

© Коллектив авторов, 2018

О. С. Григорьевич, Г. В. Мокров, А. С. Дябина, В. Н. Столярук, И. Б. Цорин, Е. О. Ионова, С. А. Крыжановский, Т. А. Гудашева, А. Д. Дурнев

## ДИЗАЙН, СИНТЕЗ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО ИНГИБИТОРА МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-9

ФГБНУ "НИИ фармакологии им. В. В. Закусова", Россия, 125315, Москва, Балтийская ул., д. 8; e-mail: tata-sosnovka@mail.ru

На основании структурных требований к селективным ингибиторам желатиназ сконструирован новый ингибитор ММП-9, 1-{4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-L-пролин с теоретической константой ингибирования  $IC_{50} = 4 \cdot 10^{-5}$  М. Осуществлен синтез сконструированного соединения и его близких структурных аналогов, показана их низкая токсичность ( $LD_{50} > 300$  мг/кг). Новый ингибитор в дозе 20 мг/кг/сут перорально в условиях острого инфаркта миокарда достоверно уменьшал содержание иммунореактивности ММП-9 в плазме крови крыс на уровне доксициклина.

**Ключевые слова:** матриксные металлопротеиназы; желатиназа В; ингибиторы ММП-9; бензоиламино(фенилсульфонил)аминокислоты; кардиопротекторные средства; раннее постинфарктное ремоделирование миокарда.

Матриксные металлопротеиназы (ММП) относятся к семейству цинк-зависимых эндопептидаз [1] и играют важную роль в постинфарктном ремоделировании миокарда [2], участвуя в деградации цепей коллагена [3]. В этот процесс вовлечены матриксные металлопротеиназы 2-го и 9-го типов (ММП-2 и ММП-9), так называемые желатиназы [4]. Увеличение их активности приводит к разрушению матрикса, состоящего в основном из коллагена, и выбросу самих протеаз в кровоток. В эксперименте *in vivo* [5] показано, что избыточное воздействие желатиназ на организм мышей приводит к ремоделированию левого желудочка (ЛЖ) сердца. При исследовании больных с инфарктом миокарда (ИМ) выявлено увеличение концентрации ММП-2 и ММП-9 в крови через 24 ч и через 6 мес после ИМ [6]. Полагают [6], что именно активность ММП-2 и ММП-9 играет главную роль в нежелательных изменениях тканей сердечно-сосудистой системы, и от уровня их активности в ишемизированном миокарде во многом зависит прогноз раннего постинфарктного ремоделирования сердца. Нежелательную активность желатиназ можно снизить с помощью специфических ингибиторов.

На сегодняшний день известен ряд эффективных ингибиторов желатиназ, для которых показана кардиотропная активность в экспериментах *in vivo* (рис. 1).

Самой большой группой ингибиторов ММП являются сульфонамиды [7]. Так, сульфонамидные ингибиторы желатиназ PD 166793 [8] и CP-471,474 [9] способствуют сохранению систолической функции сердца, предотвращая растяжения ЛЖ у грызунов с ИМ. Сульфонамид PG 116800 с наномолярной константой ингибирования показал хорошие результаты по постинфарктному ремоделированию ИМ в экспери-

менте [10], однако в клинических исследованиях эффективность его не подтвердилась [11]. Другой большой группой ингибиторов являются гидроксаматы [12]. Синтезированы алкилсульфонилгидроксаматы SC-78080/SD-2590, SC-77774 и SC-77964 и показано, что они селективно ингибируют ММП-2 и ММП-9 и ослабляют расширение ЛЖ сердца крыс [13]. Гидроксаматный ингибитор маримагат (BB-2516) дошел до клинических исследований, но показал низкую биодоступность при пероральном применении [14, 15]. Антибиотик тетрациклинового ряда доксициклин, как известно, обладающий цинк-хелатирующими свойствами, в экспериментах *in vivo* показал снижение растяжения ЛЖ сердца и сохранение толщины его передней стенки [16]. Доксициклин обладает умеренной константой ингибирования желатиназ. В ходе клинических испытаний он показал снижение ремоделирования ЛЖ сердца и уменьшение размеров ИМ [17, 18]. Доксициклин разрешен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA, USFDA) в 1998 г. и до сих пор остаётся единственным зарегистрированным ингибитором ММП [19, 20]. Соединение LTQ получено в качестве селективного ингибитора ADAM-10, оно также оказалось активным по отношению к ММП-2 и ММП-9 [21]. Некоторые ингибиторы желатиназ могут использоваться в онкологии. Например, Ap-1 используется в качестве онкомаркера, а MS-560 предполагается использовать для лечения онкологических заболеваний [22, 23]. Описанные ингибиторы не обладают высокой селективностью к ММП-2 и ММП-9, поэтому их применение осложнено побочными эффектами, так как металлопротеазы участвуют во многих критически

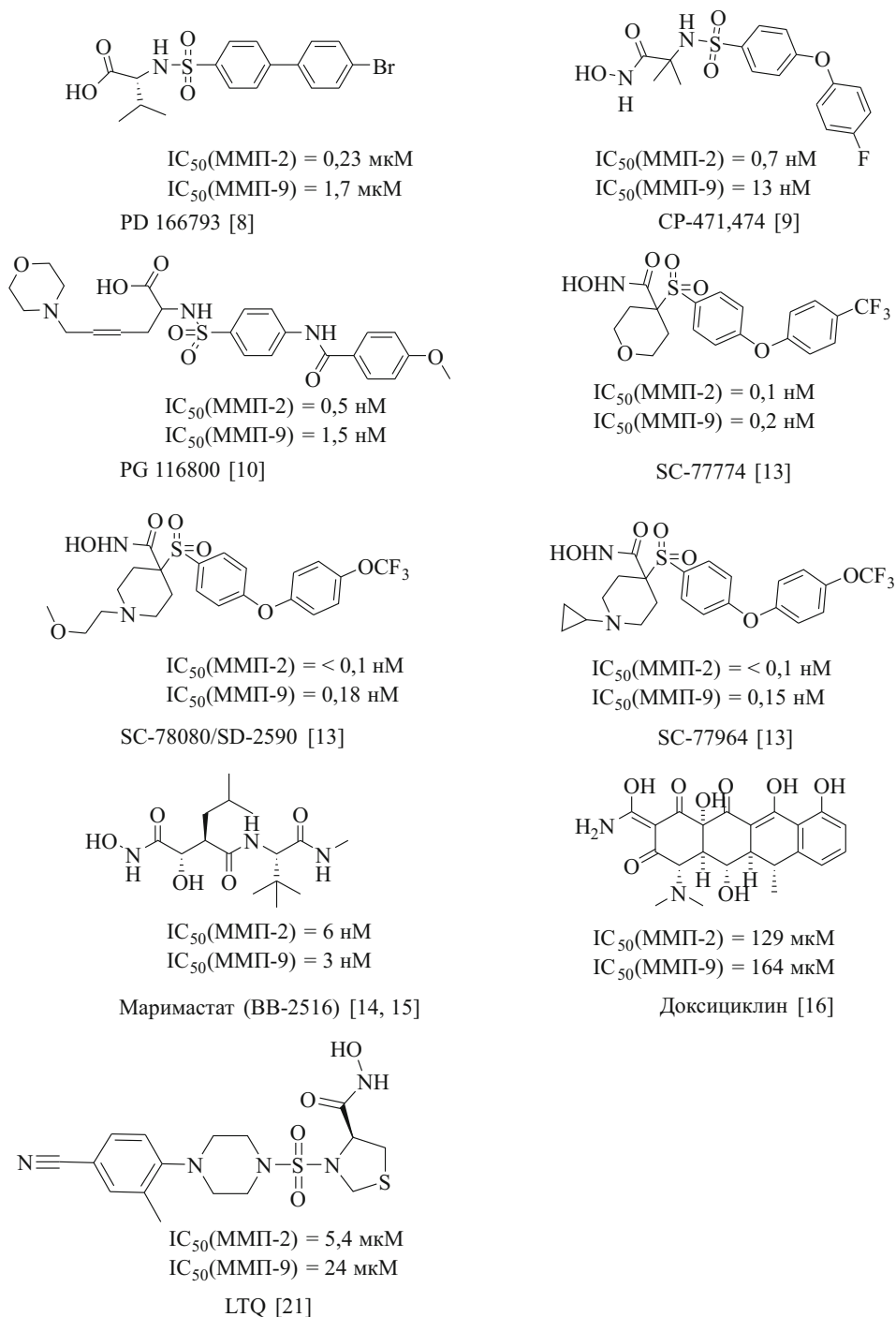


Рис. 1. Ингибиторы ММП, влияющие на ремоделирование левого желудочка.

важных процессах, начиная от белкового катаболизма и кончая процессингом нейропептидов.

В свете вышесказанного создание ингибиторов ММП-2 и ММП-9 для лечения и профилактики сердечнососудистых заболеваний является актуальным.

Настоящая работа посвящена созданию новых ингибиторов ММП-9, эффективных для уменьшения ремоделирования ЛЖ сердца после ИМ.

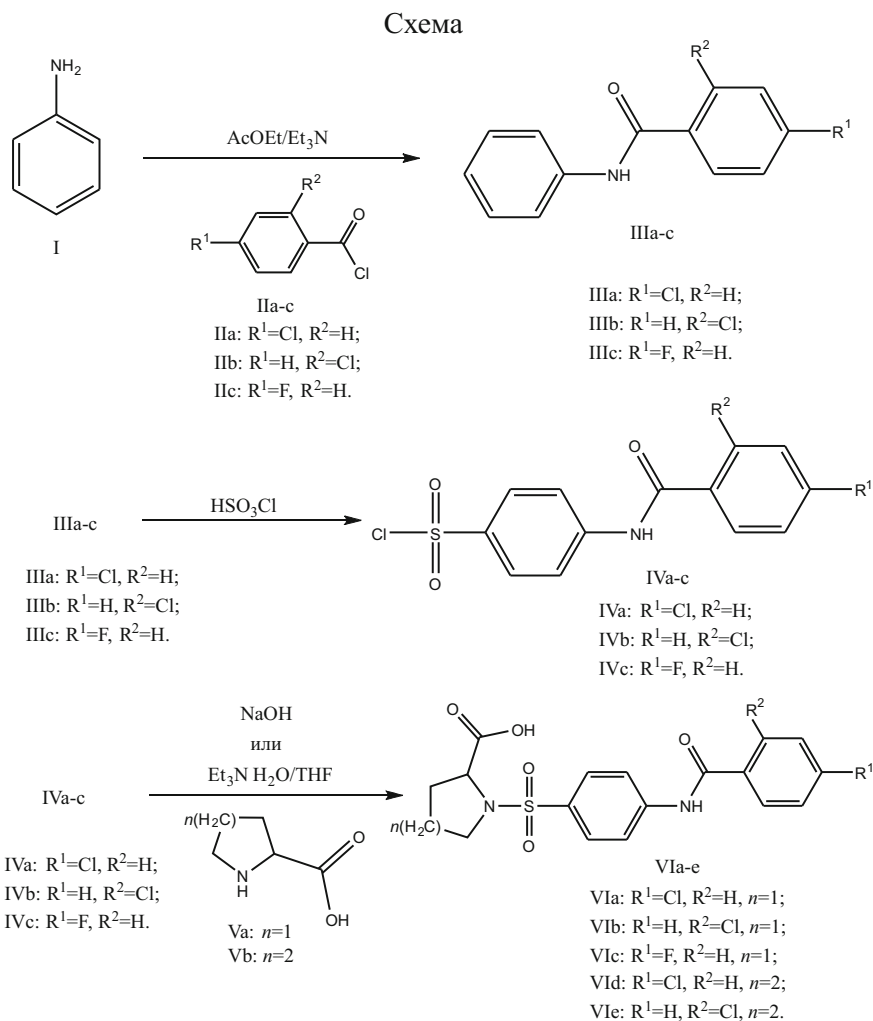
### Конструирование ингибиторов

Основным структурным требованием к ингибиторам желатиназ является наличие цинк-хелатирующей группы. К таким группам относят гидроксаматную, формилгидроксиламиновую, сульфгидрильную, фос-

финовую, аминокарбоксильную и карбоксильную группы [24]. Следующим требованием к селективным ингибиторам ММП-2 и/или ММП-9 является наличие группы для связывания с сайтом первичной специфич-

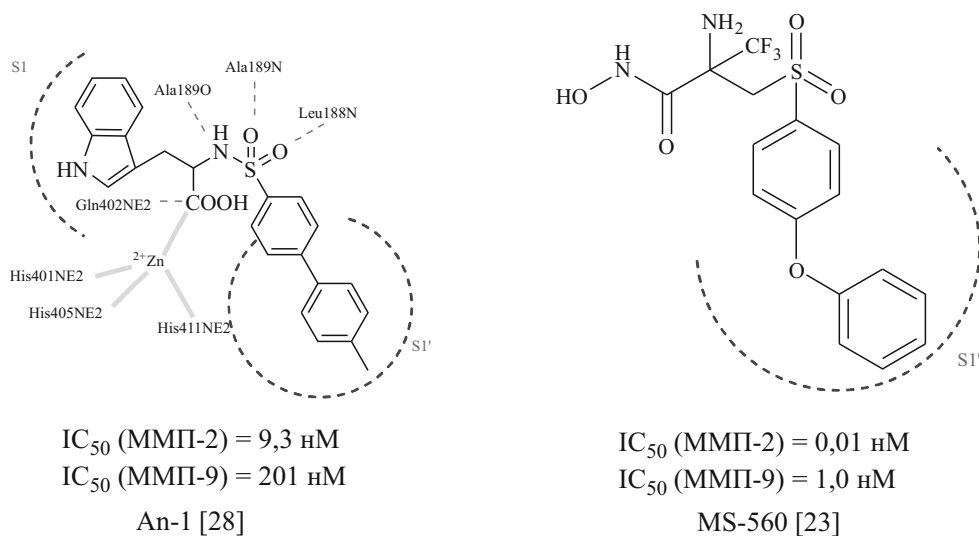
Таблица 1  
Значения оценочной функции Glide Score и  $IC_{50}$  для известных ингибиторов ММП-9 и соединения VIa

Соединение	GlideScore	$IC_{50}$ , М
PG 116800	- 11,18	$1,5 \cdot 10^{-9}$ [10]
CP-471,474	- 9,04	$1,3 \cdot 10^{-8}$ [9]
LTQ	- 8,34	$2,4 \cdot 10^{-5}$ [21]
VIa	- 7,30	$4 \cdot 10^{-5}$ (расчетная)



ности (рис. 2) (называемым S1' по номенклатуре Шехтера и Бергера) активного центра ферментов [24], так как именно сайт S1' в активном центре ММП-2 и ММП-9 по структуре отличается от соответствующих сайтов других ММП [25, 26]. Для этого используют производные сульфонида, содержащие биароматическую и/или амидную группы, а также тройную связь или тетразол [27]. Третьим структурным требованием

является наличие группы, необходимой для связывания с S1-сайтом. Лучше всего с S1 связываются фрагменты, содержащие циклический алифатический участок [25]. Средство к ферментам увеличивают группы, способные образовывать прочные водородные связи с аминокислотами активного центра. К таким группам в случае ингибиторов ММП относятся amino- и карбонильная группы [24, 28].



**Рис. 2.** Селективные ингибиторы ММП-9 и их расположение в активном центре фермента [28, 23].

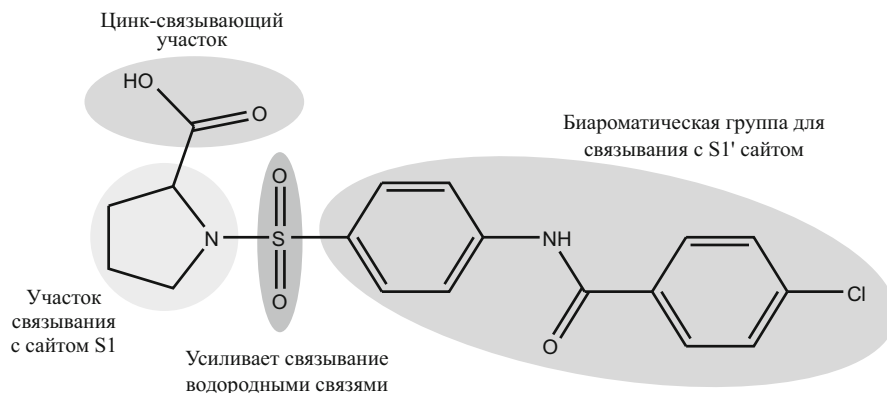


Рис. 3. Модель нового ингибитора ММП-2 и/или ММП-9, 1-{4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-L-пролина.

На основании приведенных выше структурных требований к селективным ингибиторам желатиназ нами сконструирован новый ингибитор ММП-9, 1-{4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-L-пролин. Он содержит в себе необходимые структурные элементы для связывания с активным центром желатиназ: цинк-связывающую карбоксильную группу, протяженную биароматическую липофильную группу для связывания с сайтом S1' и циклический алифатический участок для связывания с сайтом S1 (рис. 3).

#### Молекулярный докинг

Для теоретической оценки перспективности предложенного соединения в качестве ингибитора ММП-9 нами проведен молекулярный докинг VIa.

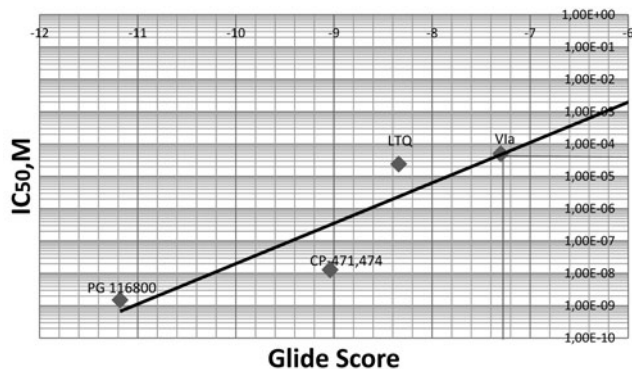
Для докинга использовали структуру фермента ММП-9 в комплексе с селективным лигандом LTQ [21], полученную с помощью рентгеноструктурного анализа (PDB ID: 5CUH). Молекулярный докинг соединения VIa проводили с использованием программы Glide (Schrodinger, Inc.) [29, 30], входящей в программный комплекс Maestro 10.4.3 [31]. Расчет производили с использованием режима экстраточности (XP). Для калибровки проведен докинг некоторых известных ингибиторов ММП-9.

Калибровочная кривая, полученная по данным оценочной функции GlideScore (табл. 1) для некоторых ингибиторов ММП-9 и их значений IC<sub>50</sub>, дала для сконструированного нами ингибитора VIa теоретиче-

Т а б л и ц а 2

#### Выходы, температуры плавления и спектры <sup>1</sup>H ЯМР соединений IIIa – IIIc, IVa – IVc и VIa – VIe

Соединение	Выход, %	T <sub>пл</sub> , °C	Брутто-формула	Спектры <sup>1</sup> H ЯМР
IIIa	96	194 – 196 (лит. 199 – 201) [32]	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> ClNO	–
IIIb	94	116 – 118 (лит. 114 – 115) [33]	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> ClNO	–
IIIc	87	183 – 184 (лит. 157 – 159) [34]	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> FNO	–
IVa	75	163 – 165	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub> S	7,58 (д, 2H, J 8,5 Гц, H(3), H(5)), 7,60 (д, J 8,4 Гц, 2H, H(3'), H(5')), 7,73 (д, J 8,5 Гц, 2H, H(2), H(6)), 7,99 (д, J 8,4 Гц, 2H, H(2'), H(6')), 10,43 (с, 1H, NH)
IVb	77	121 – 123	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub> S	7,42 – 7,61 (м и д, J 8,8 Гц, 6H, H(3), H(5), H(3'), H(4'), H(5'), H(6')), 7,66 (д, J 8,8 Гц, 2H, H(2), H(6)), 10,57 (с, 1H, NH)
IVc	75	210 – 211	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> ClNO <sub>3</sub> SF	7,36 (т, J 8,8 Гц, 2H, H(3'), H(5')), 7,59 (д, J 8,3 Гц, 2H, H(3), H(5)), 7,75 (д, J 8,3 Гц, 2H, H(2), H(6)), 8,06 (м, 2H, H(2'), H(6')), 10,38 (с, 1H, NH)
VIa	70	215 – 217	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S	1,56, 1,85 (два м, 4H, H <sub>2</sub> C(4) <sub>Pr1</sub> , H <sub>2</sub> C(4) <sub>Pr1</sub> ), 3,16, 3,36 (два м, 2H, H <sub>2</sub> C(5) <sub>Pr1</sub> ), 4,10 (дд, J 7,8 Гц, J 4,4 Гц, 1H, HC(2) <sub>Pr1</sub> ), 7,64 (д, J 8,8 Гц, 2H, H(3'), H(5')), 7,83 (д, J 8,8 Гц, 2H, H(3), H(5)), 8,00 (д, J 8,8 Гц, 2H, H(2'), H(6')), 8,02 (д, J 8,8 Гц, 2H, H(2), H(6)), 10,69 (с, 1H, NH)
VIb	72	215 – 217	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S	1,60, 1,85 (два м, 4H, H <sub>2</sub> C(4) <sub>Pr1</sub> , H <sub>2</sub> C(3) <sub>Pr1</sub> ), 3,18, 3,38 (два м, 2H, H <sub>2</sub> C(5) <sub>Pr1</sub> ), 4,10 (дд, J 8,1 Гц, J 4,4 Гц, 1H, HC(2) <sub>Pr1</sub> ), 7,43 – 7,66 (м, 4H, H(3'), H(4'), H(5'), H(6')), 7,83 (д, J 8,8 Гц, 2H, H(3), H(5)), 7,95 (д, J 8,8 Гц, 2H, H(2), H(6)), 10,96 (с, 1H, NH)
VIc	69	96 – 97	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> SF	1,56, 1,86 (два м, 4H, H <sub>2</sub> C(4) <sub>Pr1</sub> , H <sub>2</sub> C(3) <sub>Pr1</sub> ), 3,17, 3,36 (два м, 2H, H <sub>2</sub> C(5) <sub>Pr1</sub> ), 4,10 (дд, J 8,1 Гц, J 4,4 Гц, 1H, HC(2) <sub>Pr1</sub> ), 7,38 (д, J 8,8 Гц, 2H, H(3'), H(5')), 7,83 (д, J 8,8 Гц, 2H, H(3), H(5)), 8,02 (д, J 8,8 Гц, 2H, H(2'), H(6')), 8,05 (д, J 8,8 Гц, 2H, H(2), H(6)), 10,64 (с, 1H, NH)
VI d	62	102 – 107	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> SCl	1,02 – 2,08 (м, 6H, H <sub>2</sub> C(3) <sub>Pr1</sub> , H <sub>2</sub> C(4) <sub>Pr1</sub> и H <sub>2</sub> C(5) <sub>Pr1</sub> ), 3,19, 3,65 (два м, 2H, H <sub>2</sub> C(6) <sub>Pr1</sub> ), 4,56 (м, 1H, HC(2) <sub>Pr1</sub> ), 7,63 (д, J 8,8 Гц, 2H, H(3'), H(5')), 7,78 (д, J 8,8 Гц, 2H, H(3), H(5)), 7,98 (д, J 8,8 Гц, 2H, H(2'), H(6')), 8,01 (д, J 8,8 Гц, 2H, H(2), H(6)), 10,66 (с, 1H, NH)
VI e	67	210 – 212	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> SCl	1,23 – 1,78 (м, 6H, H <sub>2</sub> C(3) <sub>Pr1</sub> , H <sub>2</sub> C(4) <sub>Pr1</sub> и H <sub>2</sub> C(5) <sub>Pr1</sub> ), 3,30, 3,76 (два м, 2H, H <sub>2</sub> C(6) <sub>Pr1</sub> ), 4,69 (м, 1H, HC(2) <sub>Pr1</sub> ), 7,43 – 7,67 (м, 4H, H(3'), H(4'), H(5'), H(6')), 7,83 (д, J 8,8 Гц, 2H, H(3), H(5)), 8,01 (д, J 8,8 Гц, 2H, H(2), H(6)), 10,16 (с, 1H, NH)



**Рис. 4.** Взаимосвязь оценочной функции программы Glide и данных по  $IC_{50}$  ингибиторов ММП-9. Расчетные данные для VIa показаны красным цветом.

ское значение  $IC_{50}$ , равное  $4 \cdot 10^{-5}$  М (рис. 4). По данным докирования, ингибитор VIa может связываться с активным центром ММП-9 таким образом, что карбоксильная группа образует связь с каталитическим ионом цинка, сульфонильная группа образует водородные связи с аминогруппой основной цепи Лей188 и Ала189, и дополнительная стабилизация ингибиторного комплекса происходит благодаря катион-π взаимодействию одного из ароматических колец соединения VIa с цинком (рис. 5).

#### Синтез ингибиторов

Сконструированное соединение VIa и его аналоги с заменой *n*-хлорбензоильного на *o*-хлорбензоильный (соединение VIb) и на *n*-фторбензоильный радикал (соединение VIc) с расширенным пирролидиновым циклом (соединение VIд) и с одновременным расширением цикла и заменой на *o*-хлорбензоильный радикал (соединение VIe) синтезированы по общей схеме.

Исходные арилсульфонилхлориды (IVa – IVc) получены в 2 стадии. На первой стадии проведено ацилирование анилина I соответствующими производными бензоилхлорида (IIa – IIc) в этилацетате в присутствии триэтиламина. Полученные бензамиды (IIIa – IIIc) вводили в реакцию с хлорсульфоновой кислотой при температуре 45 °С и получали арилсульфонилхлориды (IVa – IVc). На следующей стадии проведено ацилирование циклических аминокислот (Va – Vb) арилсульфонилхлоридами (IVa – IVc) и получены производные циклических аминокислот (VIa – VIe). Строение полученных соединений подтверждено ЯМР <sup>1</sup>Н спектроскопией, а состав — элементным анализом (табл. 2).

#### Фармакологические исследования

Для всех синтезированных соединений 50 % летальная доза ( $LD_{50}$ ) на мышах превышала 300 мг/кг внутрибрюшинно (в/б) (табл. 3). Это позволяет отнести изучаемые соединения к малотоксичным веществам.

Поскольку увеличение активности ММП в миокарде при ИМ приводит к разрушению матрикса и выбросу ММП в кровь, для определения фармакологической активности синтезированных соединений определяли изменение содержания иммунореактивности металло-

протеиназы-9 в плазме крови крыс с экспериментальным острым ИМ, вызванным перевязкой левой коронарной артерии. Соединения вводили 3 дня до ИМ в дозе 20 мг/кг в день внутривенно. Эта доза составляла около 1/20 от  $LD_{50}$ .

Среди всех изученных бензоиламино(фенилсульфонил)замещенных циклических аминокислот на содержание ММП-9 в ишемизированном миокарде влияло только соединение VIa, которое значимо по сравнению с контролем понижало содержание ММП-9 (рис. 6) в крови. Оно по своей активности не уступало препарату сравнения доксициклину.

Полученные результаты соответствуют теоретически рассчитанному значению  $IC_{50} \sim 4 \cdot 10^{-5}$ , так как концентрация вещества VIa в крови крыс, исходя из его молекулярной массы 408,05 г/моль, объема крови крысы (7 % от массы крысы) и активной дозы (20 мг/кг), составляет  $5 \cdot 10^{-4}$  М.

Таким образом, получен ингибитор ММП-9, принадлежащий к новой структурной группе ингибиторов ММП. Изучение связи структура — активность показывает, что этот ингибитор обладает высокой специфичностью к активному центру ММП-9, так как небольшие изменения в его структуре приводят к исчезновению активности. Это позволяет надеяться на специфические фармакологические эффекты, связанные с ММП-9.

#### Экспериментальная химическая часть

Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре BrukerAC-250 (250 МГц), растворители —  $DMCO-d_6$  и  $CDCl_3$ , внутренние стандарты — сигналы остаточных протонов растворителей (δ 2,50 и 7,24 м.д. соответственно). Температуру плавления определяли на приборе OptiMelt. Ход реакции контролировали методом ТСХ на пластинки “Merk”, пятна обнаруживали при облучении УФ-светом. Выходы, температуры плавления и данные спектров ЯМР <sup>1</sup>Н представлены в табл. 2.

**Общий метод синтеза N-бензамидов (IIIa – c).** К раствору 200 ммоль (18,63 г) анилина (I) и 240 ммоль (24,29 г) триэтиламина в 300 мл этилацетата при перемешивании прикапывают раствор 210 ммоль соответствующего бензоилхлорида (II) в 150 мл этилацетата в течение 40 мин при комнатной температуре. Реакционную массу перемешивают в течение 8 ч, осадок отфильтровывают, фильтрат упаривают досуха, остаток промывают 100 мл гексана, затем 150 мл смеси гесан — этилацетат (5:1) и тремя порциями воды по 100 мл и сушат при температуре 80 °С в течение 3 ч [35].

**Общий метод синтеза арилсульфонилхлоридов (IVa – c).** К 500 ммоль (58,26 г) хлорсульфоновой кислоты присыпают при перемешивании 100 ммоль соответствующего N-бензида (IIIa – c) и перемешивают смесь при температуре 45 °С в течение 4 ч, после чего ее при перемешивании выливают в 300 г льда. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают во-

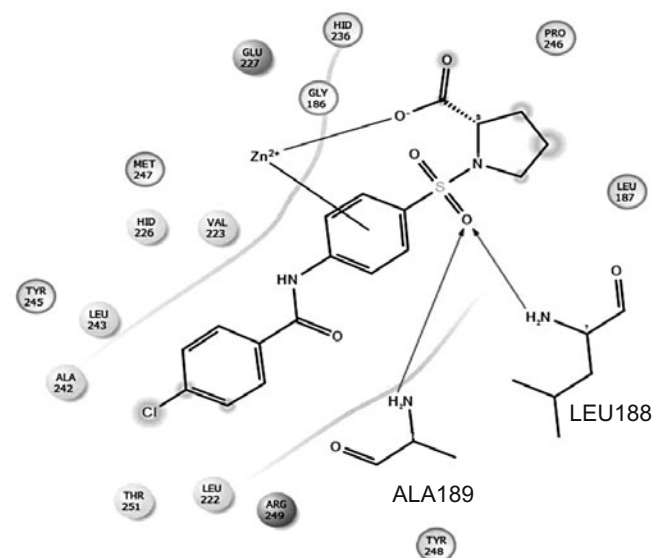


Рис. 5. Лиганд VIa в активном центре ММП-9 по данным программы Glide. 2D проекция.

дой до нейтрального значения среды и сушат при температуре 80 °С в течение 3 ч [32].

**Общий метод синтеза производных L-пролина (VIa – c).** К раствору 12 ммоль (1,38 г) L-пролина (Va) и 24 ммоль (0,96 г) гидроксида натрия в 50 мл воды присыпают 12 ммоль соответствующего арилсульфонилхлорида (IVa – c) и реакционную смесь перемешивают при температуре 75 °С в течение 45 мин, затем в течение 1 сут при комнатной температуре. После этого раствор фильтруют на стеклянном фильтре и прикапывают 0,1 М HCl до значения pH = 1. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают водой до нейтрального значения среды и сушат при 80 °С в течение 3 ч [36].

**Общий метод синтеза производных L,D-пипеколиновой кислоты (VIд и VIe).** К раствору 15 ммоль (1,94 г) D, L-пипеколиновой кислоты (Vb) и 50 ммоль (5,06 г) триэтиламина в 20 мл воды и 20 мл тетрагидрофурана прибавляют 12 ммоль соответствующего арилсульфонилхлорида (IVa – b) и реакционную смесь перемешивают в течение 1 сут. К раствору прибавляют 35 мл дихлорметана и прикапывают 0,1 М HCl до значения pH = 1 для водного слоя. Смесь перемешивают, органический слой отделяют, промывают водой, отфильтровывают через бумажный фильтр и упаривают досуха. Остаток перекристаллизуют из смеси дихлорметан — гексан (1:1) и сушат при 80 °С в течение 3 ч [36].

### Экспериментальная фармакологическая часть

Все включенные в исследование животные получены из ФГБНУ “Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства”, филиал “Столбовая”. Животные содержались в стандартных условиях вивария ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова” при контролируемом ос-

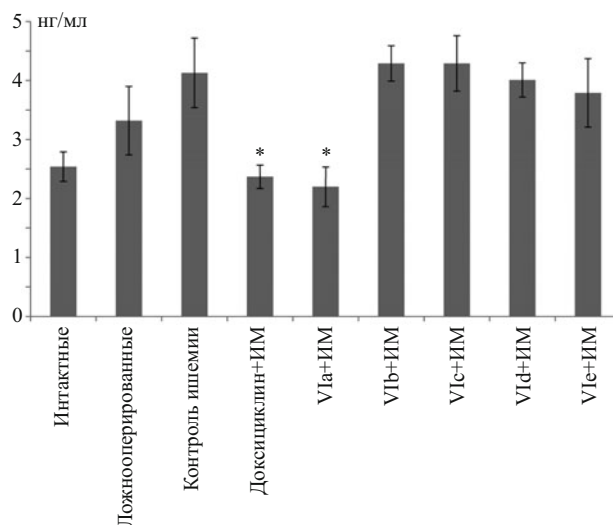


Рис. 6. Влияние соединений VIa – VIe на содержание ММП-9 в плазме крови крыс с острым ИМ. \*  $p < 0,05$  по отношению к ишемизированному контролю.

вещении (12 ч — свет/12 ч — темнота) и постоянной температуре (21 – 23 °С) со свободным доступом к воде и брикетированному корму в течение 10 сут до начала тестирования. Условия содержания животных соответствовали СП 2.2.1.3218-14 “Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)” от 29 августа 2014 г. № 51.

ЛД<sub>50</sub> синтезированных соединений изучали в опытах на беспородных мышках-самцах массой 21 – 24 г. Соединения вводили в/б. В качестве растворителя использовали апиrogenную воду для инъекций. Острую токсичность каждого соединения определяли как минимум в 5 различных дозах, количество животных в каждой серии — 6. Летальность животных оценивали через 24 ч после введения соединений. По методу Литчфилда — Уилкоксона рассчитывали ЛД<sub>50</sub> с доверительными 95 % интервалами (табл. 3).

Биологическую активность *ex vivo* изучали на беспородных крысах-самцах массой 200 – 220 г. Животные рандомизированы на 10 групп по 6 особей в каждой: 1-я — интактная, 2-я — контрольная, ИМ, 3-я — ИМ + эталонный препарат доксициклин, 4-я – 10-я — группы, получавшие вновь синтезированные соединения соответственно: VIa, VIb, VIc, VIд, VIe. Эталонный препарат доксициклин (40 мг/кг/сут) и исследуемые соединения в дозе 20 мг/кг/сут вводили внутривентрикулярно через зонд в 0,5 мл физиологического раствора в течение 3 дней, предшествующих экспери-

Таблица 3

ЛД <sub>50</sub> соединений VIa – VIe	
Соединение	ЛД <sub>50</sub> , мг/кг, в/б
VIa	398,8 (265,1 – 599,8)
VIb	955,3 (844,5 – 1082,5)
VIc	1004,0 (898,2 – 1122,3)
VIд	367,7 (312,4 – 432,8)
VIe	475,8 (433,6 – 520,0)

менту. Анестезированных (уретан 1300 мг/кг в/б) животных интубировали и переводили на искусственное дыхание. После торако- и перикардиотомии идентифицировали левую коронарную артерию и производили ее одномоментную перевязку на уровне выхода сосуда из-под ушка сердца. Через 3 ч после перевязки коронарной артерии животных забивали, кровь забирала, центрифугировали 20 мин при 2000 об, забирала сыворотку, хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  до иммуноферментного определения содержания ММП-9 в плазме. Определение содержания ММП-9 проводили с помощью автоматического биохимического и иммуноферментного анализатора "Chem Well 2910 Combi", США. В работе использовали набор RMP900 для иммуноферментного определения крысиного ММП-9 (R&D Systems, США).

Нормальность распределения выборок проверяли с помощью критерия Шапиро — Уилка, гомогенность дисперсий — с помощью критерия Левена. Так как выборки имели нормальное и близкое к нему распределение, и дисперсии были гомогенны, для определения статистической значимости различий использовали однофакторный дисперсионный анализ с последующей обработкой с помощью метода множественных сравнений по Ньюмену — Кейлсу. Результаты выражали в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Критический уровень значимости  $p = 0,05$ .

## ЛИТЕРАТУРА

1. P. Van Lint and C. Libert, *J. Leukoc. Biol.*, **82**, 1375 – 1381 (2007).
2. M. Hori and K. Nishida, *Cardiovasc. Res.*, **81**(3), 457 – 464 (2009).
3. F. G. Spinale, *Physiol. Rev.*, **87**, 1285 – 1342 (2007).
4. А. Г. Гасанов, Т. В. Бершова, *Биомед. химия*, **55**(2), 155 – 168 (2009).
5. K. S. Moshal, *Physiol. Res.*, **57**, 379 – 384 (2008).
6. J. Simova and J. J. Serum, *Folia Biol.*, **59**(5), 181 – 187 (2013).
7. P. Jain, C. Saravanan, S. K. Singh, *Eur. J. Med. Chem.*, **60**, 89 – 100 (2013).
8. T. J. Peterson, H. Hallak, L. Johnson, et al., *Circulation*, **103**, 2303 – 2309 (2001).
9. L. E. Rohde, A. Ducharme, L. H. Arroyo, et al., *J. Am. Heart Assoc.*, 3063 – 3070 (1999).
10. W. M. Yarbrough, R. Mukherjee, G. P. Escobar, et al., *Circulation*, **108**, 1753 – 1759 (2003).

11. M. P. Hudson, P. W. Armstrong, W. Ruzylo, et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **48**, 15 – 20 (2006).
12. R. P. Verma, C. Hansch, *Bioorg. Med. Chem.*, **5**, 2223 – 2268 (2007).
13. D. P. Becker, T. E. Barta, L. J. Bedell, et al., *J. Med. Chem.*, **53**, 6653 – 6680 (2010).
14. J. M. Cathcart and J. Cao, *Frontiers in Bioscience, Landmark*, **20**, 1164 – 1178 (2015).
15. M. Whittaker, C. D. Floyd, P. Brown, et al., *Chem. Rev.*, **99**, 2735 – 2776 (1999).
16. G. Cerisano, P. Buonamici, A. M. Gori, et al., *Int. J. Cardiol.*, **197**, 147 – 153 (2015).
17. G. Cerisano, P. Buonamici, R. Valenti, et al., *Eur. Heart J.*, 1 – 8 (2013).
18. G. Cerisano, P. Buonamici, R. Valenti, et al., *Basic Res. Cardiol.*, 1 – 9 (2014).
19. T. Sadowski and J. Steinmeyer, *Inflamm. Res.*, **50**(3), 175 – 82 (2001).
20. M. L. Lindsey, *Global J. Hum. Anat. Physiol. Res.*, **1**, 6 – 9 (2014).
21. C. Camodeca, E. Nuti, L. Tepshi, et al., *Eur. J. Med. Chem.*, **111**, 193 – 201 (2016).
22. R. Oltenfreiter, L. Staelens, A. Lejeune, et al., *Nucl. Med. Biol.*, **31**, 459 – 468 (2004).
23. A. Tochowicz, K. Maskos, R. Huber, et al., *J. Mol. Biol.*, **371**, 989 – 1006 (2007).
24. M. Whittaker and A. Ayscough, *Celltransmissions*, **17**(1), 3 – 14 (2001).
25. B. Pirad and H. Matter, *J. Med. Chem.*, **49**(1), 51 – 69 (2006).
26. Patent US No. 5985900 A (1999).
27. Y. Tamura, F. Watanabe, T. Nakatani, et al., *J. Med. Chem.*, **41**, 640 – 649 (1998).
28. D. Yamamoto and S. Takai, *Cur. Med. Chem.*, **16**, 1349 – 1354 (2009).
29. R. A. Friesner, R. B. Murphy, M. P. Repasky, et al., *J. Med. Chem.*, **49**, 6177 – 6196 (2006).
30. T. A. Halgren, R. B. Murphy, R. A. Friesner, et al., *J. Med. Chem.*, **47**, 1750 – 1759 (2004).
31. Schrödinger Release 2015-4: Maestro, version 10.4, Schrödinger, LLC, New York, NY (2015).
32. R. J. Cremlyn, F. S. Swinbourne, A. Batchelor, et al., *Indian J. Chem., Section B: Organic Chem. Including Med. Chem.*, **2**(10), 1029 – 1043 (1983).
33. Y. Wang, D. Zhu, L. Tang, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 8917 (2011).
34. M. Tamura, D. Murase and K. Komura, *Synthesis (Germany)*, **47**(6), 769 – 776 (2015).
35. A. Van den Nieuwendijk, D. Pietra, L. Heitman, et al., *J. Med. Chem.*, **47**, 663 – 672 (2004).
36. J. DeRuiter, R. F. Borne, and C. A. Mayfield, *J. Med. Chem.*, **32**(1), 145 – 151 (1989).

Поступила 24.03.17

## DESIGN, SYNTHESIS AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF A NEW INHIBITOR OF MATRIX METALLOPROTEINASE-9

O. S. Grigorkevich, G. V. Mokrov, A. S. Dyabina, V. N. Stolyaruk, I. B. Tsorin, E. O. Ionova, S. A. Kryzhanovskii, T. A. Gudasheva, and A. D. Durnev

Zakusov State Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125315 Russia

\* e-mail: tata-sosnovka@mail.ru

New inhibitor of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), 1-{4-[(4-chlorobenzoyl)amino]phenyl}sulphonyl-L-proline, with the theoretical inhibitory constant  $IC_{50} = 4 \cdot 10^{-5}$  M has been designed based on the structural requirements for selective inhibitors of gelatinases. Synthesis of the designed compound and its close structural analogs was accomplished and their low toxicity ( $LD_{50}$  300 mg/kg) was shown. The new inhibitor in a dose of 20 mg/kg per day orally under conditions of acute myocardial infarction significantly reduced the number of immunoreactivity of MMP-9 in the blood plasma of rats at the level of doxycycline.

**Keywords:** matrix metalloproteinases; gelatinase B; inhibitors of MMP-9; benzoylamino(phenylsulfonyl)amino acids; cardioprotective agent; early post-myocardial infarction remodeling.