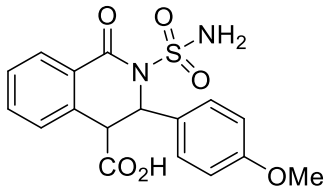
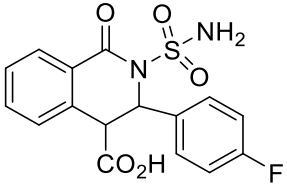
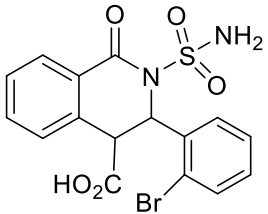
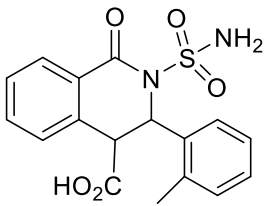


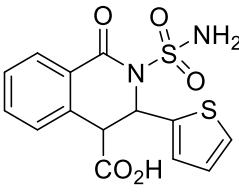
Рисунок 6 – Зависимость фактора КЕМ-472 метанола в составе подвижной фазы

В таблице 5 сведены данные для изученных соединений.

Таблица 5 – Результаты анализа, полученные для изученных соединений.

Исследуемое соединение	Log k ₀	Log P _{o/w}
1	2	3
	0.97 ± 0.01	1.46 ± 0.02
	1.70 ± 0.03	2.12 ± 0.04
	0.79 ± 0.01	1.31 ± 0.02
	1.84 ± 0.02	2.25 ± 0.04

Продолжение таблицы 5

1	2	3
	1.11 ± 0.01	1.60 ± 0.04

В таблице 6 приведены значения $\log P_{o/w}$, рассчитаны с помощью программы Maestro модуль Quickprop .

Таблица 6 - Значения $\log P_{o/w}$, рассчитаны в программе Maestro

№ соединения	$\log P_{o/w}$
КЕМ-455	1.94
КЕМ-466	2.04
КЕМ-467	2.36
КЕМ-469	2.19
КЕМ-472	1.77

В ходе анализа полученных результатов установлено, что экспериментальные и теоретические показатели липофильности для изученных соединений имеют достаточно близкие значения. Но для более точных результатов расчетные значения стоит подкреплять экспериментальным методом.

Таким образом, определены значения липофильности для производные тетрагидроизохинолинов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Из полученных результатов следует, что значение липофильности зависит от объема молекулы и структуры заместителей. С ростом объема молекулы увеличивается значение липофильности, данный

факт согласуется с полученными результатами. Используемое основное уравнение для определения липофильности, а также сам метод ОФ-ВЭЖХ могут быть использованы для определения $\log P_{o/w}$ других веществ со схожей структурой.

Установление взаимосвязи между ингибирующей активностью исследуемых соединений и их гидрофобностью

Для исследованных соединений проведена оценка взаимосвязи между показателями их ингибирующей способности к различным формам СА и значениями гидрофобности. В таблице 7 приведены значения IC_{50} рассмотренных соединений по отношению к СА II, СА IX и СА XII.

Таблица 7 – Ингибирующая способность исследованных соединений

Соединение	IC_{50} , нМ		
	СА II	СА IX	СА XII
КЕМ 455	43,4	15,1	67,7
КЕМ 466	8,1	19,7	13,8
КЕМ 467	84,9	63,9	208,4
КЕМ 469	36,9	9,5	24,9
КЕМ 472	25,8	35,6	18,4

На рисунках 7-9 представлены зависимости величин IC_{50} от $\log P$ рассмотренных в работе соединений.

Ингибирующая по отношению к карбоангидразе активность – многофакторный параметр, который складывается из многих составляющих. Поэтому ожидать прямой корреляции с гидрофобностью (липофильностью) соединений не приходится. Но тем не менее, видна тенденция к уменьшению величины IC_{50} с ростом $\log P$ (с уменьшением липофильности).

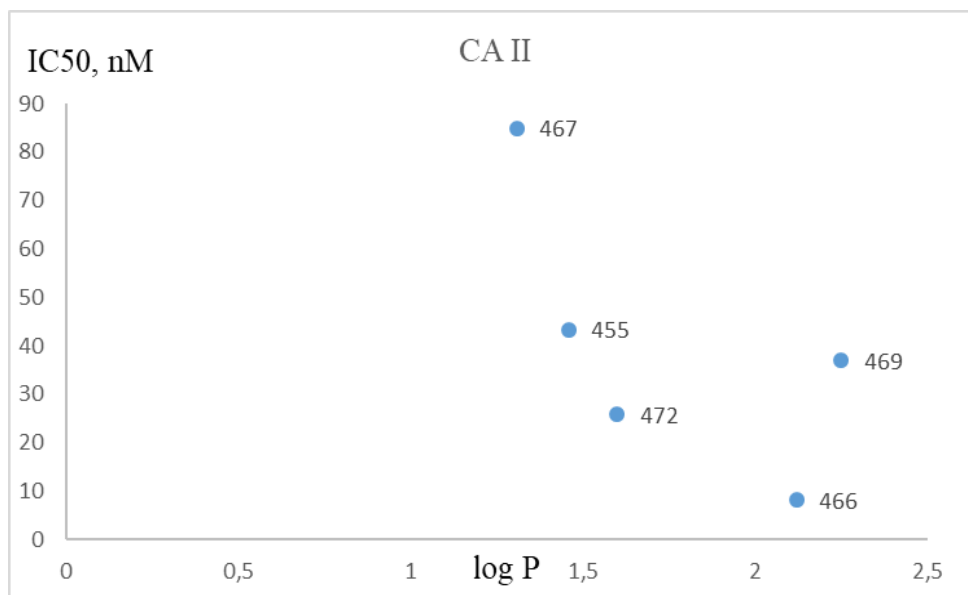


Рисунок 7 – Зависимость ингибирующей способности соединений по отношению к СА II от значений их гидрофобности

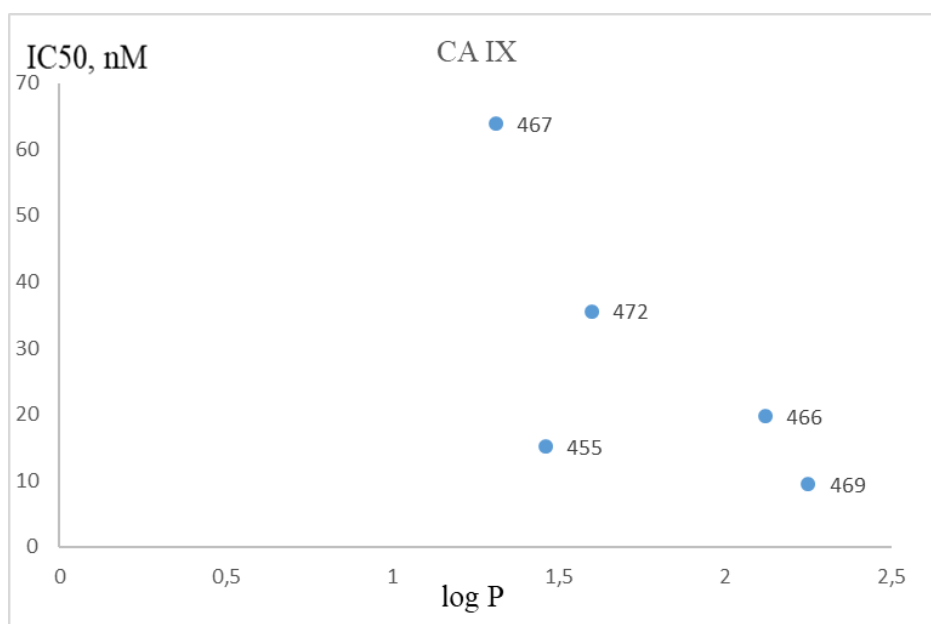


Рисунок 8 – Зависимость ингибирующей способности соединений по отношению к СА IX от значений их гидрофобности

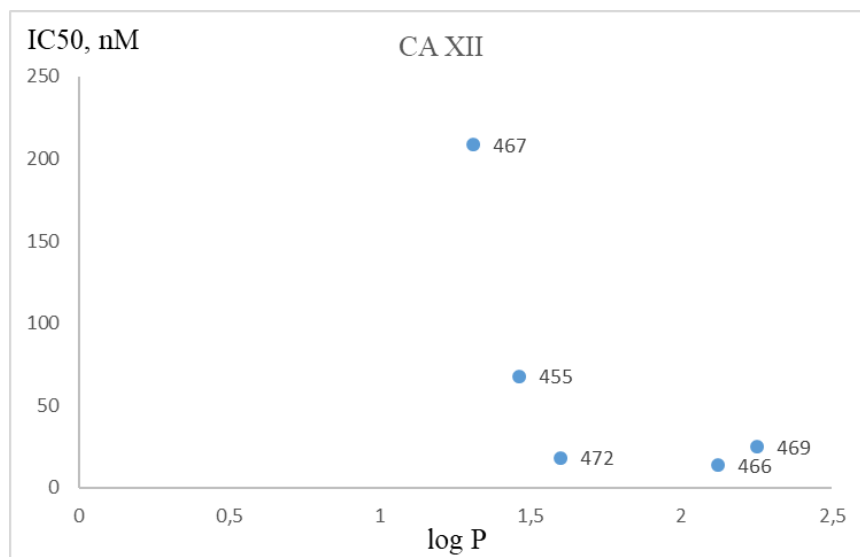


Рисунок 9 – Зависимость ингибирующей способности соединений по отношению к СА XII от значений их гидрофобности

Так для соединения КЕМ 467 с самым низким значением логарифма гидрофобности наблюдаются самые высокие значения IC_{50} по отношению ко всем формам СА. Соединения КЕМ 466 и КЕМ 469, показывающие одни из самых высоких значений гидрофобности, являются и лидерами по ингибирующей активности.

Заключение

В ходе данной бакалаврской работы была достигнута цель, а также выполнены поставленные задачи. По проделанной исследовательской работе можно сделать следующие выводы:

– Сняты спектры поглощения впервые синтезированных производных тетрагидроизохинолинов. Максимум поглощения веществ лежит в диапазоне длин волн от 260 до 280 нм.

– Исследовано хроматографическое поведение ингибиторов карбоангидразы в ОФ-варианте ВЭЖХ с элюентом метанол-вода при их разном соотношении. Определены факторы удерживания.

– По уравнению для расчета гидрофобности определены параметры гидрофобности для 5 соединений. Все значения соответствуют правилу Липинского.

– В программе Maestro, модуль QuickProp, рассчитаны значения гидрофобности для исследованных в работе соединений. В целом, наблюдается согласование расчетных и экспериментальных значений.

– Сопоставление ингибирующей активности по отношению к СА II, СА IX и СА XII рассмотренных соединений с параметрами гидрофобности показывает, что наблюдается закономерность в увеличении ингибирующей способности для соединений с более высокими параметрами гидрофобности. Безусловно, зависимость ингибирующей способности от структуры и свойств молекулы более сложна и многофакторна и требует дополнительного исследования.

Список используемой литературы

- 1 Ахназарова С.А. Оптимизация эксперимента в химии и химической технологии / Ахназарова С.А., Кафаров В.В. // *М. ВШ*. – 1985. – С. 327
- 2 Крылов Е.Н. Кислотность арилсульфонамидов как функция квантовохимических параметров атома сульфамидного азота / Крылов Е.Н., Вирзум Л.В. // *Известия Академии наук. Серия химическая*. – 2019. – С. 527 – 531.
- 3 Klimov V. V., Baranov S. V. Bicarbonate requirement for the water-oxidizing complex of photosystem II // *Biochim. et biophys. acta*. – 2001. –Vol. 45.– P. 187–196.
- 4 Stemler A. J. The case for chloroplast thylakoid carbonic anhydrase // *Physiol. Plant*. – 1997. –Vol. 20. – P. 348–3535
- 5 Bicarbonate may be required for ligation of manganese in the oxygen-evolving complex of Photosystem / Klimov V.V., Hulsebosch R. J., Allakhverdiev S. I. et al. // *Biochemistry*. – 1997. –Vol. 35 – P. 16277–16281.
- 6 Крылов Е.Н., Газофазная кислотность арилсульфонамидов. / Крылов Е.Н., Вирзум Л.В., Сергеева Г.А // *European multi science journal*. – 2018. –Vol. 21. P. 22 – 25.
- 7 Stemler A. J. The case for chloroplast thylakoid carbonic anhydrase. // *Biochim. et biophys. acta*. – 2001. – Vol –2. – P. 187–196.
8. Avron M. Energy transduction in chloroplasts // *Annu. Rev. Biochem.* – 1977. –Vol 1. – P. 143–155.
9. The photosystem II-associated Cah3 in Chl Underwood C., Gould M. J. Modulation of proton efflux from chloroplasts in the light by external pH. / Shutova T., Kenneweg H., Buchta J. et al. // *Arch. Biochem. and Biophys.* – 1980. – Vol. 10. – P. 241–246.
10. Lipinski C. A. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings / C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy et al. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2001. – Vol.

46, № 3. – P. 3–26

11. Waring M. J. Lipophilicity in drug discovery // *Expert opin drug discov.* – 2010. – Vol. 5. – P. 235–248

12. Valko K. The influence of lipophilicity in drug discovery and design // *J. Chromatogr. A.* 2004. – Vol– 37. –P. 299–310.

13. И.А. Кировская. Экспериментальное определение и моделирование физико-химических свойств малых биологически активных молекул посредством оценки параметров липофильности. / И.А. Кировская, А.С Фисюк. // *Автореферат на соискание ученой степени кандидата химических наук.* – Омск. – 2013. – Т.14 –

14. Е.Н. Шаповалова. Хроматографические методы анализа. / Е.Н. Шаповалова, Пирогов А.В. // *Учебно – методическое пособие для специального курса.* – 2007. Vol 57. P. 64 - 67 с.

15. Mrkvickova Z. Determination of lipophilicity of novel potential antituberculous agents using HPLC on monolithic stationary phase and theoretical calculations / Z. Mrkvičková, P. Kovaříková, S. Balíková et al. // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.* – 2008. – Vol. 48. – №. 2. – P. 310-314.

16. Giaginis C. Octanol/water partitioning simulation by reversed-phase high performance liquid chromatography for structurally diverse acidic drugs: Effect of n-octanol as mobile phase additive / C. Giaginis, S. Theocharis, A. Tsantili-Kakoulidou // *Journal of Chromatography A.* – 2007. – Vol. 1166. – №. 1-2. – P. 116-125.

17. Salmon A. J. Metallocene-based inhibitors of cancer-associated carbonic anhydrase enzymes IX and XII / A. J. Salmon, M. L. Williams, Q. K. Wu et al. // *Journal of medicinal chemistry.* – 2012. – Vol. 55. – №. 11. – P. 5506-5517.

18. Arnon D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenolase in *Beta vulgaris* // *Plant Physiol.* – 1949. – 24 – Vol. 23 – P. 1–154.

19. Ghose A. K. Crippen G. M /The Hydrophobic Fragmental Constant. – Amsterdam. // *J. Computational Chem.* 1986.–Vol 4. – P.565–577.

20. Sharif N.A. Glaucomatous optic neuropathy treatment options: the promise of novel therapeutics, techniques and tools to help preserve vision. // *Neural Regen Res.* 2018. – Vol 10. – P 1145–1150.

21 Liao Q.M. Lipophilicity in Drug Action and Toxicology. – Weinheim: VCH Publishers // *Molecular Diversity.* 2006. – Vol 67. – P. 301–309.

22. Tsopelas F. Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery / F. Tsopelas, C. Giaginis, A. Tsantili-Kakoulidou // *Expert opinion on drug discovery.* – 2017. – Vol. 12. – №. 9. – P. 885-896.

23 Tsopelas F. Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery / F. Tsopelas, C. Giaginis, A. Tsantili-Kakoulidou // *Expert opinion on drug discovery.* – 2017. – Vol. 12. – №. 9. – P. 885-896.

24. Arnott J. A., Planey S. L. The influence of lipophilicity in drug discovery and design // *Expert opinion on drug discovery.* – 2012. – Vol. 7. – №. 10. – P. 863-875.

25. Waring M. J. Lipophilicity in drug discovery // *Expert opin drug discov.* – 2010. – Vol. 5. – P. 235–248.

26. Leo A. Partition coefficients and their uses / A. Leo, C. Hansch, D. Elkins // *Chemical reviews.* – 1971. – Vol. 71. – №. 6. – P. 525-616

27. Gaudette L. E. Relationship between the lipid solubility of drugs and their oxidation by liver microsomes / L. E. Gaudette, B. B. Brodie // *Biochemical pharmacology.* – 1959. – Vol. 2. – №. 2. – P. 89-96.

28. Durgun M. Synthesis of 4-sulfamoylphenyl-benzylamine derivatives with inhibitory activity against human carbonic anhydrase isoforms I, II, IX and XII / M. Durgun, H. Turkmen, M. Ceruso // *Bioorganic & medicinal chemistry.* – 2016. – Vol. 24. – №. 5. – P. 982-

29. DiMario R.J., Machingura M.C., Waldrop G.L., Moroney J.V. The many types of carbonic anhydrases in photosynthetic organisms // *Plant Sci.* – 2018. № 268. – P. 11-17.

30 Brendan P. Lucey, Walter A. Nelson-Rees, Grover M. Hutchins. Henrietta

Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2009. - Vol. 133. - № 9. - P. 1463–1467

31. Allouche F. Synthesis of aminocyanopyrazoles via a multi-component reaction and anti-carbonic anhydrase inhibitory activity of their sulfamide derivatives against cytosolic and transmembrane isoforms. / Allouche F, Chabchoub F, Carta F, Supuran CT. // *J Enzyme Inhib Med Chem* – 2013. – Vol. 28. – P. 343-347.

32. Krasavin M. Inhibitory activity against carbonic anhydrase IX and XII as a candidate selection criterion in the development of new anticancer agents / M. Krasavin // *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry.* – 2020. – Vol. 35. – №. 1. – P. 1555-1561.

33. Aditama R. Docking and molecular dynamics simulation of carbonic anhydrase II inhibitors from phenolic and flavonoid group / R. Aditama, D. Mujahidin, Y. M. Syah // *Procedia Chemistry.* – 2015. – Vol. 16. – P. 357-364.

34. Kassel D. B. Applications of high-throughput ADME in drug discovery / D. B. Kassel // *Current opinion in chemical biology.* – 2014. – Vol. 8. – №. 3. – P. 339-345.

35. Claudiu T. Supuran. Bacterial Carbonic Anhydrases as Drug Targets: Toward Novel Antibiotics // *Frontiers in Pharm.* – 2011. - Vol. 2. - № 34. - P. 1–6.

36. Camadan Y. Investigation of in vitro and in silico effects of some novel carbazole Schiff bases on human carbonic anhydrase isoforms I and II // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.* – 2021. – P. 1-10.

37. Novack G. D., O'Donnell M. J., Molloy D. W. New glaucoma medications in the geriatric population: efficacy and safety / G. D. Novack, M. J. O'Donnell, D. W. Molloy // *Journal of the American Geriatrics Society.* – 2012. – Vol. 50. – №. 5. – P. 956-962.

38. Dizdaroglu Y. Design, synthesis and molecular modelling studies of some pyrazole derivatives as carbonic anhydrase inhibitors / Y. Dizdaroglu, C. Albay, T. Arslan // *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry.* – 2020. – Vol. 35. – №. 1. – P. 289-297.

39. Salmon A. J. Metallocene-based inhibitors of cancer-associated carbonic anhydrase enzymes IX and XII / A. J. Salmon, M. L. Williams, Q. K. Wu et al. // *Journal of medicinal chemistry*. – 2012. – Vol. 55. – №. 11. – P. 5506-5517
40. Svastova Eliska, Pastorekova Silvia. Carbonic anhydrase IX // *Cell Adhesion & Migration*. – 2013. - Vol. 7. - № 2. - P. 226–231.
41. Frost Susan C., McKenna Robert. Carbonic Anhydrase IX: Regulation and Role in Cancer // *Sub-cellular Biochem*. – 2014. - Vol. 75. - № 11. - P. 199–219.