

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА  
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики  
доц., к.б.н. Олексій Нипорко  
Протокол №\_\_\_\_ засідання кафедри  
від «\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 р.

***IN SILICO* ТА *IN VITRO* АНАЛІЗ ЦИТОТОКСИЧНОСТІ  
НОВОСИНТЕЗОВАНИХ ФТОРОВАНИХ НУКЛЕОЗИДІВ**

Дипломна робота  
студента 4-го курсу  
спеціальності 091 Біологія  
ОП «Біологія (високі технології)»  
**Чубатого Кирила**

Науковий керівник від кафедри  
доцент кафедри молекулярної  
біотехнології та біоінформатики  
к.б.н. **Самофалова Дарія**

Робота виконана у лабораторії Інституту мікробіології і вірусології імені  
Д.К. Заболотного НАН України під керівництвом с.н.с., к.б.н.  
**Загородньої Світлани**

Київ – 2023 р.

## АНОТАЦІЯ

Чубатий К.П. – *In silico* та *in vitro* аналіз цитотоксичності новосинтезованих второваних нуклеозидів. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

У роботі проведено розрахунок цитотоксичності сполук використовуючи метод МТТ, дослідження проводилося на трьох культурах клітин, а саме MDCK, B95-8 та Wish; та проведено аналіз фізико-хімічних параметрів, параметрів медичної хімії та профілю ADMET, використовуючи програмне забезпечення ADMET lab 2.0. Також для підтвердження отриманих даних, результати були порівняні з зітвердженими FDA лікарськими фторованими нуклеозидами.

Встановлено, що всі досліджені речовини показали хороший результат, мають високий потенціал і можуть бути в подальшому більш глибоко досліджені для можливого використання в медицині. Також було встановлено, що визначення токсичності *in silico* підтверджує лабораторні методи та розширює показники речовини, що свідчить про доцільність використання модельних досліджень.

Отримані результати можуть мати важливе значення як для розробки нових антивірусних та протипухлинних препаратів на основі фторованих нуклеозидів, так і для подальших досліджень сполук використаних в роботі. Результати також довели доцільність застосування методів *in vitro* та *in silico* на ранніх стадіях аналізу сполук, потенційно використовуваних в медицині.

**Ключові слова:** фторовані нуклеозиди, цитотоксичність, МТТ, ADMET.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	5
ВСТУП .....	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	7
1.1 Фторовані нуклеозиди в медицині .....	7
1.1.1 Загальна характеристика аналогів нуклеозидів і їх фторованих форм.....	7
1.1.2 Приклади противірусного лікування фторованими нуклеозидами	10
1.1.3 Приклади протипухлинного лікування фторованими нуклеозидами .....	11
1.2 ADMET.....	13
1.2.1 Загальна характеристика ADMET .....	13
1.2.2 ADMET в межах <i>in silico</i> підходу.....	15
1.3 Цитотоксичність і її визначення <i>in vitro</i> .....	20
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	23
2.1 Матеріали та реактиви .....	23
2.1.1 Речовини.....	23
2.1.2 Матеріали.....	24
2.2 Дослідження токсичності <i>in-vitro</i> .....	25
2.2.1 Культивування клітин.....	25
2.2.2 Підрахунок клітин у камері Горяєва .....	26
2.2.3 Визначення цитотоксичності за МТТ-методом .....	26
2.2 Дослідження токсичності <i>in-silico</i> .....	27
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	29
3.1 Результати цитотоксичності речовин <i>in vitro</i> .....	29
3.2 Аналіз речовин <i>in-silico</i> .....	32
3.2.1 Сполука 1 .....	32
3.2.2 Сполука 2 .....	36
3.2.3 Сполука 3 .....	39
3.2.4 Сполука 4 .....	43

	4
ВИСНОВКИ.....	47
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	48
ДОДАТКИ.....	55

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

FDA (Food and Drug Administration) - Управління з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів.

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я.

5-FU - 5-fluorouracil.

TFT – trifluorothymidine.

TMP – thymidinemonophosphate.

FTC – emtricitabine.

RCV – racivir.

dFdC – 2',2'-difluorodeoxycytidine.

ADMET – це набір розрахункових дескрипторів, які передбачають значення потенційних абсорбції, транспорту, метаболізму, виведення, токсичності.

QED - quantitative estimate of drug-likeness - кількісна оцінка схожості з ліками.

MCE-18 -medicinal chemistry evolution 2018 - еволюція медичної хімії 2018.

НІА - human intestinal absorption - кишкова абсорбція людини.

РРВ - plasma protein binding - зв'язування з білками плазми.

ВВВ/РВВ - prediction of blood-brain barrier – передбачення проникності гематоенцефалічного бар'єру.

Н-НТ - human hepatotoxicity – людська гепатотоксичність.

ДІЛІ - drug induced liver injury - медикаментозне ураження печінки.

FDAMDD - FDA maximum daily dose – рекомендована щоденна доза.

МТТ - метилтіазолілтетразолію.

## ВСТУП

В сучасному світі, пошук нових та ефективних лікарських засобів є надзвичайно важливою та актуальною проблемою. Одним із напрямків досліджень, що нині активно розвиваються, задля підвищення ефективності та безпечності препаратів, є фторування малих органічних молекул ефекторів. Серед, яких виділяються фторовні нуклезиди, які проявляють значний потенціал у боротьбі з різними захворюваннями, зокрема вірусними та онкологічними [1].

Фторування як вже існуючих, так і потенційно активних лікарських речовин є покращення їх фармакокінетичних властивостей. Фторовані речовини значно змінюють власний ADMET профіль у напрямку підвищення біодоступності, збільшення стабільності, проникності, селективності і як наслідок ефективності [2]. Важливою властивістю, яка може неоднозначно змінюватись внаслідок фторування є загально біологічна токсичність таких сполук.

**Мета** цієї роботи полягає у *in vitro* та *in silico* вивченні та оцінці цитотоксичності новосинтезованих фторованих нуклеозидів і їх похідних наданих Інститутом органічної хімії НАН України, які є об'єктом дослідження. Результати цієї роботи можуть мати важливе значення для подальшого розроблення нових антивірусних та протипухлинних препаратів на основі фторованих нуклеозидів.

Для досягнення означеної мети були поставлені такі **завдання**:

1. Провести культивування клітин для досліджень
2. Підрахувати життєздатні клітини в камері Горяєва
3. Визначити цитотоксичність методом МТТ
4. Провести аналіз токсичності *in silico*
5. Порівняти отримані результати з лікарськими фторованими нуклеозидами затвердженими FDA.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Фторовані нуклеозиди в медицині

#### 1.1.1 Загальна характеристика аналогів нуклеозидів і їх фторованих форм

Нуклеозиди (лат. *nucleus* — ядро) — двокомпонентні органічні сполуки, які складаються з азотистої основи пуринового чи піримідинового ряду та пентози-D-рибози або 2-дезоксид-рибози. Азотиста основа і пентоза сполучені між собою  $\beta$ -N-глікозидним зв'язком, який утворюється між N1-атомом піримідинової азотистої основи або N9-атомом пуринової азотистої основи і C-1'-атомом пентози (D-рибози або 2-дезоксид-рибози) [3]. Протягом десятиліть нуклеозиди становили наріжний камінь протівірусної, протипаразитарної та протипухлинної терапії та використовувалися як інструменти для вивчення структури та функції нуклеїнових кислот [4-5].

Модифіковані нуклеозиди пуринового та піримідинового ряду виступають у ролі антиметаболітів і використовуються в медичній практиці. Напр., протівірусний препарат ацикловір — 9-(2-гідрокси)етоксиметилгуанін — аналог пуринового нуклеозиду дезоксигуанозину, нормального компонента ДНК. Схожість їх структур дозволяє ацикловіру взаємодіяти з вірусними ферментами, що призводить до гальмування реплікації ДНК вірусу герпесу. В офтальмологічній практиці використовують індоксуридин (офтан-IDU)-5-йод-2'-дезоксидуридин як протівірусний препарат, який вибірково діє на реплікацію деяких вірусів [6].

Відкриття нуклеозидів пов'язане з роботою багатьох вчених, історія яких сягає кількох десятиліть. Основні відкриття в галузі нуклеозидів були зроблені вченими, такими як Фрідріх Мішер, Александр Тодд, Максимільян Брунота іншими. У 1869 році Фрідріх Мішер виділив нову речовину з ядра

лейкоцитів, яку він назвав "нуклеїною кислотою". Це було перше відкриття, пов'язане з нуклеїновими кислотами, які є основою для нуклеотидів і нуклеозидів. У подальшому дослідження Александра Годда спрямовувалися на синтез нуклеотидів та нуклеозидів. Він зробив значний внесок у вивчення структури та функцій нуклеотидів, а також у синтезі широкого спектру нуклеозидів [7].

За останні двадцять років фторування нуклеозидів зарекомендувало себе як найбільш перспективний інструмент для отримання біологічно активних сполук, які могли б підтримувати клінічні випробування, впливаючи на фармакодинаміку та фармакокінетичні властивості [8]. Включення атома (атомів) фтору в молекулу, синтезовану як лікарський засіб, може надати ряд хімічних, фізичних і біологічних властивостей. Поєднання переваг заміщення фтору з усталеними терапевтичними засобами класу нуклеозидів призвело до ряду клінічно перевірених молекул ліків, які використовуються як у противірусній, так і в протипухлинній терапії. Дійсно, серед 15 схвалених FDA США цитотоксичних антиметаболітів на основі піримідину та пурину фторовмісні аналоги нуклеозидів складають значний клас хіміотерапевтичних засобів, які широко використовуються в лікуванні [9].

За оцінками, понад 20% ліків і нових препаратів-кандидатів містять фтор у своїй хімічній структурі [10,11]. Фтор має здатність підвищувати ліпофільність, яка разом із розміром молекули впливає на проникність мембрани молекули, відіграючи важливу роль в оптимізації пероральної біодоступності препаратів-кандидатів. Статус фтору як найбільш електронегативного атома в періодичній системі (3,98 за шкалою Полінга) також впливає на кислотні та основні властивості сусідніх функціональних груп шляхом модифікації  $pK_a$  молекули. Це впливатиме на його токсичність, селективність, ефективність, а також фармакодинамічні та фармакокінетичні властивості. Крім того, сильно поляризований зв'язок C–F часто забезпечує кращу стабільність самої молекули. Оскільки фтор є дуже маленьким

атомом, подібним за розміром до Н (радіус Ван-дер-Ваальса 1,47 Å порівняно з 1,20 Å для Н), фтор зазвичай використовується для заміни групи Н чи ОН у біоактивних молекулах, викликаючи мінімальні стеричні збурення. Однак, змінюючи Н-зв'язувальні взаємодії, він може блокувати окислювальний метаболізм і утворення небажаних метаболітів. [12, 13]

Подібно до інших модифікованих нуклеозидів, фторовані нуклеозиди імітують природні нуклеозиди з точки зору їх поглинання клітинами та метаболізму. Їх біологічна активність проявляється найчастіше через дію метаболітів 5'-трифосфату. Ці активні види утворюються після поглинання, опосередкованого транспортом нуклеозидів, шляхом внутрішньоклітинного поетапного фосфорилування. Нуклеозиди у своїх активних фосфорильованих формах можуть пригнічувати ріст і поділ клітин шляхом пригнічення синтезу попередників ДНК і РНК *de novo* [14], а також шляхом інгібування внутрішньоклітинних ферментів, таких як людські або вірусні полімерази, RNR [15] і TS [16]. ]. Протипухлинні фторовані нуклеозиди представлені 5-фторурацилом (5-FU), який є одним із перших протипухлинних препаратів, коли-небудь схвалених FDA, і є частиною основних лікарських засобів, присутніх у списку ВООЗ. (5-FU) разом зі своїм аналогом 2'-дезоксирибози 5-фтор-2'-дезоксидурином (FUDR) схвалений і зараз використовується для лікування значних пухлин, включаючи карциноми шлунка, товстої кишки, молочної залози та яєчників.

Фторовані нуклеозиди представлені великою родиною сполук, які використовуються як противірусні препарати, оскільки більшість методів лікування надзвичайно важливих для людини патогенів базується на застосуванні нуклеозидних агентів, включаючи стратегії лікування вірусу простого герпесу (HSV), вірусу вітряної віспи (VZV), цитомегаловірусу людини (HCMV), вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ) і вірусу гепатиту В (HBV). За деякими винятками, ці сполуки зазвичай проявляють свою противірусну дію, пригнічуючи важливий етап у життєвому циклі вірусу, реплікацію вірусного геному, націлюючись на вірусну полімеразу (pol) або

ферменти RT. Активною формою цих нуклеозидів, спрямованих на синтез вірусної нуклеїнової кислоти, є 5'-трифосфат. Оскільки кроком, що обмежує швидкість для активації нуклеозиду до їх трифосфатних форм, є перше фосфорилування до монофосфатних видів, були розроблені різні стратегії проліків для доставки нуклеозидмонофосфату в інфіковані клітини. Як засіб для значного покращення їхніх біологічних профілів і метаболічних властивостей, фтор присутній у структурах різних противірусних нуклеозидів, які зараз схвалені або проходять клінічні випробування [17].

Першим схваленим фторованим противірусним нуклеозидом був трифлуридин (TFT), препарат проти вірусу герпесу, схвалений у 1980 році, який використовується переважно у вигляді очних крапель для лікування кератиту та кератокон'юнктивіту, пов'язаного з інфекціями ока, викликаними простим герпесом типу 1 і 2 [18].

### **1.1.2 Приклади противірусного лікування фторованими нуклеозидами**

Лікування ВІЛ. Фторовані нуклеозидні інгібітори зворотної транскриптази (NRTI), такі як емтрицитабін (FTC) і рацивір (RCV), є важливою категорією схвалених FDA препаратів для лікування ВІЛ типу 1. Емтрицитабін (FTC) — це 5-фтордезоксцитидин, схвалений у 2003 році та входить до переліку важливих лікарських засобів, складених ВООЗ [19]. Він терапевтично використовується для лікування ВІЛ-інфекції як у дорослих, так і у дітей шляхом інгібування зворотної транскриптази [20]. Емтрицитабін складається з цитозинової основи з атомом фтору в положенні С-5 і незвичайним оксатіолановим кільцем як цукровою частиною. Рацивір (RCV) є енантіомером емтрицитабіну. Це широко використовуваний нуклеозидний інгібітор зворотної транскриптази, розроблений компанією Pharmasset для лікування ВІЛ, і зараз він проходить фазу 2b клінічних випробувань; він блокує подальше збільшення кількості вірусу ВІЛ в організмі. 71 Рацивір є рацемічною сумішшю двох β-енантіомерів емтрицитабіну [21].

Лікування гепатиту С. Софосбувір (Sovaldi®, GS7977) РНК-залежним інгібітором РНК-полімерази, схваленим FDA у 2013 році, виготовленим компанією Gilead Sciences, Inc. Фосфорилування підвищує як проникність клітин, так і біодоступність при пероральному прийомі. Цей нуклеозидний аналог втручається в життєвий цикл HCV (Hepatitis C Virus), пригнічуючи реплікацію вірусу. Він може бути інтегрований з РНК HCV за допомогою полімерази NS5B, що призводить до руйнування ланцюга [22].

Лікування очних інфекцій. Трифлуридин (трифтортимідин або TFT) був схвалений FDA у 1980 році. Застосовується при вірусних інфекціях очей, спричинених, зокрема, вірусом простого герпесу, і не впливає на бактерії та грибки. Крім того, комбінована терапія трифлуридином і типірацилом є корисною як пероральний протипухлинний засіб при раку товстої або прямої кишки. Трифлуридин є інгібітором тимідилатсинтетази та ДНК-полімерази. Це суїцидальний субстрат, який перетворюється на необоротний інгібітор в активному центрі ферменту, запобігаючи перетворенню дезоксиуридинмонофосфату (dUMP) у тимідинмонофосфат (TMP), що є вирішальним кроком у біосинтезі ДНК. Це призведе до апоптозу та зміни реплікації вірусних або ракових клітин [23].

### **1.1.3 Приклади протипухлинного лікування фторованими нуклеозидами**

Як уже було згадано вище, одним із перших протипухлинних засобів, схвалених FDA, був 5-фторурацил (5-FU), і разом із його фторованим аналогом 5-фтор-2'-дезоксиуридином (FdUrd) все ще присутні в клінічній практиці для лікування пацієнтів із значними пухлинами, включаючи рак товстої кишки, шлунка, молочної залози та підшлункової залози. Для прояву активності обидві сполуки після внутрішньоклітинного поглинання повинні метаболізуватися до 5'-монофосфатної форми FdUMP, яка утворює стабільний потрійний комплекс із тимідилатсинтазою (TS) і відновленим кофактором 5,10-метилентет-рагідрофолатом (5,10-CH<sub>2</sub>-THF). Як наслідок,

TS залишається в пастці потрійного комплексу TS/FdUMP/mTHF, викликаючи незворотне пригнічення його ферментативної функції [24-25]. Таким чином, утворення тимідинмонофосфату (TMP), будівельного блоку для синтезу та відновлення ДНК, зменшується.

Однак ефективність 5-FU у лікуванні обмежена, оскільки менше третини пацієнтів досягають очікуваної відповіді [26]. Крім того, також повідомлялося про вроджені та набуті механізми резистентності. Саме тому багато проліків 5-FU (включаючи капецитабін, тегафур, доксифлуридин і кармофур, були розроблені для вирішення ключових механізмів резистентності та зараз використовуються в клініці. Капецитабін, що вводиться перорально, є єдиний з усіх засобів вище, використовується для лікування метастатичного раку молочної залози (резистентного як до паклітакселу, так і до антрацикліну), метастатичного колоректального раку та ад'ювантного раку товстої кишки [27].

Другим відомим і клінічно широко використовуваним фторованим протипухлинним засобом є гемцитабін (2'-дезоксидифтороцитидин, dFdC), схвалений для лікування раку підшлункової залози, недрібноклітинного раку легень, яєчників і молочної залози [28-29]. Активна форма dFdC, трифосфатна форма (dFdC-TP), включається в ланцюг ДНК під час S-фази клітинного циклу, викликаючи масковане припинення синтезу ДНК і, зрештою, загибель клітини. Інший ключовий активний метаболіт dFdC, дифосфатна форма (dFdC-DP), значною мірою сприяє протираковій активності dFdC шляхом інгібування рибонуклеотидредуктази (RNR). Це призводить до виснаження природного пулу дезоксинуклеотидів (основних субстратів для синтезу ДНК) і, як наслідок, посилює включення dFdC-TP замість природних дезоксинуклеотидів як субстрату для ДНК-полімерази [30].

Флударабін (FAMP) являє собою ефективну та широко досліджену пуриновий вторований нуклеозид який використовується як засіб першої та другої лінії при лікуванні В-клітинної хронічної лімфоцитарної лейкемії (В-

CLL) [31]. Флударабін також використовується в комбінованому лікуванні, зокрема в хіміоімунотерапії в комбінації з ДНК-алкілюючим агентом циклофосфамідом і моноклональним антитілом ритуксимабом для лікування пацієнтів з CLL [32]. Основним активним метаболітом флударабіну є 5'-трифосфат (F-ara-ATP), який як альтернативний субстрат для природного дезоксинуклеотиду (dATP) інгібує ДНК-полімерази. Крім того, F-ara-ATP може інгібувати інші ферменти, що беруть участь у синтезі ДНК, такі як ДНК-праймаза, ДНК-лігаза та RNR [33-34].

## 1.2 ADMET

### 1.2.1 Загальна характеристика ADMET

Успішний препарат повинен досягати точно налаштованої комбінації біохімічної поведінки, фармакокінетики та безпеки. На додаток до високої ефективності та селективності, профіль бажаного поглинання, розподілу, метаболізму, виведення та токсичності (ADMET) є не менш важливим для успіху препарату-кандидата [36-37]. Якщо говорити точніше, то ідеальний лікарський засіб має належним чином надходити в організм, розумно розподілятися між різними тканинами та органами, метаболізуватися, виводитися відповідним чином і підтверджуватися нетоксичністю [38]. Ці питання здаються різними, але тісно взаємопов'язаними, охоплюючи весь процес від адміністрування до ліквідації.

ADMET - це комплексний підхід до вивчення фармакокінетики та фармакодинаміки речовин в організмі. Він дозволяє оцінити, як організм взаємодіє з речовиною після її прийому та як ця речовина метаболізується та виводиться з організму. Процес включає наступні етапи:

Абсорбція. Це процес, в якому речовина потрапляє в організм через різні шляхи, такі як пероральний прийом, внутрішньовенне введення, вдихання або зовнішнє застосування. Абсорбція залежить від речовини, її

фізико-хімічних властивостей, таких як розчинність, молекулярна вага та ліпофільність, а також від шляху введення і функцій системи травлення.

**Транспорт.** Після абсорбції речовина розподіляється по організму через кровоносну систему. Цей процес визначає, як речовина розподіляється між різними органами і тканинами, включаючи центральну нервову систему, печінку, нирки та інші. Розподіл залежить від речовини, її зв'язку з білками крові, проникності через бар'єри (наприклад, гематоенцефалічний бар'єр) та фізіологічних факторів.

**Метаболізм.** В організмі речовина може бути піддана метаболізму, що означає хімічні перетворення речовини. Цей процес зазвичай відбувається в печінці та може включати різні реакції, такі як окислення та кон'югація. Метаболізм може змінювати активність, токсичність та фармакологічні властивості речовини.

**Виведення.** Це процес, за якого речовина покидає організм. Основними шляхами виведення є виділення через нирки, виділення через кишечник, а також виділення через легені або шкіру. Виведення речовини залежить від її хімічних властивостей, фізіологічних процесів та функцій органів виділення.

**Токсичність.** Дослідження токсичності дозволяють встановити дози, при яких речовина може бути безпечно використана, а також виявити можливі шкідливі впливи на органи та системи організму [39].

З безперервним накопиченням експериментальних даних ADMET було розроблено велику кількість моделей прогнозування *in silico* для багатьох кінцевих точок, щоб допомогти ефективно оцінити ADMET. Більш конкретно, вони могли б допомогти хімікам-медикам з двох аспектів: 1) виключення небажаних сполук на етапі розробки ліків; 2) отримання своєчасного зворотного зв'язку інформації ADMET для оптимізації потенційних ліків. За останні кілька років було проведено багато досліджень *in silico* щодо параметрів ADMET. Тим часом було розроблено та використано різноманітні веб-інструменти для пошуку ліків, такі як

ADMETlab, FAF-Drugs4, admetSAR, SwissADME, ProTox-II, pkCSM тощо [40-45].

Всі ці моделі *in silico* використовуються для прогнозування ADMET, але для їх створення потрібні величезні обсяги даних. Якість і кількість даних тісно пов'язані з точністю прогнозування моделі, тому надійні експериментальні дані є ключем до успішного прогнозування. Наразі існують деякі бази даних, які можуть допомогти у прогнозуванні ADMET, наприклад база даних ADME, SuperToxic, PKKB і DSSStox та ін. Використовуючи ці бази даних, користувачі можуть отримати корисні набори даних для використання у зовнішніх алгоритмах для створення моделей прогнозування. Бази даних також можна використовувати безпосередньо для виконання передбачень за допомогою функцій пошуку, таких як пошук подібності або передбачення. Крім того, ці моделі можна оновлювати, коли до бази даних додаються нові експериментальні дані [46].

### 1.2.2 ADMET в межах *in silico* підходу

#### Фізико-хімічні властивості

Найважливіші фізико-хімічні властивості сполуки для даного дослідження включають ліпофільність, розчинність та молекулярну масу [47].

Ліпофільність ( $\log P$ ). Ліпофільність органічних молекул зазвичай кількісно визначається як  $\log P_{o/w}$ , де  $P$  є рівноважним співвідношенням розчинності сполуки в октанолі та водні. Речовини з вищим значенням  $\log P$  вважаються більш ліпофільними і можуть краще проникати через гідрофобні бар'єри. Прогнозування  $\log P$  є необхідною умовою для фармацевтичної промисловості для оптимізації фармакодинаміки та фармакокінетичних властивостей досліджуваних речовин [48-49].

Розчинність ( $\log S$ ). Щоб поглинатися, препарат спочатку повинен бути розчинним у воді, а потім мати можливість проникати через біологічні мембрани [50]. Для методів прогнозування розчинності з першого принципу був запропонований термодинамічний цикл, який розкладає процес розчинення на сублімацію молекул із кристала в пару та з пари в розчин. Розчинність є критичним фактором для успішної формулювання лікарських речовин, оскільки вона впливає на їх біодоступність і можливість поглинання організмом. Висока розчинність у воді сприяє ефективному розподілу речовини у системі, що може полегшити її поглинання та доставку до місця дії [51].

Розподіл і дифузія ліків значною мірою залежать від ступеня іонізації ліків при фізіологічному рН, оскільки нейтральні види сполук є більш ліпофільними, тоді як іонізовані є полярними та розчинними у воді. Рівноважні співвідношення між іонізованою та нейтральною формами ліків можуть впливати на їх фармакокінетичні властивості, такі як швидкість поглинання, об'єм розподілу та виведення з організму. Врахування  $pK_a$  ліків дозволяє прогнозувати їх поведінку у фізіологічних умовах і розробляти стратегії оптимізації фармакокінетичних властивостей для досягнення бажаного клінічного ефекту [52].

Також для проведення загального аналізу речовини необхідно мати на увазі параметрами які описують топологію речовини ( $nAtoms$ ,  $nBonds$ ,  $nRings$ ,  $nHet$ ,  $nRot$  - які описують кількість атомів, зв'язків, кілець, гетероатомів та обертів у молекулі відповідно) а також її молекулярну масу ( $MW$ ) яка може впливати на розподіл, метаболізм та виділення речовини в організмі.

### **Параметри медичної хімії**

Одним із найперших застосувань фізико-хімічних властивостей у відкритті та розробці ліків є оцінка схожості ліків. Наприклад, відоме

«Правило 5» (Ro5/ Lipinski rule), яке було оприлюднено Ліпінським та ін., базується на спостереженні фізіологічних властивостей більшості пероральних препаратів. Ro5 використовувався для вибору сполук, які, ймовірно, будуть біодоступними при пероральному прийомі на основі п'яти простих правил, які пов'язані з молекулярними властивостями, а саме: молекулярна маса менше 500, ліпофільність ( $\log P$ ) менше 5, кількість водневих акцепторів не більше 10, кількість водневих донорів не більше 5 та поверхнева площа атомів акцепторів та донорів не перевищує  $140 \text{ \AA}^2$  [53].

Нещодавно Бікертон та ін. повідомили про кількісну оцінку схожості з ліками, засновану на концепції бажаності, яка називається кількісною оцінкою схожості з ліками (QED). QED класифікує сполуки відповідно до їхньої схожості з існуючим лікарськими засобами [54].

У 2018 році вперше було запропоновано «MCE-18» як новий молекулярний дескриптор, який може ефективно оцінювати структури за їх новизною та поточним потенціалом виведення на відміну від простого та в багатьох випадках хибнопозитивного індексу  $sp3$ . MCE-18 можна легко застосувати для оцінки новизни фармакологічно значущих молекул а також він може допомогти дослідникам у розробці нових хімічних речовин, які мають великий потенціал у розробці сучасних ліків. Цей індекс також можна ефективно використовувати для профілювання бібліотек, орієнтованих на HTS (High-Throughput Screening), і для встановлення пріоритетів молекул [55].

### **Абсорбція, транспорт, метаболізм**

Пероральне введення ліків є найбільш ефективним способом, який пов'язаний з високим рівнем сприйняття пацієнтом. НІА (Human Intestinal Absorption), як ключова процедура перорального всмоктування, є однією з найважливіших властивостей ADME на ранніх етапах виявлення та оптимізації речовин. НІА використовується для оцінки спроможності

лікарських речовин проникати через кишковий тракт людини і поглинатися в систему кровообігу. Оцінка НІА включає в себе експериментальні методи, які дозволяють визначити розчинність лікарських речовин у шлунковому середовищі, їх пермеабельність через клітини кишкового епітелію та їх стабільність під час травлення. Ці дані використовуються для розрахунку НІА, який виражається в відсотках і вказує на ймовірність поглинання лікарської речовини після прийому преорально [56].

PBB (Prediction of Blood-Brain Barrier) - це методологія, яка використовується для прогнозування проникнення речовин через кровомозковий бар'єр (BBB). BBB є бар'єрною системою, яка розділяє кров'яний потік від центральної нервової системи і контролює проникнення речовин до мозку. Методологія PBB базується на розробці математичних моделей та використанні комп'ютерних алгоритмів для прогнозування проникнення речовин через BBB, використовуючи фізико-хімічні властивості речовини [57].

Прогнозування метаболізму є пріоритетним напрямком досліджень у багатьох галузях, включаючи фармацевтику, безпеку харчових продуктів та дослідження навколишнього середовища. Оскільки метаболічна схильність є основною проблемою безпеки для фармацевтичних досліджень, вона може призвести до ряду проблем, таких як низька біодоступність через посилений кліренс; токсичні ефекти, викликані накопиченням препарату; і небажані лікарські взаємодії, включаючи інгібування ферментів, індукцію та механізмнену інактивацію. В даний час моделі прогнозування, пов'язані з метаболізмом засновуються на моделі взаємодії ферментів з ксенобіотиками, які часто використовувалися для визначення того, чи є ксенобіотик субстратом або інгібітором монооксигеназної системи цитохрому P450 (CYP450s), і потім для оцінки лікарських взаємодій [58].

## **Токсичність**

Токсичність — це властивість речовини або матеріалу викликати шкідливі ефекти на живі організми, вона залишається однією з найважливіших причин невдачі розробки ліків на пізній стадії. Критичним пріоритетом у розробці ліків є раннє виявлення серйозної токсичності до того, як будуть витрачені час і ресурси на пізніх стадіях. ADMET дає змогу проаналізувати наступні параметри токсичності.

Блокування hERG рецепторів. Основна функція hERG каналу полягає в контролі реполяризації кардіоміоцитів, що є важливим кроком у серцевому циклі. Блокування hERG каналу деякими речовинами може призвести до затримки реполяризації серця і викликати довгий QT інтервал на електрокардіограмі. Що внаслідок збільшує ризик розвитку серцевих аритмій, зокрема тромбоемболії та судинного спазму, які можуть мати смертельні наслідки [59].

Гепатотоксичність (Н-НТ). Для визначення Н-НТ використовуються різноманітні інструменти та моделі, засновані на експертному знанні, клінічних даних та інформації про структуру речовини. Ці моделі дозволяють прогнозувати ймовірність токсичності для печінки, допомагаючи відсіяти потенційно небезпечні сполуки на ранніх етапах їхнього розвитку [60].

Ризик токсичності для печінки (DILI). Оцінка параметра DILI базується на різних даних, включаючи клінічні дослідження, результати токсикологічних випробувань, структурні властивості речовини та її вплив на функцію печінки. Розроблені моделі та алгоритми дозволяють прогнозувати ризик DILI та класифікувати речовини на основі їхньої токсичності для печінки [61].

FDAMDD. В оцінці токсичності та безпеки лікарських засобів FDA Maximum Daily Dose є важливим фактором, що враховується при визначенні безпечних дозувань та рекомендацій для хворих. Встановлення максимальної добової дози допомагає забезпечити безпеку пацієнтів і знизити ризики від надмірного вживання препарату [62].

Skin Sensitization. Сенсibilізація шкіри, яку іноді називають

алергічним контактним дерматитом (АКД), вважається однією з найбільших причин виробничого травматизму в США. Експериментальні методи виявлення шкірної сенсibilізації включають стандартний максимізаційний тест на морських свинках, тест Бюлера (також виконується на морських свинках) і нещодавно розроблений аналіз місцевих лімфатичних вузлів мишей (LLNA) [63].

**Carcinogenicity.** Це оцінка потенційного канцерогенного ефекту речовини, тобто її здатності спричинити ракові захворювання у людей або тварин. Оцінка карциногенності включає проведення різних тестів і досліджень, щоб встановити, чи існує зв'язок між впливом речовини і розвитком раку. Такі дослідження можуть включати тестування на тваринах, аналіз епідеміологічних даних, використання *in vitro* моделей та інші методи оцінки [64].

**Respiratory Toxicity.** Оцінка параметру Respiratory Toxicity включає проведення спеціальних токсикологічних досліджень, які включають експозицію речовини на дихальну систему тварин або інших моделей, а також оцінку патологічних змін, запалення, подразнення та інших ознак токсичності в дихальній системі. Результати цих досліджень дозволяють оцінити потенційну шкідливість речовини для дихальної системи та прийняти відповідні заходи безпеки для її захисту [65].

### **1.3 Цитотоксичність і її визначення *in vitro***

Цитотоксичність визначається як токсичність, спричинена дією хіміотерапевтичних засобів на живі клітини. Дослідження цитотоксичності дозволяють виявити потенційну шкоду, яку може заподіяти речовина на клітинному рівні. Це важливий етап у відборі лікарських препаратів, оцінці безпеки хімічних речовин та вивченні ефектів на середовище та живі організми. Для визначення цитотоксичності використовуються різні методи *in vitro* досліджень.

Для тесту на проникність мембран мертвих клітин (Dye Exclusion Test) цілісність мембрани є ознакою, яка найчастіше використовується для визначення того, живі чи мертві еукаріотичні клітини, культивовані *in vitro*. Одним із класів молекул, який служить індикатором мертвих клітин, називається «життєвими барвниками». Ці барвники зазвичай не проникні для життєздатних клітин, але можуть проникати в мертві клітини через пошкоджені мембрани. Приклади включають трипановий синій і багато флуорогенних барвників, що зв'язують ДНК. Додавання цих молекул до клітин у культурі призводить до вибіркового фарбування мертвих клітин. Перевагами такого методу є простота у виконанні та візуалізація результату, проте він не дозволяє отримати інформацію про специфічні механізми цитотоксичності, а також може бути вплив різних факторів, які впливають на проникнення барвників, що може спотворити результати [66].

Наявність мертвих клітин, які втратили цілісність мембрани, можна виявити за допомогою вимірювання маркерів, які просочуються з цитоплазми в культуральне середовище. Найпоширенішим маркером, який використовується для цього типу аналізу, є лактатдегідрогеназа [67]. Лактатдегідрогеназа (LDH) каталізує перетворення пірувату в лактат і в процесі перетворює  $\text{NAD}^+$  в  $\text{NADH}$ . Відновна здатність  $\text{NADH}$  може бути використана для відновлення різноманітних молекул субстрату в продукти, які є кольоровими, флуоресцентними або люміногенними. Цей метод є досить стабільним та в нього є перелік недоліків які включають вивільнення  $\text{LDH}$  і в випадку некрозу і в випадку апоптозу, що може стати проблемою для аналізу [68].

Вимірювання ефективності мітохондріальної дегідрогенази, також відоме як аналіз 3-(4,5-диметил-2-тіазоліл)-2,5-дифеніл-2Н-тетразолію броміду (метилтіазолілтетразолію; МТТ), є швидким оцінюванням проліферації клітин і колориметричний аналіз цитотоксичності для вимірювання клітинного метаболізму або функції. Цей тест базується на здатності живих клітин зменшувати жовтий барвник МТТ до формазану,

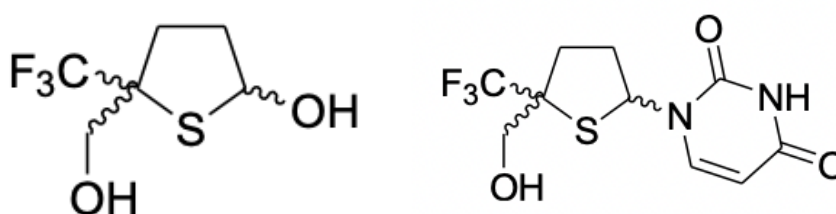
який має фіолетовий колір. Кількість формазану, який утворюється, пропорційна числу живих клітин, що може бути виміряна спектрофотометрично. Аналіз МТТ на даний момент є найбільш часто використовуваним методом для перевірки швидкості росту клітин і токсичності культури. [69]

## РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи дослідження

### 2.1 Матеріали та реактиви

#### 2.1.1 Речовини

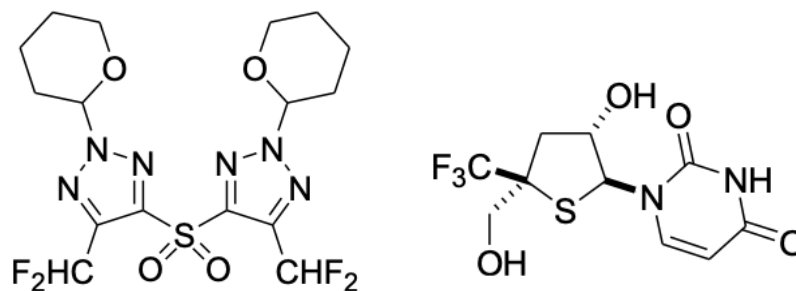
Дослідженні сполуки включали (2RS,5SR)-2-Hydroxy-5- hydroxymethyl-5-(trifluoromethyl) tetrahydrothiophene та (2SR,5SR)-2-hydroxy -5-hydroxymethyl-5-(trifluoromethyl) tetrahydrothiophene\*, в роботі ця речовина позначається як сполука 1, вона зображена на рисунку 1. (2RS,5SR)-2-(2,4-Dioxopyrimidine-1-yl)- -5-hydroxymethyl-5- (trifluoromethyl)tetrahydrothiophene та (2SR,5SR)-2-(2,4-dioxopyrimidine-1-yl)-5-hydroxymethyl-5-(trifluoromethyl) tetrahydrothiophene\*, в роботі ця речовина позначається як сполука 2, вона зображена на рисунку 1. Дані зразки є сумішами діастереомерів, тому наведено назви кожного з компонентів з використанням стереохімічних дескрипторів згідно з R,S-номенклатурою. Оскільки на даний момент не було встановлено відносну конфігурацію усіх компонентів сумішей, структури зображені з використанням хвилястих ліній.



**Рис. 2.1** Структурні формули речовини 1 (зліва) та речовини 2 (справа)

Наступні досліджувані сполуки називалися: Bis(5-difluoromethyl-2-(tetrahydropyran-2-yl)-2H-triazole-4-yl)sulfone, яка в роботі згадується як сполука 3 і зображена на рисунку 2. (2RS,3RS,4RS)-2-(2,4-Dioxopyrimidine-1-

yl)-3-hydroxy-5-hydroxymethyl-5- (trifluoromethyl)tetrahydrothiophene, яка в роботі називається сполука 4 і зображена на рисунку 2.



**Рис. 2.2** Структурні формули речовини 3 (зліва) та речовини 4 (справа)

### 2.1.2 Матеріали

Дослідження цитотоксичності *in vitro* було проведено з використанням трьох різних культур клітин. А саме MDCK, Wish та B95-8. MDCK (Madin-Darby canine kidney cells) - це модельна лінія клітин ссавців, яка використовується в біомедичних дослідженнях.

Клітини MDCK використовуються для широкого спектру досліджень клітинної біології, включаючи дослідження полярності клітини, клітинно-клітинної адгезії, колективної клітинної рухливості, досліджень токсичності, а також реакції на фактори росту [70].

Wish (клітини амніону людини) - це модельна лінія епітеліальних клітин. Використовується у дослідженнях вірусів; сприйнятлива до VSV, аденовірусу 3 та поліовірусу. Використовується для диференціації вірулентного та авірулентного вірусу кору [71].

B95-8 є модельною лінією клітин, яка використовується для вивчення і дослідження вірусу Епштейна-Барр (ВЕБ або EBV) та вірусу герпесу. Ця клітинна лінія була отримана з лімфобластів пацієнта з лімфоми Беркітта, асоційованим з EBV [72].

## 2.2 Дослідження токсичності *in vitro*

### 2.2.1 Культивування клітин

Культури клітин вирощували у стерильних пластикових флаконах (Sarstedt, Німеччина). Росто́ве середовище для MDCK складалося з:

- 46% DMEM (Sigma, США),
- 46% RPMI 1640 (Sigma, США) та
- 8% інактивованої прогріванням при 56°C сироватки великої рогатої худоби - ETC (Sigma, США) з додаванням 100 мкг/мл гентаміцину;  
для Wish – з 92% RPMI 1640, 8% ETC та 100 мкг/мл гентаміцину;  
для B95-8 – з 90% RPMI 1640, 10% ETC та 100 мкг/мл гентаміцину.

Епітеліальні клітини перещеплювали кожні 48 годин, після попередньої перевірки цілісності моношару. Кратність розсіву – 1:10.

Для зняття клітин з поверхні флакона використовували спочатку 0,02% розчин Версену (Sigma, USA), а потім 0,025% розчин трипсину (Sigma, США), далі ресуспендували у поживному середовищі.

Для пересіву лімфобластоїдної культури визначали щільність клітин і розводили ростовим середовищем до  $5 \times 10^5$  кл/мл кожні 48 годин. Культури клітини інкубувались в термостаті при 37°C в атмосфері 5% CO<sub>2</sub>.

При підготовці до досліду, суспензію клітин у поживному середовищі зі щільністю  $2 \times 10^5$  кл/мл для епітеліальних та  $1 \times 10^6$  кл/мл для лімфобластоїдних вносили у лунки 96-лункового планшета по 100 мкл/лунка.

Після інкубування протягом 24 години (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), перевіряли цілісність моношару (не менше 90%) за допомогою світлового інвертованого мікроскопу. За наявності моношару та відсутності контамінації, планшет з клітинами включали в дослідження.

### 2.2.2 Підрахунок клітин у камері Горяєва

Метод підрахунку клітин в камері Горяєва використовується для визначення концентрації клітин у зразку шляхом прямого мікроскопічного підрахунку клітин. Шляхом проведення цього підрахунку було визначено щільність клітин для культивування в попередньому пункті роботи.

Для фарбування використовувався барвник трипановий синій, який є стандартним кольоровим показником для визначення живих та мертвих клітин. Трипановий синій проникає в мертві клітини, де він взаємодіє з неклітинними компонентами і формує синій комплекс. Живі клітини залишаються безбарвними, оскільки їх мембрани не проникні для барвника. Культура клітин вважається придатною для проведення дослідів, якщо частка мертвих клітин становить <5%. Для фарбування трипановим синім до суспензії клітин додавали барвник у пропорції 1:1 і ресуспендували

Наступним кроком для підрахунку клітин було внесення розчину під покривне скельце до повного заповнення одної із камер. Далі препарат поміщався на робочу поверхню мікроскопа, і проводився підрахунок живих і мертвих клітин. Кількість клітин обраховували в 15 великих квадратах двох незалежних площин. Для того аби отримати щільність клітин в 1 мл, отриману кількість необхідно помножити на коефіцієнт  $k = 16665$ .

### 2.2.3 Визначення цитотоксичності за МТТ-методом

МТТ (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолій бромід) - це хімічна сполука, яка використовується для визначення життєздатності клітин. Живі, життєздатні клітини метаболізують субстрат МТТ за допомогою ферментативної системи мітохондрій, перетворюючи його на формазан. Формазан накопичується всередині клітин і утворює фіолетовий осад. Інтенсивність забарвлення пропорційна метаболічній активності клітини або їхній життєздатності [73].

МТТ розчиняли у стерильному фосфатному буфері (ФСБ, рН 7,2) до концентрації 5 мг/мл. Для визначення токсичності речовин, брали підготовлені за добу 96-лункові планшети з клітинами, видаляли з лунок середовище і додавали по 150 мкл розчину сполук, розведених на ростовому середовищі. У такому вигляді плашка інкубувалася 48 годин при 37°C. Потім додавали по 20 мкл розчину МТТ для епітеліальних культур та по 50 мкл для лімфобластоїдних і інкубували протягом 3 годин при 37°C.

Після інкубації з лунок видаляли надосад. Для лімфобластоїдної культури планшет попередньо центрифугували при 1500 об/хв протягом 10 хв та відбирали середовище. Після цього клітини ресуспендували у 100 мкл 96% етанолу для розчинення формагану. Вимірювали оптичну щільність лунок при 538 нм на спектрофотометрі «Multiscan FC» (США), приймаючи лунку А1 (містить лише розчинник) за бланк, значення якого віднімались автоматично від значень оптичної щільності (ОЩ) в інших лунках. Вираховували середні значення оптичної щільності для кожного з зразків та контролю клітин та значення стандартної похибки, використовуючи функції програми Microsoft Excel 2016. Приймаючи значення середньої оптичної щільності контролю клітин за 100%, вираховували відсоток живих клітин для дослідних зразків за формулою:

$$\text{Відсоток живих клітин} = \text{ОЩ зразка} \times 100 / \text{ОЩ контролю клітин}$$

## 2.2 Дослідження токсичності *in silico*

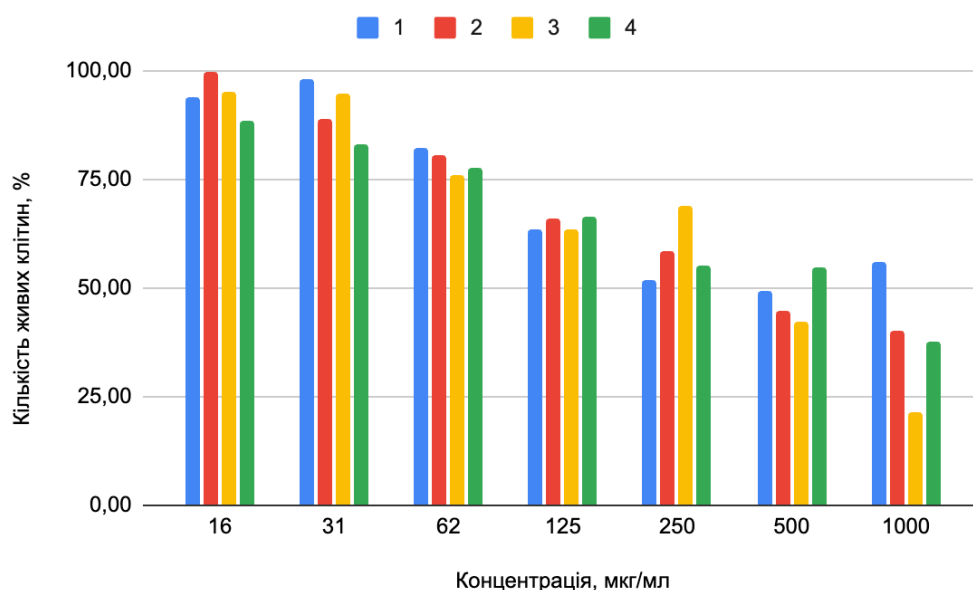
Для визначення параметрів токсичності використовувався безкоштовний онлайн ресурс ADMETlab 2.0 [12]. Сполуки, використані в роботі, безпосередньо створювалися у вбудованому JMSE редакторі і далі оцінювались алгоритмами ADMETlab 2.0 за великою кількістю фармакокінетичних параметрів. Які в сумі дозволяють розглянути важливі для потенційної лікарської речовини властивості. В рамках дослідження використовувалися такі групи параметрів: фізико-хімічні властивості,

параметри медичної хімії [74], а також профіль ADMET, який включає показники абсорбції, транспорту, метаболізму, виведення та токсичність. Фізико-хімічні властивості виражалися параметрами рочинності у воді та ліпофільності, такі як  $\log S$ ,  $\log P$  та  $\log D$ . Параметри медичної хімії оцінювалися за допомогою правил Ліпінські, "Pfizer" та "GSK", а також параметрів привабливості оснований на існуючих лікарських засобах - QED та MCE-18. Важливими показниками абсорбції та транспорту були HIA, PPB, та BBB. Метаболічна активність визначалася вірогідністю бути субстратом чи інгібітором ферментів цитохрому P450 для сполуки. Токсичність ADMET профілю досліджувалися параметрами впливу на hERG рецептори, гепатоксичності Н-НТ, вірогідності ураження печінки DILI, канцерогенності, респіраторної та токсичності та токсичності для шкіри, та параметром токсичності на мишах.

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

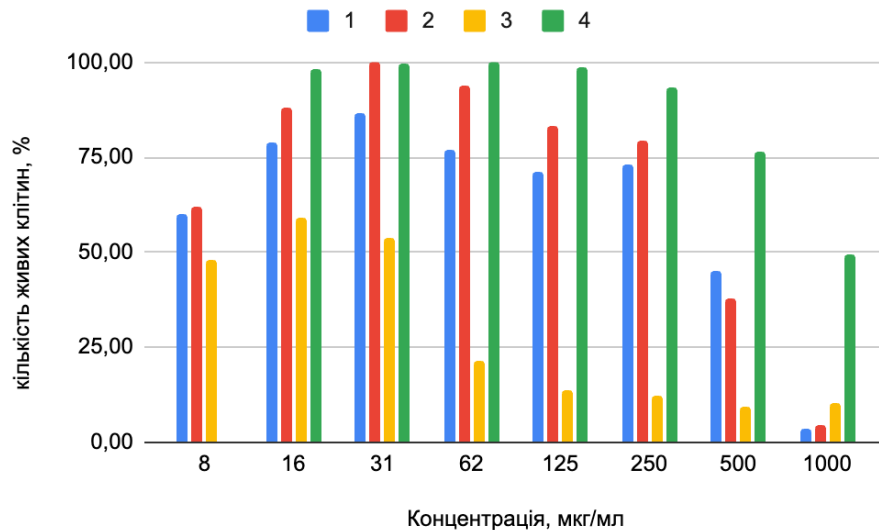
### 3.1 Результати цитотоксичності речовин *in vitro*

Для досліджуваних речовин на різних культурах клітин отримали результати надані в цьому розділі, вони досліджувалася на трьох культурах (MDCK, Wish, B98-5) та в різних концентраціях. Результати для MDCK можна побачити на графіку 1, де кожен колір відповідає номеру досліджуваної сполуки. Для сполуки 1, концентрація в 1000 мкг/мл не бралася до уваги оскільки виходить із меж похибки.



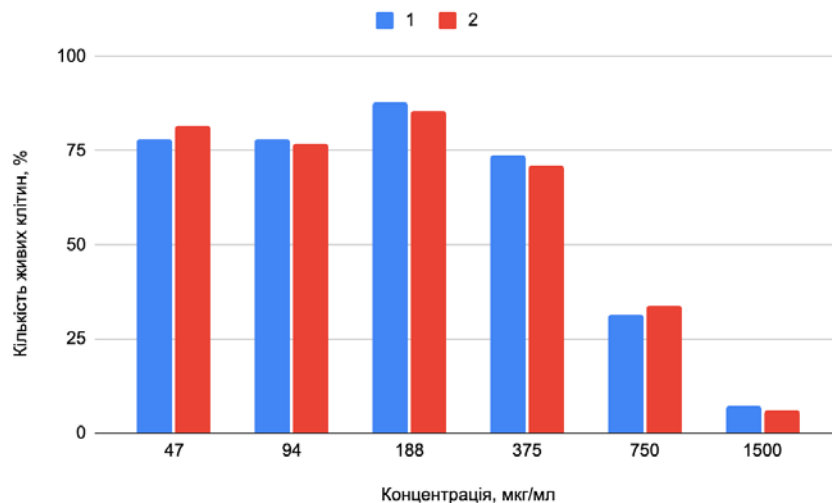
**Графік 3.1** Результати дослідження на MDCK

Наступною культурою клітин на якій виконувалося дослідження була B95-8, результати якого зображені на графіку 2, де кольори відповідають за номер досліджуваної сполуки. Проаналізувавши показники, можна сказати що на низьких концентраціях, дані були недостовірними, тому для всіх трьох сполук концентрацією в 8 мкг/мл можна знехтувати. А для речовин 1 та 2, відповідні дії треба вчинити і для концентрації 16 мкг/мл оскільки вони не входять в рамки похибки.



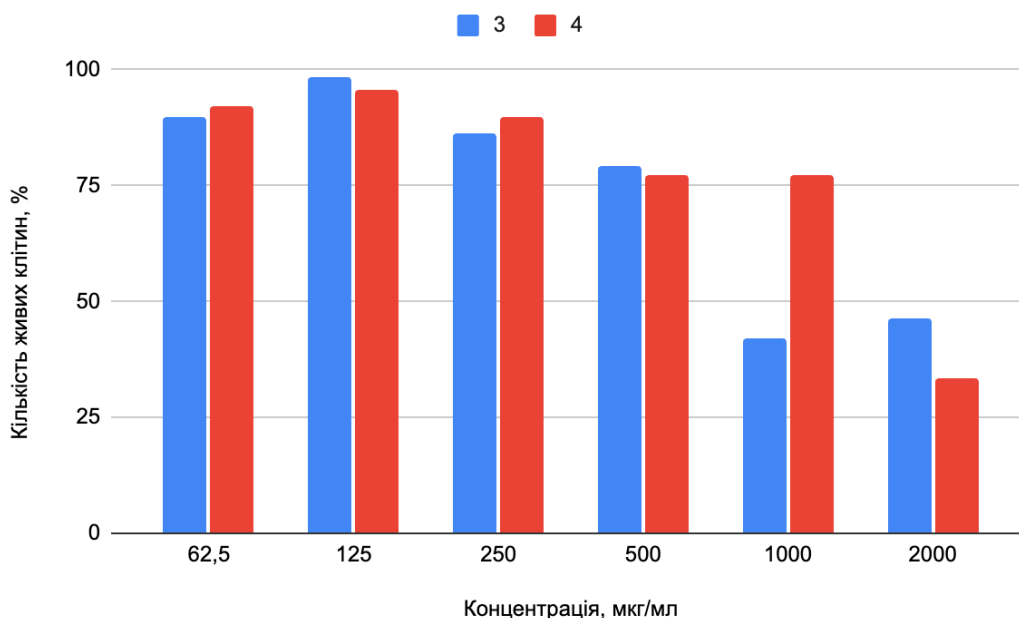
**Графік 3.2** Результати дослідження на B95-8

Останньою дослідженою культурою клітин був Wish, для якого було проведено декілька дослідів. Результати для речовини 1 та речовини 2 представлені на графіку 3. Для даної культури клітин було вирішено брати початкову концентрацію в 1500 мкг/мл, кожен раз вдвічі зменшуючи її до 47 мкг/мл.



**Графік 3.3** Результати дослідження на Wish речовини 1 та речовини 2

На графіку 4 зображені результати на культурі клітин Wish для речовини 3 та речовини 4. Для останнього дослідження, бралися ще вища початкова концентрація в 2000 мкг/мл.



**Графік 3.4** Результати дослідження на Wish речовини 3 та речовини 4

Загалом, проаналізувавши графіки, можна впевнитися в правильності проведених дослідів цитотоксичності і в достовірності отриманих результатів. Далі за середнім значенням оптичної густини для кожної концентрації та контрольним зразком, рахувалася оптична густина, з якої, потім, розраховувався показник  $CC_{50}$ . Проаналізувавши отримані результати в таблиці 1, можна сказати, що всі речовини показали задовільний результат. Якщо порівняти його до показника  $CC_{50}$  таміфлу (585 мкг/мл), отримаємо, що речовини проявили себе нетоксичними відносно досліджуваних культур клітин, що дає змогу підтвердити майбутній потенціал досліджень цих сполук, в якості можливих лікарських препаратів. Речовини 3 та 4, отримали показали найкращі результати, що каже про їх високий потенціал для майбутніх досліджень і високу вірогідність бути використаним в якості потенційних ліків.

**Таблиця 3.1** Результат цитотоксичності *in vitro*

Культура клітин	MDCK				B95-8				Wish			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
$CC_{50}$ (мкг/мл)	224	518	483	572	433	479	1307	990	647	647	1299	1522

## 3.2 Аналіз речовин *in silico*

### 3.2.1 Результати аналізу сполуки 1

Проведений аналіз за допомогою ADMET lab 2.0 показав наступні результати:

Аналізуючи фізико-хімічні параметри, продемонстровані на рисунку 3.3, можна сказати що речовина має достатньо оптимістичні показники для подальшого дослідження, оскільки має оптимальні значення  $\log S$  та  $\log P$ . І хоча  $\log S$  (-1.198) каже про те що розчинність речовини у воді є менше середнього, проте його  $\log P$  (0.858) вказує на рівномірну розподіленість речовини між неполярною та полярною фазами, що каже про достатню ліпофільність речовини, та її високу проникність крізь ліпідні мембрани. Також варто відзначити результат за параметром  $\log D$  (0.804) який вказує на стабільний розподіл речовини в широкому діапазоні рН. Це може бути важливим для речовини, яка буде використовуватись у системах з різними рН, таким як організм людини. Підбиваючи короткий підсумок, можна сказати що це достатньо гнучка але стабільна речовина, яка має оптимальні фізико-хімічні показники.

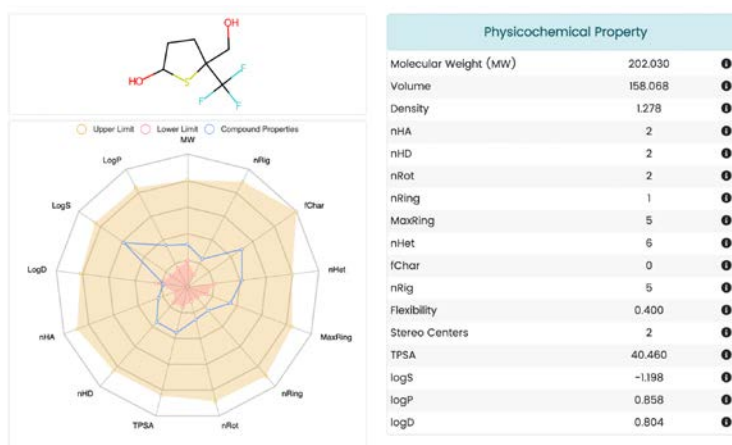


Рис. 3.3 Детальні фізико-хімічні параметри сполуки 1

Для того аби мати можливість досліджувати речовину як потенційний лікарський засіб, необхідно розглянути параметри медичної хімії даної речовини. За результатами, представленими на рисунку 3.4, видно що речовина впевнено показала себе за правилом Ліпінського. Що свідчить про ймовірну біодоступність при пероральному прийомі. Параметри Pfizer та GSK тільки підтверджують твердження про високий потенціал використання речовини в якості ліків.

Кількісна оцінка привабливості Бікертонна, QED (0.669) хоча і має негативний результат, проте мінімальне значення яке вказує на привабливість речовини становить 0.67. Тому можна припустити, що в рамках похибки, результат можна вважати в рамках оптимального. MCE-18 (26,667) вказує на відсутність використовуваних ліків схожих за будовою, це може підтверджувати факт новосинтезованості речовини, а також попереджувати про те що немає гарантії що речовина може бути лікарською.

Medicinal Chemistry			
QED	0.669	●	ⓘ
SAscore	4.643	●	ⓘ
Fsp <sup>3</sup>	1.000	●	ⓘ
MCE-18	26.667	●	ⓘ
NPscore	0.384		ⓘ
Lipinski Rule	Accepted	●	ⓘ
Pfizer Rule	Accepted	●	ⓘ
GSK Rule	Accepted	●	ⓘ
Golden Triangle	Accepted	●	ⓘ
PAINS	0		ⓘ
	alert(s)		
ALARM NMR Rule	2 alert(s)	<a href="#">DETAIL</a>	ⓘ
BMS Rule	0		ⓘ
	alert(s)		
Chelator Rule	0		ⓘ
	alert(s)		

**Рис. 3.4** Параметри медичної хімії для речовини 1

Далі необхідно розглянути ADMET профіль речовини.

Речовина показала задовільну абсорбцію, NIA (0.005) підтверджує вірогідність сполуки бути проникними через кишковий тракт людини і

поглинатися в систему кровообігу, це засвідчує рисунок 3.5(1). Що є найважливішим параметром абсорбції для потенційних лікарських засобів.

Проаналізувавши параметри транспорту на рисунку 3.5(2), можна впевнитися в її чудових показниках, оскільки ми маємо оптимальний показник зв'язування протеїнів РРВ (78%) що вказує на хороший терапевтичний індекс. Параметр ВВВ (0,938) в свою чергу повідомляє про низьку проникність через крово-мозковий бар'єр, що є чудовим результатом для речовин, що не впливають на ЦНС, оскільки для таких речовин проникнення ВВВ має бути мінімізоване, щоб уникнути небажаних побічних ефектів.

Absorption			
Caco-2 Permeability	-4.553	●	i
MDCK Permeability	1.7e-05	●	i
Pgp-inhibitor	---	●	i
Pgp-substrate	---	●	i
HIA	---	●	i
F <sub>20%</sub>	---	●	i
F <sub>30%</sub>	---	●	i
Distribution			
PPB	77.447%	●	i
VD	1.041	●	i
BBB Penetration	+++	●	i
Fu	36.770%	●	i

**Рис. 3.5** Параметри абсорбції(1) та транспорту(2) для речовини 1

Необхідно також проаналізувати вплив речовини на метаболізм. На рисунку 3.6 можна побачити, що речовина 1 не інгібує жоден фермент цитохрому Р450, а також є субстратом для таких ферментів, як СYP1A2 та СYP2C19, що знаходяться в печінці та відповідають за окислення та розкладання різних сполук, зокрема лікарських речовин. Цей факт підтверджує попередні висновки про потенціал майбутніх досліджень речовини.

Оцінюючи параметр виведення на рисунку 3.6, можна сказати про те

що речовина повільно виводиться із організму, проте такі параметри можуть бути пов'язані із наявністю фтору у складі речовини.

Metabolism		
CYP1A2 inhibitor	--	ⓘ
CYP1A2 substrate	+++	ⓘ
CYP2C19 inhibitor	---	ⓘ
CYP2C19 substrate	++	ⓘ
CYP2C9 inhibitor	---	ⓘ
CYP2C9 substrate	--	ⓘ
CYP2D6 inhibitor	---	ⓘ
CYP2D6 substrate	--	ⓘ
CYP3A4 inhibitor	---	ⓘ
CYP3A4 substrate	-	ⓘ
Excretion		
CL	4.545	● ⓘ
T <sub>1/2</sub>	0.776	ⓘ

**Рис. 3.6** Параметри метаболізму(1) та виведення(2) речовини 1

Оцінивши сполуку за показниками абсорбції, транспорту, метаболізму та екскреції, наступним важливим кроком для отримання повної картини ADMET є оцінка її токсичності. На рисунку 3.7 можна ознайомитися з основними показниками.

Варто зазначити, низьку гепатотоксичність - Н-НТ (0.234) та помірну ураженість печінки - DILI (0.323), необхідно наголосити, що для фторованих нуклеозидів, які використовуються для противірусного та протипухлинного лікування, притаманні набагато вищі показники. Наприклад FU-5 має (0.867) та (0.973) для відповідних показників, зображених у додатку А. Параметр hERG (0.01) вказує на відсутність негативного впливу на серцево-судинну систему.

Щодо параметрів Rat Oral Acute Toxicity (0.752) та канцерогенності (0.899) треба зазначити, що високі показники спостерігаються в інших противірусних та протипухлинних препаратах, наприклад показник ROAT для вищезгаданого FU-5 дорівнює 0.936, в додатку А, в той час як для FTC канцерогенність має ідентичний показник в 0.899 в додатку Б.

Toxicity		
hERG Blockers	---	● 1
H-HT	--	● 1
DILI	-	● 1
AMES Toxicity	--	● 1
Rat Oral Acute Toxicity	++	● 1
FDAMDD	-	● 1
Skin Sensitization	-	● 1
Carcinogenicity	++	● 1
Eye Corrosion	---	● 1
Eye Irritation	+	● 1
Respiratory Toxicity	--	● 1

Рис. 3.7 Основні параметри токсичності сполуки 1

### 3.2.2 Результати аналізу сполуки 2

Проведений аналіз за допомогою ADMET lab 2.0 показав наступні результати. Ця сполука фактично є 10S-46 тільки замість 2-гідрокогрупи має (2,4-діоксипіромідин-1-ил), тому вона має деякі зміни, зумовлені додаванням піромідину. Як видно на рисунку 3.8, речовина стала, очевидно, більшою та об'ємнішою, проте її  $\log S$  (-1.867) говорить про те що сполука стала більш водорозчинною.

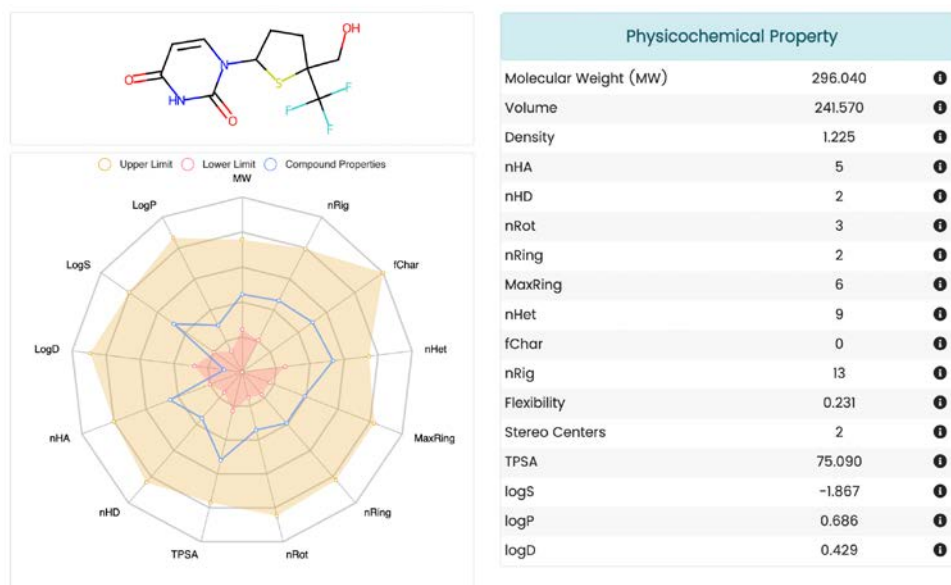


Рис. 3.8 Діапазон оптимальних значень для фізико-хімічних параметрів сполуки 2

За показником  $\log P$  (0.686), речовина стала менш ліпофільною, проте значення оптимальні і вказує на рівномірну розподіленість речовини між неполярною та полярною фазами, що каже про все ще достатню ліпофільність речовини.  $\log D$  (0.429) став вдвічі меншим, що означає що молекула буде вести себе менш стабільно при зміні рН, проте як і з ліпофільністю, значення все ще залишається оптимальним. Підсумовуючи можна сказати що додавання піримідинового кільця, сприяло фізико-хімічним змінам, проте не повпливало на потенціал цієї речовини.

Переходячи до аналізу медичних показників на рисунку 3.9, очевидно, що при збереженні позитивних результатів в правилах Ліпінського, Pfizer, та GSK, показники привабливості QED (0.848) та показнику можливої лікарської стабільності MCE-18 (56.000) зросли. При чому підвищення можна охарактеризувати появою піримідинового кільця, яке зустрічається в окремому кластері піримідинових протипухлинних препаратів.

Medicinal Chemistry		
QED	0.848	● ⓘ
SAScore	4.276	● ⓘ
Fsp <sup>3</sup>	0.600	● ⓘ
MCE-18	56.000	● ⓘ
NPscore	0.027	ⓘ
Lipinski Rule	Accepted	● ⓘ
Pfizer Rule	Accepted	● ⓘ
GSK Rule	Accepted	● ⓘ
Golden Triangle	Accepted	● ⓘ
PAINS	0 alert(s)	ⓘ
ALARM NMR Rule	1 alert(s) <a href="#">DETAIL</a>	ⓘ
BMS Rule	0 alert(s)	ⓘ
Chelator Rule	0 alert(s)	ⓘ

**Рис.3.9** Параметри медичної хімії для речовини 2

Щодо параметрів абсорбції та транспорту на рисунку 3.10, хоча вони все ще достатньо сприятливі, оскільки НІА(0.009) та РРВ(70.6%) знаходяться в оптимальних діапазонах, проте варто відзначити показник ВВВ в 0.115, що говорить про те, що молекула легко проникає через крово-мозковий бар'єр, через що, речовина може впливати на ЦНС. З одної сторони, це може

призвести до небажаних побічних ефектів у випадку лікування не націленого на ЦНС, але з іншої, в разі пухлинного або протівірусного лікування мозку, сполука може бути потенційно використовуваною, через свою проникність.

Absorption			
Caco-2 Permeability	-5.346	●	ⓘ
MDCK Permeability	1.2e-05	●	ⓘ
Pgp-inhibitor	---	●	ⓘ
Pgp-substrate	---	●	ⓘ
HIA	---	●	ⓘ
F <sub>20%</sub>	---	●	ⓘ
F <sub>30%</sub>	---	●	ⓘ
Distribution			
PPB	70.683%	●	ⓘ
VD	0.581	●	ⓘ
BBB Penetration	--	●	ⓘ
Fu	46.555%	●	ⓘ

**Рис. 3.10** Параметри абсорбції (1) та транспорту (2) для речовини 2

Наступним кроком треба проаналізувати метаболічний вплив та екскрецію речовини. З результатів на рисунку 3.11 можна побачити, що сполука не інгібує жоден фермент цитохрому P450, що є позитивним показником. Також речовина є субстратом для CYP1A2 та CYP3A4, потенційна активність другого може бути причиною покращеного показника екскреції, порівняно з попередньою речовиною.

Metabolism			
CYP1A2 inhibitor	---		ⓘ
CYP1A2 substrate	+++		ⓘ
CYP2C19 inhibitor	---		ⓘ
CYP2C19 substrate	--		ⓘ
CYP2C9 inhibitor	---		ⓘ
CYP2C9 substrate	---		ⓘ
CYP2D6 inhibitor	---		ⓘ
CYP2D6 substrate	--		ⓘ
CYP3A4 inhibitor	---		ⓘ
CYP3A4 substrate	+		ⓘ
Excretion			
CL	5.605	●	ⓘ
T <sub>1/2</sub>	0.629		ⓘ

**Рис. 3.11** Параметри метаболізму (1) та виведення (2) речовини 2

Останнім параметром аналізу профілю ADMET речовини є токсичність, показана на рисунку 3.12. На відміну від речовини 1, речовина 2 має високі показники гепатотоксичності H-HT(0.907) і вірогідності ураження печінки DILI(0.985), проте має набагато нижчі показники в інших параметрах токсичності, зокрема Rat Oral Acute Toxicity (0.023). Показники hERG (0.003) та канцерогенності (0.875) - майже незмінні. Загалом спостерігається наближення показників токсичності, до відповідних показників вже існуючих ліків, проте у порівнянні із тими ж FU-5, яка згадувалися раніше, досліджувана речовина не має високої респіраторної токсичності, згідно з додатком А.

Toxicity			
hERG Blockers	---	●	ⓘ
H-HT	+++	●	ⓘ
DILI	+++	●	ⓘ
AMES Toxicity	---	●	ⓘ
Rat Oral Acute Toxicity	---	●	ⓘ
FDAMDD	--	●	ⓘ
Skin Sensitization	--	●	ⓘ
Carcinogenicity	++	●	ⓘ
Eye Corrosion	---	●	ⓘ
Eye Irritation	---	●	ⓘ
Respiratory Toxicity	---	●	ⓘ

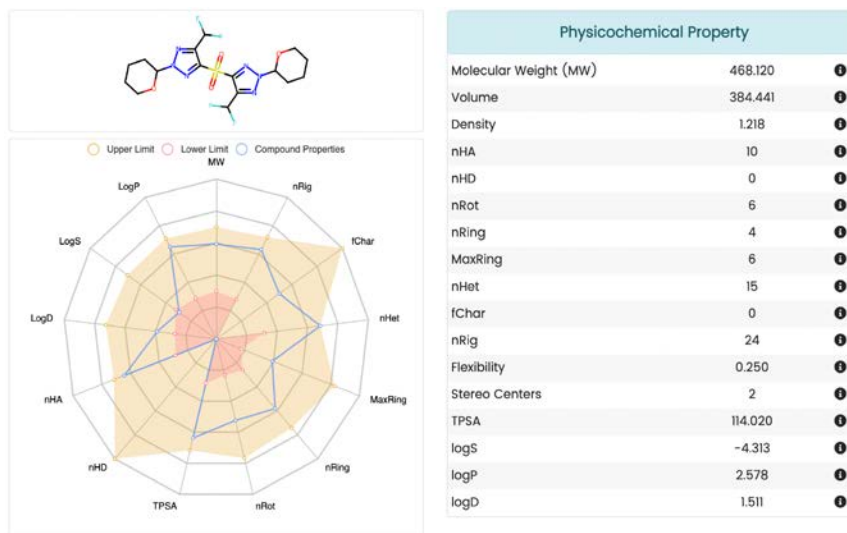
Рис. 3.12 Основні параметри токсичності сполуки 2

### 3.2.3 Результати аналізу сполуки 3

Ця речовина відрізняється від усіх інших досліджуваних сполук, тому параметри відрізнятимуться, і мають порівняти лише з існуючими протипухлинними і противірусними ліками. Аналіз *in silico* показав результат описаний нижче.

Виходячи з фізико-хімічних результатів на рисунку 3.13, можна впевнитись в складності речовини про що каже її молекулярна маса MW, а також топологічні показники. Щодо досліджуваних параметрів, необхідно відзначити хороший показник розчинності у воді logS (-4.313) та чудовий показник ліпофільності logP (2.578), які є кращими за відповідні показники

для FTC, згідно з додатком Б. Щодо показника logD (1.511) він характеризує хорошу стабільність речовини при зміні рН.



**Рис. 3.13** Фізико-хімічні властивості речовини 3

Щодо показників медичної хімії зображених на рисунку 3.14, можна сказати, що речовина 3 має оптимальний результат. Сполука має хороші показники MCE-18 (92.857) - що є вище відповідного показнику FTC-правилах Лінського та Pfizer, що вказує на стабільність речовини як потенційно лікарської. Не оптимальні показники QED (0.595) та GSK лише підтверджують складність речовини і відсутність досліджень схожих речовин.

Medicinal Chemistry		
QED	0.595	● ●
SAscore	4.567	● ●
Fsp <sup>3</sup>	0.750	● ●
MCE-18	92.857	● ●
NPscore	-0.476	●
Lipinski Rule	Accepted	● ●
Pfizer Rule	Accepted	● ●
GSK Rule	Rejected	● ●
Golden Triangle	Accepted	● ●
PAINS	0 alert(s)	●
ALARM NMR Rule	1 alert(s) <a href="#">DETAIL</a>	●
BMS Rule	0 alert(s)	●
Chelator Rule	0 alert(s)	●

### Рис. 3.14 Параметри медичної хімії речовини 3

Наступними параметрами для аналізу є показники абсорбції та транспорту, зображені на рисунку 3.15.

Absorption			
Caco-2 Permeability	-5.752	●	ⓘ
MDCK Permeability	2.7e-05	●	ⓘ
Pgp-inhibitor	-	●	ⓘ
Pgp-substrate	++	●	ⓘ
HIA	---	●	ⓘ
F20%	+++	●	ⓘ
F30%	+++	●	ⓘ
Distribution			
PPB	98.024%	●	ⓘ
VD	1.217	●	ⓘ
BBB Penetration	---	●	ⓘ
Fu	1.186%	●	ⓘ

### Рис. 3.15 Параметри абсорбції (1) та транспорту (2) речовини 3

Речовина показала багато незадовільних результатів. Хоча показник HIA (0.029) вказує на оптимальну проникність у клітинах кишківника, всі інші параметри вказують на низьку біодоступність молекули. Це підтверджує і високий показник селективності з певними білками PPB (98,024%). Згідно з додатком Б, FТС має кращі показники в цих компонентах, тому можна сказати про те що речовина 3 буде менш біодоступною для преорального введення, за яким вона матиме менший терапевтичний індекс. Через це, варто розглянути парентеральний спосіб введення для цієї сполуки в майбутньому.

В параметрах метаболізму та виведення на рисунку 3.16, спостерігаються оптимальні результати.

Metabolism		
CYP1A2 inhibitor	---	❗
CYP1A2 substrate	--	❗
CYP2C19 inhibitor	--	❗
CYP2C19 substrate	+++	❗
CYP2C9 inhibitor	---	❗
CYP2C9 substrate	+++	❗
CYP2D6 inhibitor	---	❗
CYP2D6 substrate	+	❗
CYP3A4 inhibitor	--	❗
CYP3A4 substrate	+	❗
Excretion		
CL	8.767	● ❗
T <sub>1/2</sub>	0.033	❗

**Рис. 3.16** Параметри метаболізму (1) та виведення (2)

В параметрах метаболізму та виведення на рисунку 3.16, спостерігаються оптимальні результати. Речовина не лише не є інгібітором жодного фермента цитохрому P450, але й є субстратом для більшості з них, включаючи CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4, що позитивно проявляється на показнику виведення CL (8.767). Варто відзначити, що дані показники є кращими за відповідні у TFC, представлені у додатку Б.

Останніми параметрами для огляду є показники токсичності профілю ADMET, які можна побачити на рисунку 3.17.

Як і в інших фторованих нуклеозидах речовинах цього дослідження так і в тих які вже використовуються як лікарські засоби, так і в речовині 3 спостерігаються незадовільні показники гепатотоксичності Н-НТ (0.81), вірогідності ураження печінки DILI (0.999) та канцерогенності (0.869); а також оптимальний показник блокування hERG рецепторів(0.004).

Проте, на відміну від TFC, показники якого надані в додатку Б, речовина має недостатньо оптимальні показники Rat Oral Acute Toxicity (0.067) , сенситизації шкіри (0.38) та респіраторну токсичність (0.373). І хоча показники не є критичними і можуть бути покращені, вони є проблемою для подальшого використання речовини 3. Варто також відмітити незадовільний параметр FDAMDD (0.964), який каже про те що речовина може бути непридатною для потенційного використання в лікуванні.

Toxicity		
hERG Blockers	---	● ⓘ
H-HT	++	● ⓘ
DILI	+++	● ⓘ
AMES Toxicity	---	● ⓘ
Rat Oral Acute Toxicity	-	● ⓘ
FDAMDD	+++	● ⓘ
Skin Sensitization	-	● ⓘ
Carcinogenicity	++	● ⓘ
Eye Corrosion	---	● ⓘ
Eye Irritation	---	● ⓘ
Respiratory Toxicity	-	● ⓘ

Рис. 3.17 Параметри токсичності речовини 3.

### 3.2.4 Результати аналізу сполуки 4

Ця речовина має схожу будову із сполукою 2, на відміну від якої містить 3-гідроксогрупу. Саме тому речовина має досить схожі результати досліджень.

Значення медичної хімії на рисунку 3.18, мають такі ж оптимальні показники як і речовина 2. QED (0.704), MCE-18 (59.500) а також правила Ліпінські, GSK та Pfizer мають задовільні результати. Це стосується також значень абсорбції та транспорту на рисунку 3.18. Аналіз показав таку ж оптимальну проникність НІА (0.029) та вдвічі меншу білкову зв'язуваність РРВ (48,35%), що покращує терапевтичний індекс речовини. Проте як і речовина 2, речовина 4 також має низький показник ВВВ (0.065), що каже про те, що речовина досі матиме вплив на ЦНС.

Medicinal Chemistry				Absorption			
QED	0.704	●	ⓘ	Caco-2 Permeability	-5.759	●	ⓘ
SAscore	4.433	●	ⓘ	MDCK Permeability	7.6e-06	●	ⓘ
Fsp <sup>3</sup>	0.600	●	ⓘ	Pgp-inhibitor	---	●	ⓘ
MCE-18	59.500	●	ⓘ	Pgp-substrate	---	●	ⓘ
NPscore	0.251	●	ⓘ	HIA	---	●	ⓘ
Lipinski Rule	Accepted	●	ⓘ	F <sub>20x</sub>	---	●	ⓘ
Pfizer Rule	Accepted	●	ⓘ	F <sub>30x</sub>	---	●	ⓘ
GSK Rule	Accepted	●	ⓘ	Distribution			
Golden Triangle	Accepted	●	ⓘ	PPB	48.360%	●	ⓘ
PAINS	0 alert(s)	●	ⓘ	VD	0.412	●	ⓘ
ALARM NMR Rule	1 alert(s) <a href="#">DETAIL</a>	●	ⓘ	BBB Penetration	---	●	ⓘ
BMS Rule	0 alert(s)	●	ⓘ	Fu	64.858%	●	ⓘ
Chelator Rule	0 alert(s)	●	ⓘ				

**Рис. 3.18** Показники медичної хімії (1), абсорбції (2) та транспорту (3)

Також схожі і показники метаболізму та виведення на рисунку 3.19. Речовина 4 не виступає інгібітором жодного із ферментів цитохрому P450 і є субстратом для CYP1A2, що покращує метаболізм і виведення сполуки. Хоча фторованість молекули знижує швидкість виведення CL (4.983), проте цей показник наблизений до оптимального значення CL (5). Важливо також відзначити знижену канцерогенність (0.354) відносно сполуки 2, на рисунку 3.19, при схожих результатах гепатотоксичності H-HL (0.776) та ймовірності ураження печінки DILI (0.983), які спостерігаються і в інших використовуваних ліках FU-5 та TFC, параметри яких зазначені в додатках А та Б. Всі інші важливі показники токсичності, такі як стабільність hERG (0.004), загальної токсичності на мишах Rat Oral Acute Toxicity (0.067) та респіраторної токсичності (0.034) знаходяться в оптимальних межах. Підсумовуючи можна сказати про покращення профілю ADMET речовини 4, що може бути потенційно важливим для подальшого її дослідження.

Metabolism			Toxicity		
CYP1A2 inhibitor	---	ⓘ	hERG Blockers	---	● ⓘ
CYP1A2 substrate	+++	ⓘ	H-HT	++	● ⓘ
CYP2C19 inhibitor	---	ⓘ	DILI	+++	● ⓘ
CYP2C19 substrate	--	ⓘ	AMES Toxicity	---	● ⓘ
CYP2C9 inhibitor	---	ⓘ	Rat Oral Acute Toxicity	---	● ⓘ
CYP2C9 substrate	---	ⓘ	FDAMDD	--	● ⓘ
CYP2D6 inhibitor	---	ⓘ	Skin Sensitization	---	● ⓘ
CYP2D6 substrate	---	ⓘ	Carcinogenicity	-	● ⓘ
CYP3A4 inhibitor	---	ⓘ	Eye Corrosion	---	● ⓘ
CYP3A4 substrate	--	ⓘ	Eye Irritation	---	● ⓘ
Excretion			Respiratory Toxicity	---	● ⓘ
CL	4.983	● ⓘ			
T <sub>1/2</sub>	0.641	ⓘ			

Рис. 3.19 Показники метаболізму (1) виведення (2) та токсичності (3) речовини 4

Проте при покращенні профілю ADMET даної речовини відносно речовини 2, можна спостерігати відчутне погіршення фізико-хімічних показників зображених на рисунку 3.20.

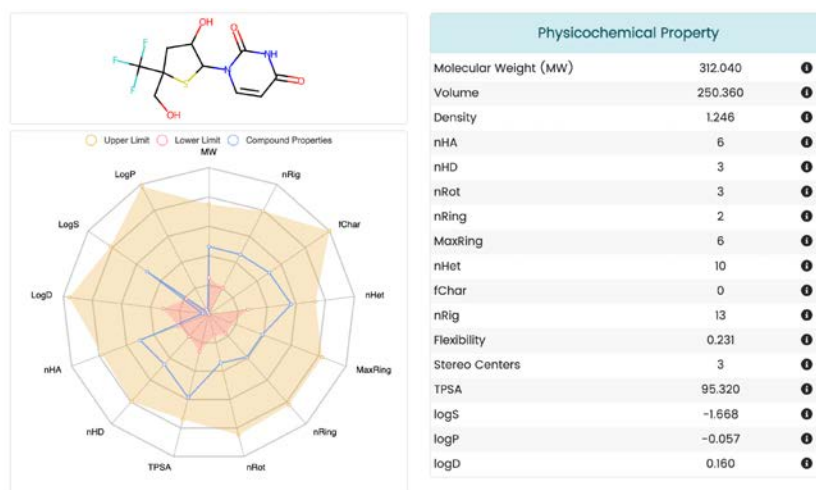


Рис. 3.20 Фізико хімічні показники речовини 4.

При схожому показнику logS (-1.668) розчинності у воді, який досі є в рамках допустимого, проте нижче оптимального, показник ліпофільності logP(-0.057) та стабільності рН logD (0.160) знаходяться на своїх найнижчих межах, що може сказатися на ускладненій проникності ліпідних мембран, та меншій стабільності при зміні рН середовища.



## ВИСНОВКИ

У результаті дослідження було:

1. Проведено культивування клітин для досліджень і перевірено життєздатні клітини в камері Горяєва
2. Отримано показники цитотоксичності (CC50) *in vitro*
3. Проаналізовано фізико-хімічні параметри, параметри медичної хімії та ADMET-профілі *in silico*.
4. Порівняно отримані результати з лікарськими фторованими нуклеозидами затвердженими FDA.

Проведений *in vitro* та *in vivo* аналіз цитотоксичності новосинтезованих фторованих нуклеозидів показав що досліджувані речовини мають високий потенціал і можуть бути в подальшому більш глибоко досліджені для можливого використання в медицині. Можна також сказати що аналіз речовин *in silico*, не тільки підтвердив дані отримані в результаті досліджень *in vitro*, а ще й доповнив його фізико-хімічними висновками та профілем ADMET. Підтверджує висновок загалом і те, що схожі речовини які використовуються як протипухлинні та противірусні препарати, мають схожі показники, а в деяких випадках, досліджувані сполуки показали кращий результат.

Результати цієї роботи можуть мати важливе значення для подальшого розроблення нових антивірусних та протипухлинних препаратів на основі фторованих нуклеозидів, в тому числі для подальших досліджень цільових речовин.

Варто відзначити те що дана робота підтвердила доцільність використання обох методів *in silico* та *in vitro* для аналізу цитотоксичності на ранніх етапах дослідження сполук.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Pankiewicz, K.W. Fluorinated nucleosides. *Carbohydr. Res.* **2000**, 327(1-2), 87-105.
2. Cheng, X.; Ma, L. Enzymatic synthesis of fluorinated compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, 105(21-22), 8033-8058..
3. Боєчко Ф.Ф.; Боєчко Л.О. Основні біохімічні поняття, визначення і терміни. К., **1993**.
4. Seley-Radtke, K.L.; Yates, M.K. The evolution of nucleoside analogue antivirals: A review for chemists and non-chemists. Part 1: Early structural modifications to the nucleoside scaffold. *Antivir. Res.* **2018**, 154, 66–86.
5. Yates, M.K.; Seley-Radtke, K.L. The evolution of antiviral nucleoside analogues: A review for chemists and non-chemists. Part II: Complex modifications to the nucleoside scaffold. *Antivir. Res.* **2019**, 162, 5–21.
6. Вороніна, Л.М.; Десенко, В.Ф.; Мадієвська, Н.М. та ін. Біологічна хімія. Х., **2000**.
7. Филиппович, Ю.Б. Основы биохимии. М., **1999**.
8. Pal, S.; Chandra, G.; Patel, S.; Singh, S. Fluorinated Nucleosides: Synthesis, Modulation in Conformation and Therapeutic Application. *Chem Rec.* **2022**, 22(5), e202100335.
9. Cavaliere, A.; Probst, K.C.; Westwell, A.D.; Slusarczyk, M. Fluorinated nucleosides as an important class of anticancer and antiviral agents. *Future Med Chem.* **2017**, 9(15), 1809-1833.
10. Westwell, A.D. Fluorinated Pharmaceuticals: Advances in Medicinal Chemistry. Future Science Ltd. London, UK, **2015**.
11. Isanbor, C.; O'Hagan, D. Fluorine in medicinal chemistry: a review of anti-cancer agents. *J. Fluor. Chem.* **2006**, 127(3), 303–319.
12. Park, B.K.; Kitteringham, N.R.; Neill, P.M.O. Metabolism of fluorine-containing drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, 41, 443–470.

13. Ismail, F.M.D. Important fluorinated drugs in experimental and clinical use. *J. Fluor. Chem.* **2002**, 118, 27–33.
14. Jordheim, L.P.; Dumontet, C. Review of recent studies on resistance to cytotoxic deoxynucleoside analogues. *Biochem. Biophys Acta* **2007**, 1776(2), 138–159.
15. Kolberg, M.; Strand, K.R.; Graff, P. et al. Structure, function and mechanism of ribonucleotide reductases. *Biochem. Biophys. Acta* **2004**, 1699(1–2), 1–34.
16. Ju, J.; Pedersen-Lane, J.; Maley, F. et al. Regulation of p53 expression by thymidylate synthase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1999**, 96(7), 3769–3774.
17. Bassetto, M.; Slusarczyk, M. Therapeutic use of fluorinated nucleosides - progress in patents. *Pharm Pat Anal.* **2018**, 7(6), 277-299.
18. Austin, A.; Lietman, T.; Rose-Nussbaumer, J. Update on management of infectious keratitis. *Ophthalmology* **2017**, 124(11), 1678–1689.
19. Cavaliere, A.; Probst, K.C.; Westwell, A.D.; Slusarczyk, M. Fluorinated nucleosides as an important class of anticancer and antiviral agents. *Future Med Chem.* **2017**, 9(15), 1809-1833.
20. Liu, P.; Sharon, A.; Chu, C.K. Fluorinated Nucleosides: Synthesis and Biological Implication. *J Fluor Chem.* **2008**, 129(9), 743-766.
21. De Clercq, E.; Li, G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin Microbiol Rev.* **2016**, 29(3), 695-747.
22. Ward, J.W.; Mermin, J.H. Simple, effective, but out of reach? Public health implications of HCV drugs. *N Engl J Med* **2015**, 373, 2678–2680.
23. De Clercq, E.; Li, G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin Microbiol Rev.* **2016**, 29(3), 695-747.
24. Carreras, C.W.; Santi, D.V. The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, 64, 721–762.
25. Kaiyawet, N.; Rungrotmongkol, T.; Hannongbua, S. Effect of halogen substitutions on dUMP to stability of thymidylate synthase/dUMP/mTHF

ternary complex using molecular dynamics simulation. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53*, 1315–1323.

26. Malet-Martino, M.; Jolimaitre, P.; Martino, R. The prodrugs of 5-fluorouracil. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2002**, *2*(2), 267–310.

27. Ershler, W.B. Capecitabine monotherapy: safe and effective treatment for metastatic breast cancer. *Oncologist* **2006**, *11*, 325–335.

28. Toschi, L.; Finocchiaro, G.; Bartolini, S. et al. Role of gemcitabine in cancer therapy. *Fut. Oncol.* **2005**, *1*(1), 7–17.

29. Eckel, F.; Schneider, G.; Schmid, R.M. Pancreatic cancer: a review of recent advances. *Expert Opin. Investig. Drugs.* **2006**, *15*(11), 1395–1410.

30. Heinemann, V.; Xu, Y.Z.; Chubb, S. et al. Cellular elimination of 2',2'-difluorodeoxycytidine 5'-triphosphate: a mechanism of self-potential. *Cancer Res.* **1992**, *52*(3), 533–539.

31. Ricci, F.; Tedeschi, A.; Morra, E. et al. Fludarabine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: a review. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2009**, *5*, 187–207.

32. Hallek, M.; Fischer, K.; Fingerle-Rowson, G. et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, Phase III trial. *Lancet* **2010**, *376*(9747), 1164–1174.

33. Catapano, C.V.; Perrino, F.W.; Fernandes, D.J. Primer RNA chain termination induced by 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine 5'-triphosphate. A mechanism of DNA synthesis inhibition. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*(10), 7179–7185.

34. Parker, W.B.; Cheng, Y.C. Inhibition of DNA primase by nucleoside triphosphates and their arabinofuranosyl analogs. *Mol. Pharmacol.* **1987**, *31*(2), 146–151.

35. Cumming, J.G.; Davis, A.M.; Muresan, S.; Haeberlein, M.; Chen, H. Chemical predictive modelling to improve compound quality. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 948–962.

36. van de Waterbeemd, H.; Gifford, E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 192–204.
37. Hou, T.; Wang, J. Structure-ADME relationship: still a long way to go? *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2008**, *4*, 759–770.
38. Hodgson, J. ADMET–turning chemicals into drugs. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 722–726.
39. Xiong, G.; Wu, Z.; Yi, J.; Fu, L.; Yang, Z.; Hsieh, C.; Yin, M.; Zeng, X.; Wu, C.; Lu, A.; Chen, X.; Hou, T.; Cao, D. ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*(W1), W5–W14.
40. Dong, J.; Wang, N.N.; Yao, Z.J.; Zhang, L.; Cheng, Y.; Ouyang, D.; Lu, A.P.; Cao, D.S. ADMETlab: a platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database. *J. Cheminform.* **2018**, *10*, 29.
41. Lagorce, D.; Bouslama, L.; Becot, J.; Miteva, M.A.; Villoutreix, B.O. FAF-Drugs4: free ADME-tox filtering computations for chemical biology and early stages drug discovery. *Bioinformatics.* **2017**, *33*, 3658–3660.
42. Yang, H.; Lou, C.; Sun, L.; Li, J.; Cai, Y.; Wang, Z.; Li, W.; Liu, G.; Tang, Y. admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. *Bioinformatics.* **2019**, *35*, 1067–1069.
43. Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42717.
44. Banerjee, P.; Eckert, A.O.; Schrey, A.K.; Preissner, R. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic. Acids. Res.* **2018**, *46*, W257–W263.
45. Pires, D.E.; Blundell, T.L.; Ascher, D.B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 4066–4072.

46. Wu, F.; Zhou, Y.; Li, L.; Shen, X.; Chen, G.; Wang, X.; Liang, X.; Tan, M.; Huang, Z. Computational Approaches in Preclinical Studies on Drug Discovery and Development. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 726.
47. Leeson, P. D.; Oprea, T. I. Drug-like physicochemical properties. In *Drug Design Strategies: Quantitative Approaches*, edited by Livingstone, D. J.; Davis, A. M., 35–59; Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2011**.
48. Arnott, J. A.; Planey, S. L. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert Opin. Drug Discovery* **2012**, *7*, 863–875.
49. Waring, M. J. Lipophilicity in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discovery* **2010**, *5*, 235–248.
50. Stegemann, S.; Leveiller, F.; Franchi, D.; de Jong, H.; Linden, H. When poor solubility becomes an issue: from early stage to proof of concept. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2007**, *31*, 249–261.
51. Grant, D. J.; Higuchi, T. *Solubility Behavior of Organic Compounds*. Techniques of Chemistry, Book 51; Wiley-Interscience: New York, 1990.
52. Charifson, P. S.; Walters, W. P. Acidic and basic drugs in medicinal chemistry: a perspective. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9701–9717.
53. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3–25.
54. Bickerton, G. R.; Paolini, G. V.; Besnard, J.; Muresan, S.; Hopkins, A. L. Quantifying the chemical beauty of drugs. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 90–98.
55. Ivanenkov, Y. A.; Zagribelnyy, B. A.; Aladinskiy, V. A. Are We Opening the Door to a New Era of Medicinal Chemistry or Being Collapsed to a Chemical Singularity? *J. Med. Chem.* **2019**, *62*(22), 10026-10043
56. Artursson, P.; Karlsson, J. Correlation between oral-drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *175*, 880–885.

57. Clark, D. E. In silico prediction of blood-brain barrier permeation. *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 927–933.
58. Kell, D. B.; Goodacre, R. Metabolomics and systems pharmacology: why and how to model the human metabolic network for drug discovery. *Drug Discov. Today* **2014**, *19*, 171–182.
59. Garrido, A.; Lepailleur, A.; Mignani, S. M.; Dallemagne, P.; Rochais, C. hERG toxicity assessment: Useful guidelines for drug design. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *195*, 112290.
60. Liu, L.; Fu, L.; Zhang, J.-W.; Wei, H.; Ye, W.-L.; Deng, Z.-K.; Zhang, L.; Cheng, Y.; Ouyang, D.; Cao, Q.; Cao, D.-S. *Mol. Pharmaceutics* **2019**, *16*(1), 393-408.
61. Hey-Hadavi, J.; Seekins, D.; Palmer, M.; et al. Overview of Causality Assessment for Drug-Induced Liver Injury (DILI) in Clinical Trials. *Drug Saf.* **2021**, *44*, 619–634.
62. Matthews, E. J.; Kruhlak, N. L.; Benz, R. D.; Contrera, J. F.; Rogers, B. A.; Wolf, M. A.; et al. DSSTox FDA Maximum (Recommended) Daily Dose Database (FDAMDD): SDF Files and Documentation. Accessed 1 September **2007**.
63. Greene, N. Computational Models to Predict Toxicity. In *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, Elsevier, **2007**, 909-932.
64. Gad, S. C.; Sullivan, D., Jr. CARCINOGENICITY STUDIES. In *Drug Safety Evaluation*, edited by S. C. Gad and D. Sullivan, **2023**.
65. Lei, T.; Chen, F.; Liu, H.; Sun, H.; Kang, Y.; Li, D.; Li, Y.; Hou, T. *Mol. Pharmaceutics* **2017**, *14*(7), 2407-2421.
66. Riss, T.; Niles, A.; Moravec, R.; et al. Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells. In: Markossian, S.; Grossman, A.; Brimacombe, K.; et al., editors. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; **2004**.
67. Korzeniewski, C.; Callewaert, D. M. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods* **1983**, *64*(3), 313–20.

68. Decker, T.; Lohmann-Matthes, M. L. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* **1988**, *115*(1), 61–9.

69. Fotakis, G.; Timbrell, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* **2006**, *160*, 171–177.

70. Irvine, J. D.; Takahashi, L.; Lockhart, K.; Cheong, J.; Tolan, J. W.; Selick, H. E.; Grove, J. R. MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *J Pharm Sci.* **1999**, *88*(1), 28-33.

71. Pavan, B.; Fiorini, S.; Ferretti, M. E.; Vesce, F.; Biondi, C. WISH cells as a model for the "in vitro" study of amnion pathophysiology. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* **2003**, *3*(1), 83-92.

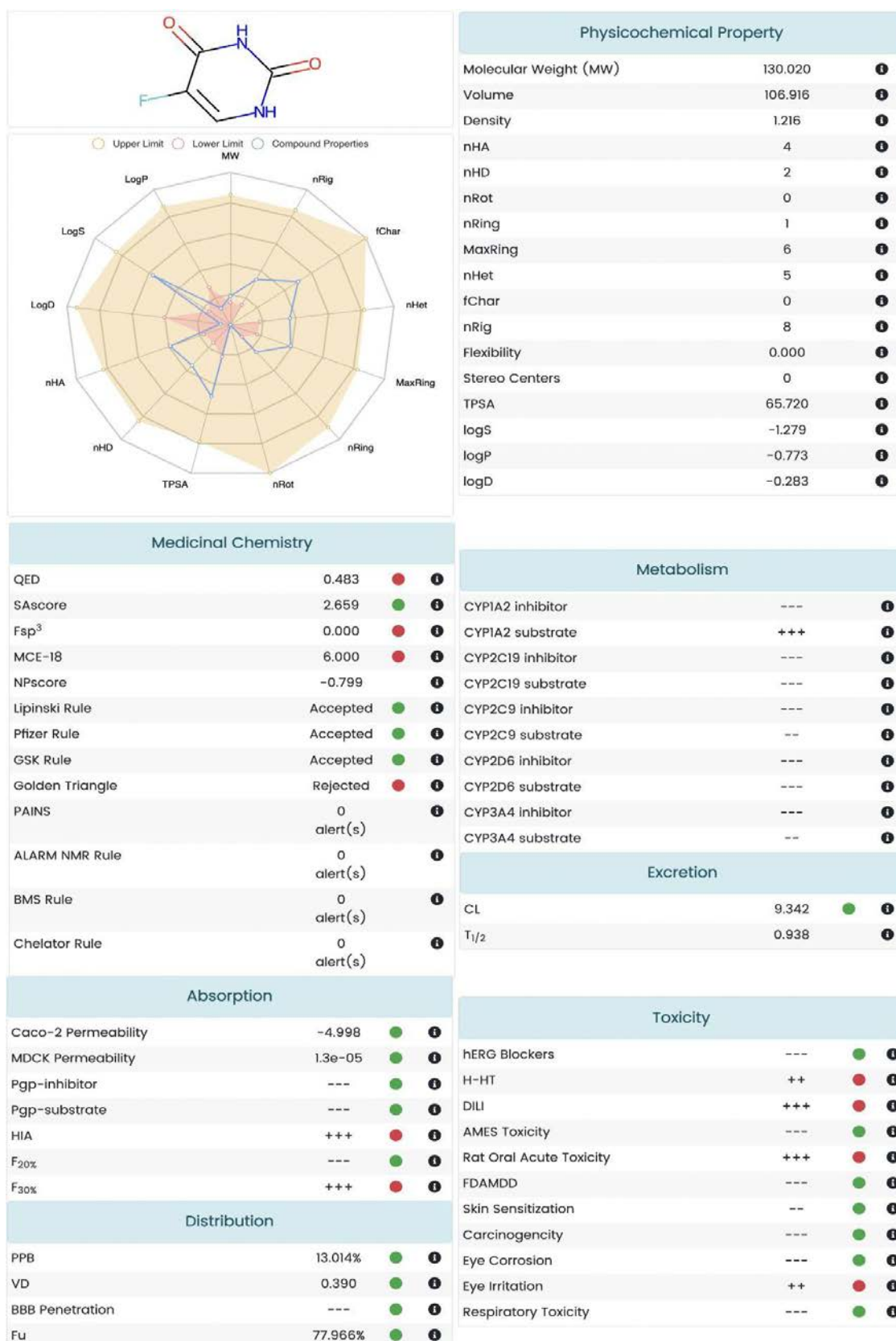
72. Callard, R. E.; Lau, Y. L.; Shields, J. G.; Smith, S. H.; Cairns, J.; Flores-Romo, L.; Gordon, J. The marmoset B-lymphoblastoid cell line (B95-8) produces and responds to B-cell growth and differentiation factors: role of shed CD23 (sCD23). *Immunology.* **1988**, *65*(3), 379-84.

73. Kumar, P.; Nagarajan, A.; Uchil, P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc.* **2018**, *2018*(6).

74. Ghosh, J.; Lawless, M. S.; Waldman, M.; Gombar, V.; Fraczekiewicz, R. Modeling ADMET. *Methods Mol Biol* **2016**, *1425*, 63-83.

## ДОДАТКИ

## Додаток А

Результат аналізу *in silico* речовини FU-5

Результат аналізу *in silico* речовини FTC