**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки**

**Центр теоретических проблем Физико-химической фармакологии**

**Российской академии наук**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| УДК: 577.3:61/63Регистрационный № 114111240055Инв. № 0131-2015-0004 |  | УТВЕРЖДАЮДиректор\_\_\_\_\_\_\_\_\_Ф.И. Атауллаханов«\_\_\_» \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2016 г. |

М.П.

**Отчет о результатах исследований**

**по программе Президиума РАН**

**«Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий»**

**Название проекта: Разработка нового лекарства для остановки и предотвращения кровотечений у пациентов, страдающих от гемофилии А и В и других нарушений гемостаза, основанного на продлении времени жизни активных факторов свертывания низкомолекулярными лигандами.**

Руководитель проекта \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ **/**М.А. Пантелеев **/**

подпись расшифровка

Москва 2016

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, д. ф.-м. н. проф. \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Пантелеев М.А.

 подпись, дата

в.н.с., к.б.н. \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Захарова Н.В.

 подпись, дата

в.н.с., к.б.н., \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Шибеко А.М.

 подпись, дата

с.н.с., к.б.н. \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Баландина А.Н.

 подпись, дата

с.н.с., к.б.н. \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Котова Я.Н.

 подпись, дата

с.н.с., к.ф.-м.н. \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Товбин Д.Г.

 подпись, дата

аспирант \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Обыденный С.И.

 подпись, дата

н.с., координатор \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Колядко В.Н.

 подпись, дата

**Реферат**

Отчет 12 стр., 1 ч., 3 рис., 1 табл. 4 источника.

Ключевые слова: гемофилия, дефициты гемостаза, регуляция свертывания крови, время жизни факторов свертывания, тромбодинамика, низкомолекулярные лиганды.

Цель исследования – разработка нового перорального лекарства для предотвращения кровотечений у пациентов, страдающих от гемофилии А и В и других нарушений гемостаза, которое представляет собой низкомолекулярный лиганд, увеличивающий время жизни факторов свертывания крови.

На данном этапе исследований были сформилированы требования к лигандам фХа, осуществлен поиск удовлетворяющих данным требованиям соединений и произведена оценка их влияния на свертывание.

Показано, что лиганды фХа, удовлетворяющие критерию быстрого и слабого связывания с фХа и взятые в оптимальных концентрациях, (частично) компенсируют нарушение фазы пространственного роста сгустка и восстанавливают распространение концентрации тромбина в гемофильной плазме. Такие соединения позволят уменьшить кровоточивость гемофильных мышей до нормального состояния.

Содержание

[Введение 5](#_Toc473538045)

[Основная часть 6](#_Toc473538046)

[1. Определить критерий, которому должны удовлетворять оптимизированные соединения-лиганды фХа 6](#_Toc473538047)

[2. Поиск оптимизированных соединений, изучение их свойств и влияния на активность фХа и на генерацию тромбина и образование фибрина в пространственно гетерогенной системе 8](#_Toc473538048)

[3. Выбор наиболее эффективное из найденных соединений для испытания на животных in vivo 9](#_Toc473538049)

[Выводы 10](#_Toc473538050)

[Список использованных источников 12](#_Toc473538051)

## Введение

Свертывание крови, включающее образование прочного фибринового сгустка, активируется при повреждении кровеносного русла. Данный процесс относится к реакционно-диффузионным, то есть включает в себя не только биохимические реакции последовательной активации ферментов (факторов свертывания), но и диффузию этих факторов от места их производства, что обеспечивает рост сгустка в пространстве. Основной вклад в процесс такого роста вносит диффузия наиболее долго живущего активного компонента системы – фактора свертывания IXa, входящего в комплекс внутренней теназы. При гемофилии А и В внешняя теназа отсутствует, так как нет в наличии одного из двух ее компонентов – фактора свертывания VIII или IX, соответственно. При этом рост фибринового сгустка в просвете сосуда обеспечивается за счет диффузии фактора Xa (фХа) и тромбина, время жизни которых в 10-100 раз меньше, чем у фактора IXa. В результате, скорость роста сгустка фибрина в гемофильной плазме снижена в 2-5 раз по сравнению с плазмой здоровых доноров, что обуславливает риск длительных кровотечений, в т.ч. угрожающих здоровью и жизни пациента.

Современные терапевтические препараты, использующиеся для лечения гемофилии представляют собой концентраты белков, полученные из донорской плазмы или рекомбинантно. Такие препараты имеют короткий период полувыведения (от 2 часов до 12-16 часов) и высокую стоимость; они применяются путем внутривенных инфузий, в случае тяжелых форм заболевания – несколько раз в неделю, что способствует развитию иммунного ответа и резистентности к препарату примерно у 20% пациентов (ингибиторная форма гемофилии) [5]. Как следствие развития иммунного ответа, возникает необходимость применения еще более дорогостоящих препаратов, обладающих шунтирующим механизмом действия: концентратом протромбинового комплекса или рекомбинантным фактором VIIa (Коагил-VII™) [6][7][8].

Нами был предложен метод лечения дефицитов гемостаза (в т.ч. гемофилии А и В), основанный на принципиально новом способе регуляции свертывания крови путем увеличения времени жизни активных факторов свертывания низкомолекулярными лигандами, которые предотвращают необратимое ингибирование активных факторов плазменными ингибиторами и не обладает описанными недостатками современных препаратов. Применение таких лигандов позволяет увеличить скорость диффузии фXa и увеличить скорость роста сгустка до значений скорости в плазме здорового донора. Применять препарат, основанный на низкомолекулярном соединении-лиганде, можно будет перорально в домашних условиях, что значительно снизит стоимость лечения. Эффективность указанного метода была доказана нами в опытах in vitro, в т.ч. с использованием нового теста свертывания «Тромбодинамика», в плазме пациентов с гемофилиями А и В, в которую добавляли известные лиганды фXa, а также в плазме пациентов, находящихся на антикоагулянтной терапии гепарином и варфарином. Добавление лигандов в плазму пациентов с различными дефицитами гемостаза приводило к увеличению скорости роста фибринового сгустка до значений, характерных для здоровых доноров. Также был синтезирован ряд новых низкомолекулярных соединений – карбамоилфенильных производных, отобранных на основе компьютерного скрининга потенциальных лигандов фXa.

Задачи на этап 2016 г.:

1) Математически формализовать и экспериментально подтвердить критерий, которому должны удовлетворять оптимизированные соединения-лиганды фХа.

2) Провести поиск оптимизированных соединений, удовлетворяющих выработанному критерию; изучить их свойства, влияние на активность фХа в буферной системе и плазме, влияние на генерацию тромбина и образование фибрина в пространственно гетерогенной системе.

3) Выбрать наиболее эффективное из найденных соединений для испытания на животных in vivo.

## Основная часть

### Определить критерий, которому должны удовлетворять оптимизированные соединения-лиганды фХа

Проведена формализация требований, предъявляемых к оптимальному соединению-лиганду фХа. Для этого в гомогенной системе, содержащей в начальный момент времени t фактор Ха (Xa0), антитромбин в плазменной концентрации (АТ) и варьируемую концентрацию лиганда (I), получено математическое описание кинетики фХа:

 $Xa\left(t\right)=\frac{Xa^{0}}{1+^{Ki}/\_{I}}e^{-t × k\_{-2}\left(1+^{I}/\_{Ki}\right)} + \frac{Xa^{0}}{1+^{I}/\_{Ki}}e^{-t × {k\_{1}AT}/{\left(1+^{I}/\_{Ki}\right)}}$ (1)

где k1 – константа скорости инактивации антитромбином, k2 и k-2 – константы скорости ассоциации и диссоциации лиганда и фХа, Ki – константа конкурентного ингибирования фактора Ха лигандом.

Данное выражение получено в следующем приближении:

*k2* × *I/ Ki* >> *k1* × *АТ* ≈ 1,4×10-2 c-1 (2)

в соответствии с которым кинетику фХа можно рассматривать как двух-стадийный процесс, включающий: 1) быстрое (~10 с) обратимое связывание фХа с лигандом и 2) последующую медленную (~103 с) инактивацию антитромбином и восполнение уровня фХа за счет распада обратимого комплекса с лигандом. Выражение (2) и есть формализованное требование, которому должны удовлетворять потенциальные соединения. Как показано на Рис.1А, это требование выражается в том, чтобы Ki составляло 1 нМ и выше, и значение I лежало в диапазоне величин 5×Ki – 10×Ki – при таких условиях достигается наибольший уровень свободного фХа. Наличие максимума в зависимости уровня свободного фХа от концентрации лиганда подтверждено экспериментально в очищенной системе с использованием хромогенного субстрата фХа, S-2765 (Рис.1Б; черные квадраты).



Рисунок 1. Определение оптимальных концентраций лиганда математическим моделированием (А) и экспериментальное подтверждение результатов модели (Б). А: По результатам моделирования кинетики фХа (1 нМ) в присутствие АТ (2,3 мкМ) и лиганда построена зависимость уровня фХа (t=15 мин) от концентрации лиганда, I (логарифмическая шкала), при разных значениях Ki. Б: В указанной системе измерена активность фХа с помощью хромогенного субстрата в момент времени 45 мин после начала инкубации с антитромбином и лигандом, при разных значениях I (черные квадраты). Показано среднее + SD по n=3 измерениям. Результаты аппроксимированы параметрической зависимостью Xa(I) по формуле (1) при трех значениях параметров k1 и Ki.

### Поиск оптимизированных соединений, изучение их свойств и влияния на активность фХа и на генерацию тромбина и образование фибрина в пространственно гетерогенной системе

Проведен поиск оптимизированных соединений, удовлетворяющих критерию (2), измерена их ингибирующая активность против фХа в буферной системе (с помощью S-2765) и в нормальной плазме крови (с использованием теста протромбинового времени), проведено сравнение их свойств с известным ингибитором фХа апиксабаном (Табл.1). По совокупности всех показателей, наиболее оптимальными являются соединения D-301 и D-310 (обведены рамкой): их константы ингибирования превышают 1 нМ, а отношение действующих концентраций в буфере и плазме составляет не более 2 порядков величин, что позволяет более точно подобрать оптимальные концентрации для добавления в плазму крови и для инъекции экспериментальным животным.

Кроме того, проведена предварительная оценка фармакологических характеристик найденных соединений. Оказалось, что все соединения из Табл.1 полностью растворяются в концентрации 1 мМ в растворителе полиэтиленгликоль (ПЭГ)-1500/вода/глицерин (2,4 г/2,5 г/1,5 г), а их связывание с бычьим сывороточным альбумином не превышает 50 %.

Таблица 1. Ингибирующие характеристики оптимизированных соединений

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Соединение | Ki в буфере с альбумином (нМ) | IC50 в плазме (нМ) | IC50/Ki |
| D-216 | 0,3 | 90 | 300 |
| D-301 | 1,5 | 110 | 70 |
| D-310 | 3,5 | 50 | 14 |
| апиксабан | 1,3 | 700 | 540 |

IC50 – эффективная концентрация в нормальной плазме, при которой протромбиновое время соответствует падению уровня фХ на 50 %.

На предыдущем этапе показано, что молекулярный механизм действия лигандов состоит в защите фХа от инактивации АТ и увеличении времени жизни и эффективного расстояния диффузии фХа в плазме крови. На настоящем этапе в плазме с индуцированной гемофилией А показано, что действие лиганда на систему свертывания заключается в поддержании пространственного распространения фронта концентрации тромбина. В отличие от нормальной плазмы, в которой автоволновое распространение концентрации тромбина происходит со скоростью 28 мкм/мин (Рис.2А), в гемофильной плазме распределение концентрации тромбина практически не изменяется (скорость фронта 5 мкм/мин) и имеет вид диффузионного профиля (Рис.2Б). Однако, при добавлении в гемофильную плазму одного из выбранных соединений D-301, распространение фронта концентрации тромбина происходит со скоростью порядка 15 мкм/мин (Рис.2В).



Рисунок 2. Оптимизированный лиганд D-301 в гемофильной плазме восстанавливает распространение фронта тромбина в пространстве. Профили тромбина показаны в моменты времени 1, 10, 20, 30, 40, 50 и 59 мин после активации свертывания в тесте тромбодинамики-4D в плазме человека: нормальной плазме (А); плазме с гемофилией А, индуцированной 0,5 мкг/мл анти-фVIII, и добавленным 0,1% растворителем (Б) или 1 мкМ соединения D-301 (В).

### Выбор наиболее эффективное из найденных соединений для испытания на животных in vivo

Для проведения дальнейших испытаний в животных моделях гемостаза in vivo выбраны соединения D-301 и D-310. Такие испытания подразумевают получение воспроизводимых результатов при измерении времени кровотечения у анестезированных мышей с отрезанным 3-мм кончиком хвоста. Эффект этих соединений на гемофильных мышах будет сравниваться с кровотечением у нормальных и гемофильных мышей, а также с эффектом контрольного, охарактеризованного лиганда фХа – апиксабаном. Поэтому на данном этапе выбран растворитель, универсальный для всех низкомолекулярных лигандов (5-% раствор ПЭГ-1500/вода/глицерин), инъекция которого в кровоток мыши не изменяет параметров кровоточивости и не приводит к большому разбросу результатов. На мышах при введении такого растворителя получены значимые различия (отмечены \*) как в размере фибринового сгустка (Рис.3А), так и во времени кровотечения (Рис.3Б) и объеме кровопотери, между группами нормальных (черные точки) и «гемофильных» (красные) мышей. Введение контрольного лиганда (30 и 50 мкМ) «гемофильным» мышам приводило к достоверному увеличению размеров сгустка до нормальных значений (отмечено #).



Рисунок 3. Размер фибринового сгустка в плазме (А) и время кровотечения (Б) адекватно и достоверно оценивают состояние гемостаза «гемофильных» мышей линии C57BL/6. Всем группам (количество животных в группе указано n=) вводили внутривенно 5% растворителя, в некоторых случаях содержавшего апиксабан; «гемофильным» мышам вводили также 0,5 мкг/мл анти-фVIII. У самцов мышей под анестезией, после отрезания 3 мм кончика хвоста, измеряли общую длительность кровотечения за время наблюдения 900 с (обозначено пунктиром). Из сердца мышей забирали кровь на цитрат и получали плазму, в которой исследовали рост сгустка. Значимость различий оценивали тестом Манна-Уитни с поправкой Бонферрони; \* – достоверное различие между нормальными и «гемофильными» мышами, # –между группами «гемофильных» мышей.

## Выводы

Главным выводом данного этапа является заключение о том, что лиганды фХа, удовлетворяющие критерию быстрого и слабого связывания с фХа и взятые в оптимальных концентрациях, (частично) компенсируют нарушение фазы пространственного роста сгустка и восстанавливают распространение концентрации тромбина в гемофильной плазме. Такие соединения позволят уменьшить кровоточивость гемофильных мышей до нормального состояния.

Все задачи данного этапа проекта выполнены успешно. Необходимо продолжить выполнение проекта в 2017 г., чтобы подтвердить восстановление нормальной кровоточивости у мышей с гемофилией А под действием оптимизированных соединений-лигандов фХа.

## Список использованных источников

1. K. M. Cawthern, C. van ’t Veer, J. B. Lock, M. E. DiLorenzo, R. F. Branda, and K. G. Mann, “Blood coagulation in hemophilia A and hemophilia C.,” *Blood*, vol. 91, no. 12, pp. 4581–92, Jun. 1998.
2. M. Franchini and P. M. Mannucci, “Hemophilia A in the third millennium.,” *Blood Rev.*, vol. 27, no. 4, pp. 179–84, Jul. 2013.
3. E. Berntorp and A. D. Shapiro, “Modern haemophilia care.,” *Lancet*, vol. 379, no. 9824, pp. 1447–56, Apr. 2012.
4. “Руководство по лечению гемофилии, опуб. World Federation of Hemophilia.” 2008.