

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

УДК 615, 576, 57.021, 5772

**ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ СКРИНИНГ ПРИ ПОИСКЕ
ЛЕКАРСТВ: ПРОБЛЕМЫ И РЕШЕНИЯ****Дмитрий Михайлович Хушпульян^{1, 2}, Ирина Николаевна Гайсина³,
Сергей Вячеславович Никулин², Татьяна Анатольевна Чубарь⁴, Святослав
Сергеевич Савин⁴, Ирина Георгиевна Газарян^{2, 4}, Владимир Иванович
Тишков^{1, 4}**¹ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Институт биохимии им. А.Н. Баха² Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», факультет биологии и биотехнологии³ Университет Иллинойса в Чикаго, кафедра медицинской химии и фармакогнозии⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет**Авторы, ответственные за переписку:** Дмитрий Михайлович Хушпульян, hushpulia@gmail.com; Владимир Иванович Тишков, tishkovvi@my.msu.ru, vitishkov@gmail.com

Аннотация. Широкое использование методов высокопроизводительного скрининга (HTS) в исследованиях по поиску новых лекарств во всем мире так и не привело к существенному увеличению количества новых лекарств на рынке. В данном обзоре мы обсуждаем новые тенденции в открытии лекарств, которые возникли благодаря пониманию того, что большинство заболеваний являются многофакторными, что один и тот же фермент очень часто имеет множество белковых субстратов и продукты модификации этих белков выполняют совершенно разные функции. Следовательно, новые подходы сосредоточены на разработке лекарств, которые 1) запускают пути выживания, чтобы вернуть организм к гомеостатическому балансу, 2) ингибируют ферменты, модифицирующие гистоны или факторы транскрипции не в активном центре, а путем конкурентного вытеснения белковых субстратов из фермент-субстратных комплексов. Хорошим примером для обоих подходов является разработка активаторов антиоксидантной защиты. Мы анализируем и иллюстрируем проблемы широко используемых методов высокопроизводительного скрининга *in vitro*, а также кратко обсуждаем преимущества и ограничения моделей на мелких животных. Новые подходы дополняют стандартные методы скрининга и не заменяют тестирования на млекопитающих. Разработка трансгенных репортерных мышей для мониторинга эффектов исследуемых лекарств с помощью визуализации *in vivo* чрезвычайно перспективна для выбора правильных дозировок и режимов введения для полномасштабных фармакокинетических исследований.

Ключевые слова: антиоксидантный ответ, репортерный анализ, Nrf2, Keap1, флуоресцентная поляризация, животные модели

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2024-65-2-96-112

Сокращения: HTS – высокопроизводительный скрининг; ADMET – всасывание, распределение, метаболизм, выведение, токсичность; ФК – фармакокинетика; DMSO – диметилсульфоксид; РНКи – РНК-интерференция; GFP – зелёный флуоресцентный белок; ARE-Luc – Antioxidant Responsive Element-Luciferase; Nrf2 – Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; bZIP – Basic Leucine Zipper Domain; ЦНС – центральная нервная система; МСАО – модель окклюзии средней мозговой артерии; FDA – Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США; HIF – фактор, индуцируемый гипоксией; FP – поляризация флуоресценции.

Финансирование. Разделы 1 и 2 выполнены в рамках гранта РНФ 20-15-00207, остальная часть работы выполнена в рамках государственного задания.

Для цитирования: Хушпульян Д.М., Гайсина И.Н., Никулин С.В., Чубарь Т.А., Савин С.С., Газарян И.Г., Тишков В.И. Высокопроизводительный скрининг при поиске лекарств: проблемы и решения // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2024. Т. 65. № 2. С. 96–112.

SCIENTIFIC REVIEW

HIGH THROUGHPUT SCREENING IN DRUG DISCOVERY: PROBLEMS AND SOLUTIONS

Dmitry M. Hushpulia^{1, 2}, Irina N. Gaisina³, Sergey V. Nikulin², Tatiana A. Chubar⁴, Svyatoslav S. Savin⁴, Irina G. Gazaryan^{2, 4}, Vladimir I. Tishkov^{1, 4}

¹ Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

² National Research University “Higher School of Economics”, Faculty of Biology and Biotechnology, Moscow, Russian Federation

³ Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, University of Illinois at Chicago, Chicago IL, USA;

⁴ Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Corresponding authors: Dmitry M. Hushpulia, hushpulia@gmail.com; Vladimir I. Tishkov, tishkovvi@my.msu.ru, vitishkov@gmail.com

Abstract. World-wide introduction of high throughput screening (HTS) methods in drug discovery research did not result in the increased number of novel medications on the market. We discuss novel trends in drug discovery that came from the understanding that majority of diseases are multifactorial and that one enzyme has many protein substrates. Hence, new approaches are focused on development of drugs, which (1) trigger survival pathways to return the organism to homeostatic balance, and (2) inhibit enzymes modifying histones or transcription factors not at the active site, but by displacement of protein substrates from the enzyme complexes. A good example for both approaches comes from the development of activators of antioxidant defense. We analyze and illustrate problems of commonly used *in vitro* HTS assays, and briefly discuss advantages and limitations of small animal models. The novel approaches are complementary to the standard HTS and do not substitute for testing in mammals. Development of transgenic reporter mice to monitor drug effects by means of *in vivo* imaging is extremely promising to select proper dosage and administration regimes for full-range PK studies.

Keywords: antioxidant response, reporter assay, Nrf2, Keap1, fluorescent polarization, animal models

Abbreviations used: HTS – high throughput screening; ADMET – absorption, distribution, excretion, toxicity; PK – pharmacokinetics; DMSO – dimethyl sulfoxide; RNAi – RNA interference; GFP – green fluorescent protein; ARE-Luc – Antioxidant Responsive Element-Luciferase; Nrf2 – Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; bZIP – Basic Leucine Zipper Domain; CNS – central nervous system; MCAO – MCAO – Middle Cerebral Artery Occlusion; FDA – Food and Drug Administration; HIF – hypoxia inducible factor; FP – fluorescence polarization.

Financial Support. Parts 1, 2 were carried out with financial support from Russian Science Foundation grant No 20-15-00207, The other part of work was done within the framework of the state task.

For citation: Hushpulian D.M., Gaisina I.N., Nikulin S.V., Chubar T.A., Savin S.S., Gazaryan I.G., Tishkov V.I. High Throughput Screening in Drug Discovery: Problems and Solutions // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. 2024. T. 65. № 2. S. 96–112.

1. Введение. Основы высокопроизводительного скрининга (HTS)

Традиционно процесс открытия лекарств начинается с идентификации белка-мишени, причастного к определенному заболеванию человека, затем проводится поиск химического (или биологического) соединения, которое может компенсировать неисправность белка или, наоборот, осуществить его активацию. Секвенирование геномов, микрочипы ДНК, робототехника, миниатюризация и биоинформатика кардинально меняют искусство открытия лекарств. Фармацевтические компании первыми объединили новые методы в стратегию разработки лекарств, уделив особое внимание методам высокопроизводительного скрининга (High Throughput Screening, HTS). Что же это такое? HTS – тотальный скрининг миллионов соединений для выявления тех молекул, которые активны в отношении конкретной мишени или модели заболевания. За HTS следуют вторичный и третичный скрининги, в которых анализируются соединения, близкие по структуре к молекуле, найденной при первичном скрининге, а выявленные на этих этапах совпадения используются в доклинических исследованиях заболеваний человека на животных моделях. Обычно только небольшая доля биоактивных молекул успешно проходит доклинические исследования изучаемого заболевания на грызунах. Это может зависеть от фармакокинетики исследуемых молекул (и просто от растворимости), и для выявления наиболее перспективных соединений с самого начала проводят так называемые ранние исследования абсорбции, растворимости, метаболической стабильности

и токсичности (ADMET). Тем не менее, несмотря на многочисленные успехи, наблюдается явное замедление разработки новых лекарственных препаратов с использованием подхода HTS. «Бутылочным горлышком» и критической стадией в процессе разработки лекарства с помощью HTS является переход от молекулы-кандидата к перспективному лекарству или, как часто говорят, «все низко висящие плоды уже собраны». Поскольку причиной отсева многих молекул-кандидатов (хитов) считают ограничения анализов *in vitro*, был предложен скрининг целых животных. В настоящее время методы HTS для мелких животных активно развиваются.

1.1. Качество химических библиотек

Существует несколько шагов, на которых можно сделать выбор ложного кандидата. Успех HTS зависит от качества используемой библиотеки соединений и проверенного биохимического анализа или модели заболевания, подходящей для целей HTS. Проблемы возникают из-за используемых коммерческих библиотек химических соединений. Многие компании поставляют библиотеки соединений, в том числе небольшие специализированные библиотеки, но не всегда производят соединения сами. Как правило, их перекупают у разных поставщиков, и часто хранят полученные соединения на полках годами. Такое соединение может разлагаться или окисляться при хранении, даже до того, как оно будет приготовлено в растворе DMSO (10 мМ) в формате микропланшета. Библиотеку в формате микропланшета охлаждают и помещают при комнатной температуре для оттаивания DMSO за день до проведения HTS. Многократное рутинное использование

библиотеки в профильных исследовательских учреждениях, занимающихся HTS, означает наличие нескольких циклов оттаивания/замораживания, а следовательно, соединения могут разлагаться на воздухе в растворе DMSO. Неудивительно, что степень отбора молекул-кандидатов, подтвержденных альтернативными исследованиями, не так высока, как хотелось бы. Более важной проблемой является наличие примесей. Чистота соединений библиотеки составляет от 95 до 99% (в лучшем случае). Очевидно, что на чистоту соединения влияет конкретный способ его получения, и особенно конечные стадии синтеза и очистки. Можно представить себе серию вторичных аминов, образующихся на заключительном этапе на основе обычного хлорпроизводного каркаса, который алкилирует ароматические амины разной структуры. В зависимости от выхода и протокола очистки конечный продукт может содержать около 1–2% предшественника – алкилирующего агента, который взаимодействует с ферментами и белками, содержащими активные сульфгидрильные группы и амины. Более того, повторный синтез без должной очистки просто подтвердит ложный результат скрининга. Проблемы с составом и чистотой библиотеки, а также возможное решение обсуждаются в работе [1]. Для некоторых мишеней сравнительно небольшие библиотеки на основе фрагментов показывают огромное преимущество [2].

1.2. Качество первичного анализа HTS

Первичный анализ, подходящий для HTS, требует проверки результатов (валидации) для выбранной мишени. Для анализа HTS должен быть положительный и отрицательный контроль, и оба соединения должны присутствовать в качестве внутренних стандартов на каждом микропланшете HTS для получения так называемого Z-фактора, который рассчитывается как тройная сумма отклонений для отрицательного и положительного контроля, разделенная на разницу в средних значениях положительного и отрицательного контроля, а затем общую сумму вычитают из 1. Z-фактор никогда не превышает 1, а для отличного скрининга Z-фактор составляет $>0,5$. HTS обычно представляет собой измерение в одной точке, несмотря на успешные примеры, указывающие на преимущества разных концентраций в первичном HTS. Это создает еще одну проблему – правильный выбор концентрации препарата для HTS. Использование

робототехники позволяет вводить нанолитры 10 мМ раствора исходного лекарственного средства в лунку микропланшета для создания конечной концентрации 10 мкМ, которая обычно используется в HTS; 10 мМ исходный раствор в DMSO довольно концентрированный, поэтому соединения могут димеризоваться, что приводит к ложным результатам или, наоборот, при более чем 1000-кратном разбавлении в среде для анализа соединения может выпадать в осадок, что исключает из рассмотрения плохо растворимых кандидатов в лекарственные средства. Для анализов *in vitro* с высокой концентрацией рекомбинантных белков это может привести к неспецифической адсорбции лекарственного средства на белке. Если предполагается, что HTS идентифицирует лекарства, действующие путем вытеснения белка из белок-белкового комплекса, концентрации 10 мкМ будет недостаточно для запуска такого обратимого процесса вытеснения, а использование более высокой концентрации может усугубить эффект присутствующих примесей и/или вклад неспецифических гидрофобных взаимодействий.

В обзоре [3] приведено сравнение химических и клеточных методов анализа для целей HTS. В табл. 1 представлено краткое сравнение преимуществ и недостатков биохимических гомогенных и клеточных анализов *in vitro* в качестве первичного анализа HTS. Мишень обычно известна, за исключением скрининга на клеточных моделях различных заболеваний или состояний, где мишень может быть неизвестна, но идентифицирована с помощью скрининга РНКи или анализа данных HTS. Гомогенный анализ *in vitro* обычно основан на рекомбинантных белках человека, однако следует помнить, что существуют различия между рекомбинантным белком, продуцируемым бактериями, дрожжами или насекомыми, и эндогенным белком, синтезируемым в клетке человека: незначительные структурные различия могут влиять на средство отобранных кандидатов при перемещении их из пробирки в клетку. Все фармацевтические компании полагаются на гомогенный анализ *in vitro* в качестве первичного скрининга, поскольку они не верят, что клеточный скрининг может быть специфичным для мишени. Однако эта популярная точка зрения больше не верна для таких клеточных анализов, где клетка играет роль естественного микроконтейнера для специально разработанной реакции или взаимодействия, основанного на меченых сверхэкспрессируемых белках. Скрининг на клеточных линиях,

Общее сравнение высокопроизводительных скринингов

Высокопроизводительные скрининги	<i>In vitro</i> гомогенный	<i>In vitro</i> клеточный	Клеточные модели
Известная мишень	да	да	да / нет
Скрининг лекарств	да	да	да
Скрининг РНКи	нет / да	да	да
Сходство с человеком	нет / да	высокое	высокое
Клеточная проницаемость	нет	да	да
Проницаемость через ГЭБ	нет / да	нет / да	нет / да
Токсичность	нет	да	да
Конкуренция с внутриклеточными компонентами	нет	да	да

полученных от человека, имеет ряд преимуществ: успешными будут только проникающие в клетки и нетоксичные препараты. Еще одним преимуществом является то, что клеточное содержимое по составу и концентрации метаболитов очень близко к клеткам человеческого организма. Это устраняет проблемы, возникающие из-за конкуренции лекарств с низкомолекулярными ко-субстратами или эндогенными белковыми субстратами. Например, все ингибиторы NIF-пролилгидроксилазы (альфа-кетоглутарат-зависимой железо-содержащей негемовой диоксигеназы), разработанные в ферментативном анализе *in vitro*, на практике плохо конкурируют с ко-субстратом (альфа-кетоглутаратом) в клетке, где его концентрация варьирует в диапазоне 1–2 мМ [4], что в итоге приводит к увеличению дозы препарата *in vivo*. Прежде чем приступать к испытаниям на животных, ферментативный скрининг *in vitro* обычно дополняется вторичными клеточными анализами и клеточными моделями. По сравнению с целым животным, клеточный скрининг не дает возможности контролировать проницаемость лекарственного средства в различные органы и метаболические превращения, которые могут привести к неожиданной биологической активности (если таковая имеется) или токсичности продуктов окисления лекарственного средства, образующихся в печени.

2. Современные тенденции: новые мишени и новые методы анализа

Одной из современных тенденций в открытии лекарств является переход от установки «одна болезнь – одна мишень» к пониманию того, что

все болезни представляют собой сдвиг в гомеостатическом балансе, который включает в себя множество взаимодействующих генов и белков, участвующих в сигнальных путях до и после неисправного белка или гена. Следовательно, в центре внимания оказывается HTS для модуляторов различных факторов транскрипции или ферментов, контролирующих эпигенетику. Для иллюстрации проблем, обсуждаемых в разделах 1.1–1.2, мы решили взять в качестве примера успехов и неудач в разработке лекарств поиск активаторов Nrf2, который ведется по всему миру во многих академических лабораториях и компаниях.

2.1. Nrf2 как мишень

Многообещающая стратегия лечения нейродегенеративных заболеваний включает фармакологически индуцированную активацию скоординированной антиоксидантной генетической программы для смещения внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса в сторону гомеостатического состояния посредством экспрессии детоксифицирующих белков и антиоксидантных ферментов [5]. Ключевым фактором транскрипции, управляющим антиоксидантной защитой, является Nrf2 – член семейства так называемых cap'n'collar белков bZIP. Помимо своей роли в защите от окислительного стресса, Nrf2 запускает экспрессию генов, ответственных за детоксикацию лекарств, метаболизм железа, транспортеры экскреции, иммуномодуляцию, гомеостаз кальция. Широта этого эндогенного ответа предполагает, что активация Nrf2 может уравновешивать патогенез большинства, если

не всех, нейродегенеративных заболеваний [6–8]. Пациенты с болезнями Альцгеймера и Паркинсона имеют недостаточную активацию Nrf2 в головном мозге [9], а предварительная обработка, приводящая к фармакологической активации Nrf2, является защитной на животных моделях многочисленных неврологических состояний [10–13].

2.2. Предыстория: механизм активации Nrf2

Nrf2 конститутивно вырабатывается в клетке. В отсутствие стресса из окружающей среды Nrf2 секвестрируется белком Keap1 (Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок-1), адаптером убиквитинлигазы Cul3-Rbx1 E3. Полиубиквитинирование остатков лизина в домене Neh2 метит белок Nrf2 для протеасомной деградации. Белок Keap1 действует как окислительно-восстановительный сенсор, и как только электрофильный стресс приводит к модификации реактивных остатков цистеинов в Keap1, он вызывает кон-

формационные изменения, приводящие к высвобождению и стабилизации Nrf2. Затем Nrf2 транслоцируется в ядро, где образует гетеродимеры с другими регуляторами транскрипции, такими как малые белки Maf, и индуцирует экспрессию антиоксидантных генов, контролируемых промоторами с элементом антиоксидантного ответа (ARE) (рис. 1).

2.3. Клеточный скрининг активаторов Nrf2 обычно выявляет только электрофильные активаторы

Обычные транскрипционные репортеры с геном люциферазы под интересующим промотором не специфичны для определенной стадии, контролирующей активацию экспрессии, а демонстрируют интегрированный ответ многих стадий, включая фосфорилирование транскрипционных факторов, ацетилирование, транслокацию в ядро, образование комплексов с белками-хелперами и т.д. Все современные клеточные репортеры активаторов Nrf2 для HTS включают использова-

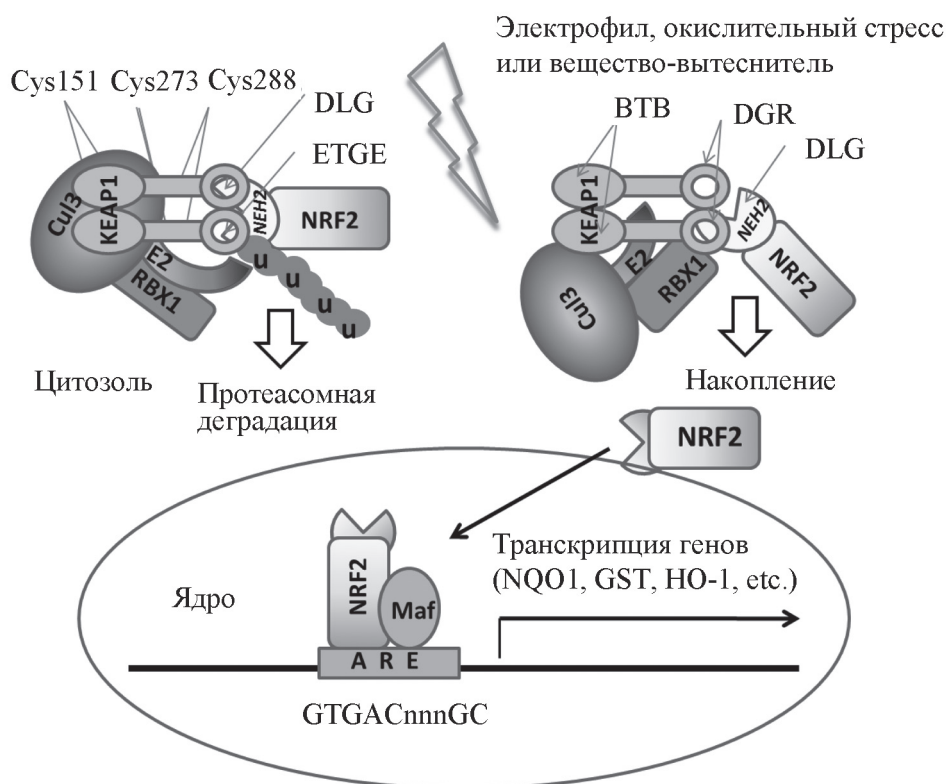


Рис. 1. Регуляция белковой стабильности Nrf2 взаимодействием с комплексом убиквитинлигазы. Keap1 – белок-адаптер комплекса и редокс-сенсор, растягивает домен Neh2 фактора Nrf2 между двумя своими Kelch доменами, для обеспечения доступа убиквитинлигазы Cul3 к лизинам Neh2. При окислительном стрессе конформация Keap 1 изменяется за счет модификации реактивных тиолов, Nrf2-белок высвобождается из комплекса и стабилизируется

ние антиоксидант-чувствительных регуляторных элементов ДНК (ARE), слитых с маркерным геном, таким как люцифераза [14], щелочная фосфатаза плаценты человека, или GFP, для отслеживания активации Nrf2.

Новый подход, который мы разрабатываем [15, 16], основан на конститутивной экспрессии минимальной части транскрипционного фактора Nrf2 (достаточной для распознавания Keap1 и последующего убиквитинирования), слитой с люциферазой светлячка. Новый репортерный анализ оказался наиболее чувствительным к первой стадии активации Nrf-2, а именно к стабилизации белка Nrf2. Репортер идентифицирует препараты, работающие на первом, избирательном этапе стабилизации фактора транскрипции. Недавно нами был оптимизирован размер домена Neh2 и было показано, что фрагмент 16–85 аа достаточен для распознавания слитого белка и, более того, гарантирует лучшую магнитуду активации [17]. Слитые репортеры Neh2-luc в 10 раз более эффективны по величине активации по сравнению с транскрипционными репортерами, и, что более важно, активацию репортера можно отслеживать в реальном времени уже через несколько минут после добавления лекарства [16]. Репортер Neh2-luc чрезвычайно чувствителен к присутствию алкилирующих агентов и может использоваться в качестве инструмента контроля качества библиотеки соединений, а именно для оценки чистоты.

Для иллюстрации проблем с качеством HTS-библиотек можно привести два примера из наших исследований. При проведении скрининга

библиотеки из 7000 соединений (ASDI) мы идентифицировали более 20 групп активаторов Nrf2 новой химической структуры. Среди совпадений обнаружены замещенные пирролы, эффект активации которых зависит от характера замещений в пиррольном кольце: наличие 5-фенильного заместителя полностью устраняет эффект активации. Вероятно, исходные соединения пиррола были неактивны, но при трехмесячном хранении в виде раствора DMSO при 4 °C они начали разлагаться, образуя чрезвычайно эффективный активатор Nrf2. Масс-спектрометрический и ЯМР-анализ продуктов разложения соответствует пути, показанному на рис. 2. Имид и альдегид после разделения не показали активацию репортера при коротком времени инкубации. Предполагается, что активным компонентом является енольная форма продукта деградации, показанная на рис. 2, поскольку его трикетонный изомер принципиально не отличается от имидного продукта, который был неактивен. Содержание активного продукта деградации оценивалось в 5–6%. Очищенная форма этого интермедиата продемонстрировала активацию репортера в наномолярном диапазоне концентраций.

Еще одним сюрпризом стало изучение хитов тиено- и пиразолопиримидинов, где активное вещество оказалось синтетическим предшественником ряда соединений, присутствующим на уровне 1–1,5%. Приведенные выше два примера ложных хитов иллюстрируют требования к качеству библиотек HTS, обсуждавшиеся в нашем обзоре выше, а также в работе [18], где проанализированы «проблемные» структуры,

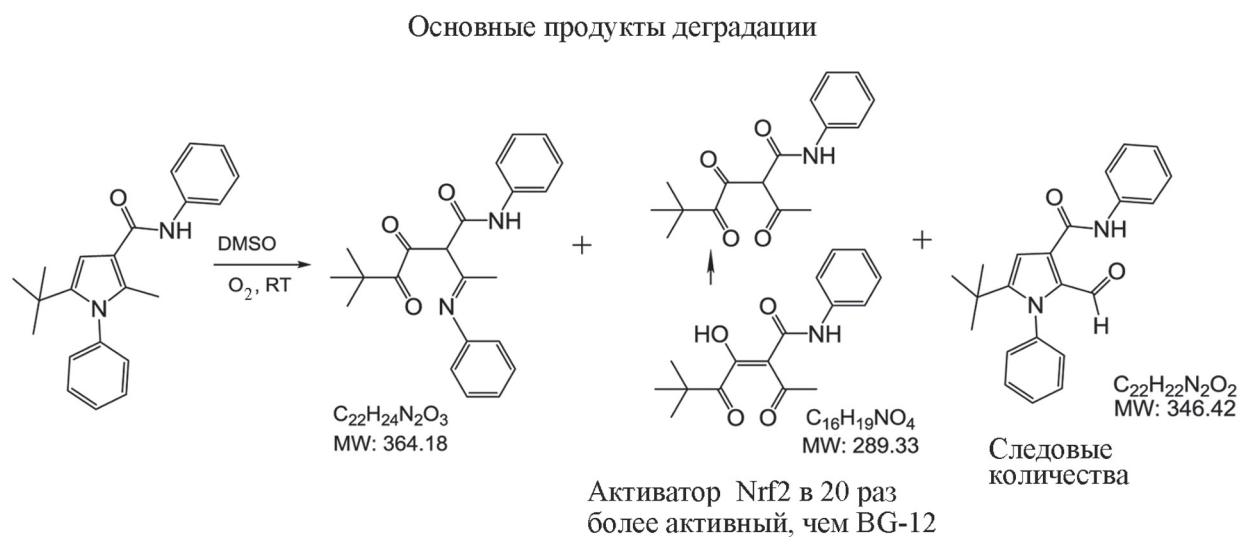


Рис. 2. Путь деградации замещенных пирролов при хранении в маточных растворах DMSO

присутствующие в библиотеках соединений, и сформулированы требования к успешным соединениям. Следует отметить, что многие известные и успешные лекарства не удовлетворяют этим строгим структурным требованиям.

2.4. На рынке имеется всего три одобренных FDA активатора Nrf2

Существует множество природных активаторов Nrf2, продаваемых в виде растительных добавок, действующих по механизму алкилирования, таких как куркумин (куркума), сульфорофан (брокколи), флавоноиды (кверцетин, физетин) и т.д. Однако существуют только три активатора Nrf2, одобренных FDA. Среди них диметилфумарат, коммерциализируемый как TecfideraTM. Он был одобрен в 2013 г. для лечения рассеянного склероза [19], несмотря на его побочный эффект – снижение количества лимфоцитов на 30% [20]. В 2019 г. FDA одобрило дироксимельфумарат под торговой маркой VumerityTM для лечения рецидивирующего рассеянного склероза.

Одним из основных требований для финансирования оптимизации лидирующих соединений в рамках программ НИИ (Национальный институт здоровья США) по разработке лекарств является демонстрация биологической активности в 100-кратном диапазоне концен-

траций без признаков токсичности. Примером кандидата-активатора Nrf2, который не следовало рассматривать для будущей оптимизации, является бардоксолон. Его клинические испытания [21] были прекращены из-за увеличения частоты случаев сердечной недостаточности в 1,83 раза, включая остановку сердца. Как показано на рис. 3, при исследовании в репортерном анализе Neh2-luc при инкубации в течение трех часов бардоксолон активен лишь в 10-кратном диапазоне концентраций (от 30 до 300 нМ), быстро становясь токсичным при концентрациях >600 нМ. Это очень узкий диапазон безопасных концентраций, поэтому бардоксолон не следовало с самого начала рассматривать как терапевтическое средство. Тем не менее, Reata Pharmaceuticals в 2023 г. «протолкнула» через FDA представителя второго поколения синтетического тритерпеноидов олеанана – омавелоксолон, химическая структура которого отличается от бардоксолон всего одним заместителем. Омавексолон под коммерческим названием Skyclarus [22] был одобрен FDA в ускоренном порядке для лечения пациентов с атаксией Фридриха, редким (орфанным) заболеванием. Оба соединения являются чрезвычайно сильными алкилирующими агентами, стабилизирующими Nrf2 в концентрациях на два по-

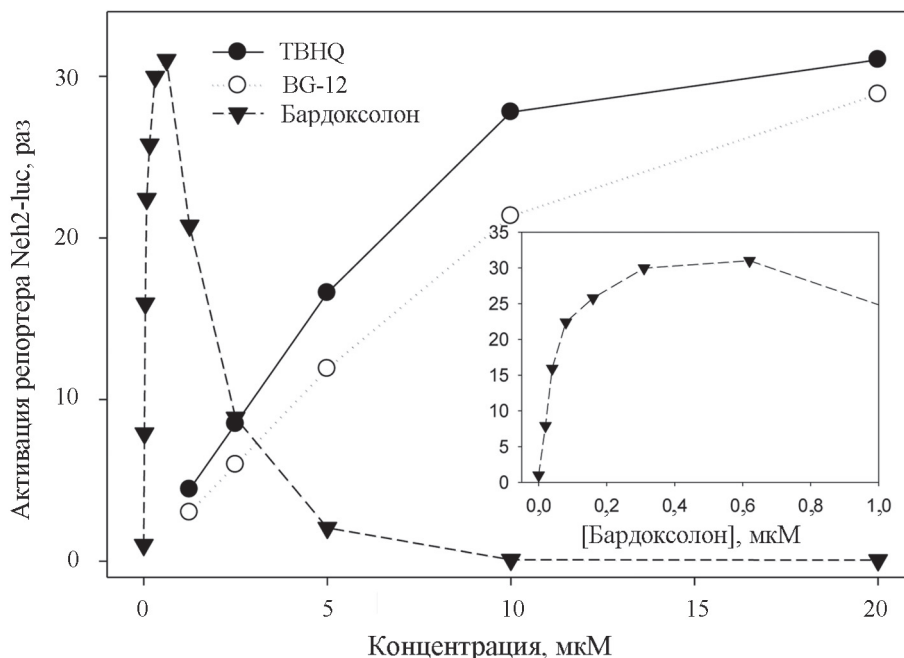


Рис. 3. Токсичность бардоксолонa в субмикромольных концентрациях в репортерном анализе Neh2-luc при трехчасовой инкубации. Для сравнения показаны данные для диметилфумарата и *трет*-бутилгидрохинона

рядка меньших, чем у диметилфумарата. Они не специфичны к мишени, а поэтому чрезвычайно токсичны. Клинические испытания омавелоксолон показали частые побочные эффекты, превышающие 10%-й уровень. К сожалению, ускоренное одобрение FDA для редких заболеваний не требует комплексных клинических испытаний, что позволяет токсичным лекарствам попадать на рынок.

2.5. Скрининг по принципу конкурентного замещения белка – преимущества и проблемы

Почти половина существующих препаратов нацелена на ферменты. Одна из новых тенденций в открытии лекарств связана с пониманием существования множества белковых субстратов у одного фермента и необходимостью ингибировать только одно специфическое взаимодействие/превращение целевого белка, но не всех других белковых субстратов. Решение проблемы заключается в ингибировании только одного специфического белок-белкового взаимодействия. Здесь может быть использован весь арсенал разработанных ранее методов анализа белок-белкового взаимодействия при исследовании рецепторов. Кроме того, за изменением конформации белка при высокоаффинном связывании низкомолекулярного соединения можно следить с помощью анализа термического сдвига, который в формате HTS был впервые внедрен в 90-е годы (дифференциальная сканирующая флуориметрия или анализ «Thermofluor»). Идея была выведена на совершенно новый уровень с разработкой метода микромасштабного термофореза (NanoTemper Technologies GmbH, Германия), позволяющего отслеживать изменения «водного щита», окружающего белок, при связывании соединения-лиганда. Недавнее применение модернизированного метода для скрининга библиотеки объемом в полмиллиона соединений было описано в [23]. Другой подход HTS – масс-спектрометрия с аффинной селекцией (AS-MS), был использован компанией «Merck» для идентификации ингибиторов пролилгидроксилазы HIF, работающих не в активном центре фермента [24]. Интересующий белок смешивали с десятками соединений из библиотеки, смесь элюировали на колонке ВЭЖХ для отделения связанной с лигандом формы и сразу же идентифицировали связанный лиганд масс-спектрометрически [24]. К сожалению, все соединения, которые, как сообщается, на-

рушают белок-белковое взаимодействие, имеют множественные кольца и не всегда удовлетворяют правилам Липински для хороших кандидатов в лекарственные средства [25].

2.6. Метод поляризации флуоресценции (FP) *in vitro* в формате HTS для мониторинга вытеснения белка

Алкилирующие или про-оксидантные активаторы Nrf2 всегда вызывают нежелательные побочные эффекты. Академические лаборатории и различные компании охотятся за малыми молекулами-активаторами Nrf2, работающими через механизм вытеснения Nrf2. В высокопроизводительном анализе вытеснения низкомолекулярное соединение конкурирует с флуоресцентным пептидом Nrf2 за рекомбинантный белок Keap1 и, таким образом, демонстрирует снижение FP. Трудно поверить, но даже в этом случае анализ выявляет слишком много ложных хитов, что отражает общую проблему анализов *in vitro*, работающих с высокими концентрациями целевого белка, как обсуждается ниже.

Соединения 2 и 4 (рис. 4) были идентифицированы совместными усилиями компаний «Biogen Idec», «Merrimack Pharmaceuticals», «Celgene Corporation» (США), «Evotec AG» (Германия) и «NoValix» (Франция) [26]. У соединения 4 две молекулы упаковываются внутрь Kelch-домена, а в анализе ARE-luc не наблюдается никакой биологической активности. Это «открытие» прекрасно иллюстрирует недостаток гомогенного анализа с гидрофобным рекомбинантным белком и гидрофобными соединениями в очень концентрированных растворах (как обсуждалось в разделе 1.2). Соединение 5 было обнаружено в ходе виртуального скрининга [27], и его взаимодействие с Keap 1 было подтверждено с помощью анализа термического сдвига (соединение 5 показало сдвиг на 5 °С, тогда как соединение 2, использованное в качестве контроля, показало сдвиг только на 1 °С). Соединение 5 в низко-микромольном диапазоне индуцирует активность фермента гемоксигеназы-1 HO-1 в 3,5 раза в течение первых 4–6 ч инкубации в клетках PC12 [27]. Вряд ли это настоящий нековалентный агент замещения – он слишком мощный по сравнению с другими, явно электрофильный и недостаточно подтвержденный. Соединение 6 оказалось удачным – оно оказалось среди 400 хитов, выявленных при первичном HTS методом FP, а затем и среди 80 хитов, подтвержденных

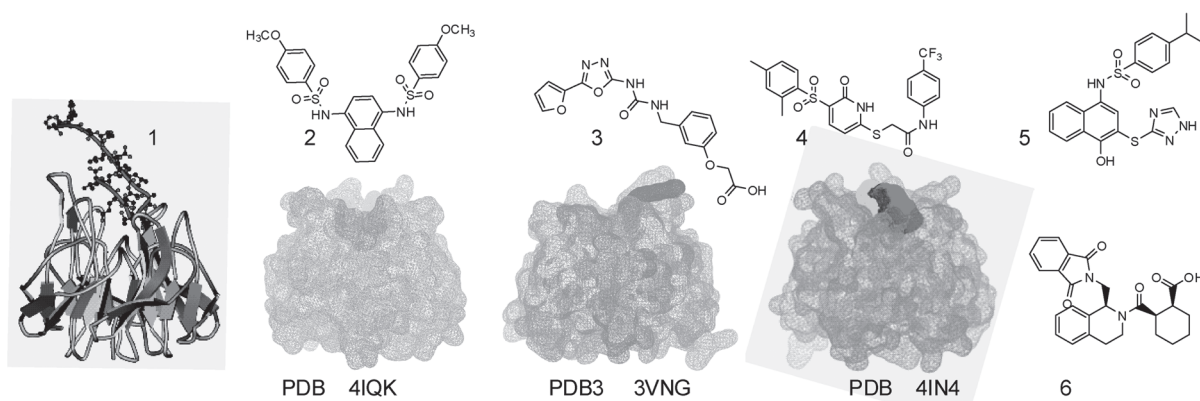


Рис. 4. Малые молекулы, идентифицированные с помощью поляризации флуоресценции (FP) на основе вытеснения меченого Nrf2-пептида из рекомбинантного Kelch-домена Keap1 (1 – кристаллическая структура пептида в Kelch-доме; 2, 3, 4 – полученные кристаллические структуры; биологическая активность соединения 3 не подтверждена; 5 – полученное виртуальным скринингом соединение подтверждено анализом термического сдвига; 6 – молекула, открытая группой Лонквина Ху [28])

при вторичном скрининге. После дополнительной проверки число хитов сократилось вдвое, при этом Соединение 6 было единственным настоящим активатором вытеснения (см. зарегистрированные хиты http://swami.wustl.edu/flow/projects/P504523/project_summary.html). Соединение 6 было повторно синтезировано, четыре энантиомера отделили друг от друга (соединение 6 имеет 3 хиральных центра), и только один показал активность в использованных анализах: константа связывания 1 мкМ с рекомбинантным Keap1 и EC_{50} 18 мкМ в ARE-luc-анализе [28]. Несмотря на то, что анализ FP должен идентифицировать молекулы, которые действуют посредством вытеснения, на самом деле большинство выявленных хитов имеют другие механизмы действия. В настоящее время подтверждено, что только соединения 2 и 6 являются нековалентными активаторами Nrf2. Соединение 2 использовалось в качестве отправной точки для структурной оптимизации. Всесторонний обзор активаторов вытеснения Nrf2 и применения дизайна лекарств на основе фрагментов доступен в [29]. Идентифицированные к настоящему времени молекулы имеют сложные структуры, содержащие множественные циклы и отрицательно заряженные группы, и предсказуемо легко подвергаются окислительному разложению в печени.

3. Животные модели: преимущества и проблемы

Существует множество обзоров по перспективе использования для целей HTS конкретных моделей мелких животных, например *C. elegans*

[30], *D. melanogaster* [31] и рыбок *Danio* [32], а также обширное и детальное сравнение всех трех моделей мелких животных с моделями мышей в целях разработки новых лекарств [33]. Даже краткое сравнение (табл. 2) показывает, что мелкие животные не могут заменить традиционные HTS, а также мышинные, крысиные или другие модели высших млекопитающих из-за низкой гомологии с человеком. Тем не менее, существуют устоявшиеся модели заболеваний на мелких животных, таких как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, мышечная дистрофия Дюшенна, спинальная мышечная атрофия и другие мышечные расстройства, рак, жировой обмен и инфекционные заболевания (подобные туберкулезу), которые демонстрируют измеримые эффекты, поддающиеся анализу с помощью HTS. Эти модели на мелких животных, подходящие для HTS, становятся ценным инструментом для выявления новых мишеней и прогнозирования осложнений ADMET.

3.1. *C. elegans* и HTS активаторов Nrf2

C. elegans был введен в качестве модельного организма для изучения развития нервной системы животных в 1960-е годы. С тех пор все 302 нейрона и их соединения точно картированы и хорошо изучены, а прозрачность на протяжении всего жизненного цикла позволяет использовать фьюжн белки с GFP для визуализации конкретных клеток, нейронов и синаптических связей у живого животного. *C. elegans* полезен для разработки лекарств от болезней, для которых существуют четкие ортологи, однако у червя отсутствуют многие ключевые

Сравнение ключевых характеристик животных моделей

Животная модель	<i>D. melanogaster</i> (дрозофила)	<i>C. elegans</i> (нематоды)	<i>D. rerio</i> (рыбки)	<i>M. musculus</i> (домовая мышь)
Мишень известна	да/нет	да/нет	да/нет	да/нет
Высокопроизводительный скрининг лекарств	да	да	да	нет
Высокопроизводительный скрининг РНК-интерференции	да	да	да	нет
Сходство с человеком: число генов гомология, %	низкое 13 000 >60	низкое 19 000 >50	среднее 25 000 >70	высокое 25 000 >90
Проникновение в клетки	да	да	да	да
Проникновение через ГЭБ	да/нет	нет/да	да	да
Токсичность	да/нет	да/нет	да	да
Конкуренция со стороны внутриклеточных компонентов	да	да	да	да

органы и другие физиологически значимые системы, такие как иммунная система, сердце или мозг. Еще одним аспектом, который можно рассматривать как преимущество или недостаток, в зависимости от контекста исследования, является отсутствие мужской/женской половой системы. *C. elegans* не рассматривался как инструмент для HTS из-за условий культивирования, не удовлетворяющих протоколам HTS. Только в 2006 г. [34] был разработан полностью жидкостный процесс для облегчения проведения HTS в формате 96 лунок. Флуоресцентный скрининг на *C. elegans* в настоящее время позволяет использовать форматы с 386 и 1536 лунками. О первом автоматизированном HTS, объединяющем автоматическую передачу червей, получение изображений и анализ данных, сообщалось в 2010 г. [35].

HTS для ингибиторов Nrf2 проводили на *C. elegans* в 1536-луночных микропланшетах [36]: SKN-1 представляет собой фактор транскрипции, который управляет стрессовой реакцией на окислители и электрофильные ксенобиотики, а также отвечает за лекарственную устойчивость паразитических нематод. SKN-1 является ортологом Nrf2, и для скрининга использовали трансгенные *C. elegans* с репортерной конструкцией, экспрессирующей GFP под контролем

промотора гена глутатион S-трансферазы (*gst* является одной из основных мишеней Nrf2). Всего было проверено 364 000 соединений на ингибирование активации репортера, индуцированной юглоном. При инкубации в течение ночи, выявлено 125 хитов. Однако измерения флуоресценции по-прежнему проводили в 384-луночных планшетах. Ту же самую систему использовали в качестве дополнительного анализа активаторов Nrf2 [37]. Первичный скрининг проводили с помощью клеточного анализа ARE-люциферазы с последующим анализом *gst*-GFP на *C. elegans*. Как можно судить по графикам, представленным в работе [37] (см. рис. 1, С, Е в [37]), анализ *C. elegans* менее чувствителен: репортер ARE-luc активируется 10 мкМ AI-3, идентифицированным активатором Nrf2, в 50 раз по сравнению с фоном, тогда как *C. elegans in vivo* *gst*-GFP репортер дает 25-кратную активацию по сравнению с фоном только при 1 мМ AI-3. Это наблюдение указывает на значительные проблемы либо с форматом введения лекарственного средства (быстрое разложение в среде), либо с проницаемостью червей для выбранного лекарственного препарата-кандидата. К тому же идентифицированное соединение является алкилирующим агентом, нацеленным на актив-

ные цистеины в Keap1, сначала остаток Cys-151 (ответственный за отсоединение убиквитинлигазы Cul3), а затем остатки Cys-288 и Cys-196, ковалентные модификации которых изменяют конформацию димера Keap1 [37]. Несмотря на то, что репортерный анализ на *C. elegans*, очевидно, менее чувствителен, более дорог и трудоемок, чем скрининг на клеточных репортерах, он имеет определенные преимущества в качестве вторичного анализа, оценивающего токсичность перед тестированием на моделях мышей или крыс.

Следует отметить, что *C. elegans* является очень хорошим инструментом для скрининга на животных новых лекарств против устойчивых к антибиотикам микроорганизмов. С использованием *in vivo* анализа *C. elegans* недавно было показано [38], что экстракт брокколи (источник сульфорафана, прямого активатора Nrf2, а также ряда активных флавоноидов, таких как кверцетин и мирицетин, также известных как активаторы Nrf2), ингибирует экспрессию кворум-чувствительных генов, тем самым снижая свойства вирулентности у *E. coli* O157:H7.

3.2. *Drosophila melanogaster* u HTS

История использования плодовых мушек в современной биологии насчитывает более 100 лет, это был первый сложный организм, геном которого секвенирован. Несмотря на то, что гомология с человеком не так высока, как у мышей, 75% генов, связанных с заболеваниями у человека, имеют функциональные ортологи у мушек. Общая идентичность между гомологами на уровне отдельных белков составляет всего 40%, но для консервативных функциональных доменов она может составлять порядка 80–90%. Мушек можно рассматривать в виде несколько модельных организмов, определяемых стадиями развития, например: эмбрион, личинка, куколка и взрослая особь. Последний представляет собой очень сложный организм со 100 000 нейронов и имеет структуры, которые выполняют функции сердца, легких, почек, кишечника и репродуктивного тракта млекопитающих. Мозг взрослой мушки устроен весьма замечательно, и, следовательно, ее реакция на многие лекарства, действующие на ЦНС, аналогична эффектам лекарств, наблюдаемым в системах млекопитающих. При использовании мушек открыто много возможностей для разработки лекарств для ЦНС, особенно в обла-

сти нейродегенерации. Следует отметить, что кофе без кофеина и табак без никотина, как сообщается, обеспечивают нейропротекцию с помощью Nrf2-зависимого механизма [39] в модели болезни Паркинсона на дрозофиле. В недавнем скрининге соединений, вызывающих устойчивость к химическим стрессорам, в качестве вторичного скрининга использовали *C. elegans* и дрозофилу для идентификации двух активаторов Nrf2 [40].

Важным шагом в целях автоматизации с высокой пропускной способностью для манипуляции эмбрионами дрозофилы стало применение микрофлюидной системы [41], которая автоматически извлекает эмбрионы из внешнего резервуара. Эта технология может поддерживать автоматизированные скрининги на основе эмбрионов дрозофилы, а также создание трансгенных линий дрозофилы. Модели на основе дрозофилы оказывают огромную помощь во многих аспектах разработки лекарств, однако помимо обсуждавшихся выше анатомических различий между мушками и млекопитающими существуют различия в фармакокинетике и фармакодинамике, которые приводят к значительным расхождениям в уровнях лекарств и профилях их распределения в тканях. Эти различия независимо от высокого уровня автоматизации, который может быть достигнут в будущем, дрозофилу можно использовать только в качестве платформы скрининга в целях обнаружения мишеней, для первичного HTS и проверки после HTS.

3.3. Модели *Danio rerio* u HTS

В течение последних 30 лет *Danio rerio*, тропическую аквариумную рыбку, использовали для изучения развития органов. Интерес к исследованиям возрос 20 лет назад, когда было показано, что рыбка пригодна для генетического HTS. Поскольку рыбки являются позвоночными животными, функциональные домены ключевых белков у рыбок *D. rerio* могут быть почти на 100% идентичны человеческим гомологам. Рыбки *D. rerio* являются привлекательными кандидатами для фармакологических исследований из-за оптической прозрачности их эмбрионов и личинок, позволяющей наблюдать морфологические дефекты *in vivo*. К дополнительным преимуществам относятся полная иммунная система (врожденная и адаптивная), простота введения лекарств и более низкая стоимость инфраструктуры, чем у грызунов. Рыбки *D. rerio*

успешно использовали при разработке лекарств [42, 43]. Разработка различных инструментов скрининга и автоматизации для *D. rerio* продвигается очень быстро [44–46]. Простой метод HTS для всего организма в целях количественной оценки изменений интенсивности репортеров у отдельных рыбок был разработан для микропланшетного флуориметра со специфическими функциями детектирования, необходимыми для надежной количественной оценки репортерных сигналов *in vivo*. Этот подход является быстрым, обеспечивает исключительную эффективность HTS (т.е. >50,000 ед. в 1 день), воспроизводим с Z'-факторами $\geq 0,5$ и поддается практически любому репортерному анализу на эмбрионах, личинках или молодых рыбках [47]. Новые возможности, открывающиеся при использовании рыбок *D. rerio*, могут быть проиллюстрированы разработкой высокопроизводительной системы флуоресцентного анализа для скрининга как генов, так и лекарств, регулирующих аппетит. Метод основан на простом и быстром измерении объема кормления с помощью 96-луночного микропланшетного детектора при использовании флуоресцентно меченых жизнеспособных парамеций [48]. В недавнем исследовании было проверено 10 фитохимических веществ для защиты личинок рыбок от окислительного стресса, вызванного перекисью водорода. Чтобы доказать Nrf2-зависимость, была использована мутантная рыбка (*nfe121a^{fh318}*) [49]. Однако рыбка *D. rerio* не является дешевым инструментом при поиске лекарств методом HTS и на данный момент используется в основном для вторичного или подтверждающего скрининга, например в сочетании с виртуальным HTS [50]. Использование *D. rerio* не даст никакой информации о диапазоне доз, которые будут тестироваться на млекопитающих, поэтому подтверждение на млекопитающих будет по-прежнему необходимо для ответа на вопросы о токсичности и фармакологии препарата.

3.4. Мышей-репортеров для целей имиджинга *in vivo* можно многократно использовать

Одним из современных направлений является создание репортерных трансгенных грызунов для имиджинга *in vivo* в целях визуализации действия лекарств и получения полуколичественных данных о проницаемости и метаболической стабильности лекарств в качестве отправной точки для исследований фармакокинетики. Например,

разработаны мыши линии Nrf2-luc (OKD48) для визуализации *in vivo* [51], что значительно упрощает оптимизацию дозировки и пути введения, а также сроков последующих стандартных фармакокинетических исследований. Мыши экспрессируют конструкцию, которая имеет в последовательности тройной повтор элемента антиоксидантного ответа – 3xARE, за которыми следуют домены Neh2-Neh4-Neh5 Nrf2 (1–433 аминокислотных остатка), слитые с люциферазой светлячка. Эта конструкция обеспечивает двухуровневый контроль экспрессии слитого белка: 1) последовательность ARE взаимодействует с эндогенным Nrf2, запуская экспрессию, 2) продукт экспрессии распознается Keap1 и механизмом убиквитинирования и подвергается протеолитической деградации до тех пор, пока распознавание Neh2-домена не нарушается под действием активаторов Nrf2. Благодаря этому двухуровневому контролю репортер демонстрирует очень низкий фоновый шум по сравнению с обычным транскрипционным репортером, таким как ARE-Luc. Это позволяет отслеживать ФК активатора Nrf2 с гораздо более высоким разрешением. Мыши линии OKD48 также допускают многократное использование. Этим мышам использовали для демонстрации преимуществ активатора Nrf2 в условиях ишемии-реперфузии в модели МСАО [52]. Использование трансгенных мышей линии OKD48 существенно помогает минимизировать число животных для исследований ФК в дополнение ко всем преимуществам прямой визуализации *in vivo*.

4. Заключение

Технология HTS быстро развивается, появляются новые стратегические подходы, в частности проточная HTS-цитометрия [53], HTS на 3D-культурах [54], «консенсусный докинг» в виртуальных HTS [55], ИИ-подход для анализа первичных данных HTS [56]. Все разрабатываемые в настоящее время модели на мелких животных, пригодные для HTS, не могут заменить тестирование на млекопитающих, но имеют большое значение для стратегии разработки лекарств. Важнейшая роль этих животных заключается в моделировании заболеваний и состояний, мишень которых неизвестна. Их можно использовать для скрининга, направленного на идентификацию мишени. Как только мишень будет определена, их использование

в первичном HTS, вероятно, будет ограничено стоимостью по сравнению с гомогенными или клеточными анализами *in vitro*. Тем не менее, все три рассмотренных модели мелких животных идеально подходят для вторичной проверки. Вопросы ФК необходимо изучать на млекопитающих. Тестирование соединений-лидеров в системе «печень-на-чипе» перед их оптимизацией и исследованиями на животных для отбора нетоксичных соединений из первичных скринингов должно быть неукоснительным [57]. По нашему мнению, разработка мышинных моделей для визуализации *in vivo* определенного сигнального пути, на который влияет разрабатываемый препарат, поможет понять ограничения кандидатов на лекарственные средства, прежде чем приступить к полномасштабным фармакокинетическим исследованиям. Что касается растущего числа неудач с потенциальными лекарствами, решением могут стать новые стратегические подходы к оценке токсичности с использованием технологии «человек-на-чипе». Однако, по нашему мнению, проблема отзыва лекарств с рынка заключается не

в качестве научных исследований, лежащих в основе открытия новых лекарств (например, используемых моделей и скринингов), а в сфере управления правами интеллектуальной собственности и процессом открытия новых лекарств в коммерческих организациях. Гораздо легче интеллектуально защитить совершенно новый каркас веществ-гомологов для новых лекарств, чем создавать новые лекарства на существующих хорошо изученных каркасах. Похоже, что все доброкачественные каркасы уже задействованы, а недавно разработанные являются более сложными, что приводит к более высокому уровню нежелательной химии в организме. Управленческие проблемы также крайне важны, поскольку в процесс разработки лекарств вовлечено множество групп со слишком узкой специализацией. В частности, первичный этап разработки проводят медицинские химики, не имеющие достаточного образования в области биохимии и энзимологии, им трудно в самом начале процесса распознать среди выявленных хитов действительно многообещающее и нетоксичное лидирующее соединение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jones M., Goodyear R.L. // ACS Med. Chem. Lett. 14, 2023, p. 916. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.3c00073>.
2. Bon M., Bilsland A., Bower J., McAulay K. // Mol. Oncol. 16, 2022, p. 3761. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13277>.
3. Blay V., Tolani B., Ho S.P., Arkin M.R. // Drug Discov. Today. 25, 2020, p. 1807. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.07.024>.
4. Thirstrup K., Christensen S., Møller H.A., Ritzén A., Bergström A.L., Sager T.N., Jensen H.S. // Pharmacol. Res. 64, 2011, p. 268 <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2011.03.017>.
5. Moi P., Chan K., Asunis I., Cao A., Kan Y.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 1994, p. 9926. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.21.9926>.
6. Crunkhorn S. // Nat. Rev. Drug Discov. 11, 2012, p. 96. <https://doi.org/10.1038/nrd3655>.
7. L. Gan, J.A. Johnson, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1842, 2014, p. 1208–1218. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.12.011>.
8. Joshi G., Johnson J.A. // Recent Pat. CNS Drug Discov. 7, 2012, p. 218–229. <https://doi.org/10.2174/157488912803252023>.
9. Ramsey C.P., Glass C.A., Montgomery M.B., Lindl K.A., Ritson G.P., Chia L.A., Hamilton R.L., Chu C.T., Jordan-Sciutto K.L. // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 66, 2007, p. 75–85. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e31802d6da9>.
10. Tapias V., Jainuddin S., Ahuja M., Stack C., Elipenahli C., Vignisse J., Gerges M., Starkova N., Xu H., Starkov A.A., Bettendorff L., Hushpulian D.M., Smirnova N.A., Gazaryan I.G., Kaidery N.A., Wakade S., Calingasan N.Y., Thomas B., Gibson G.E., Dumont M., Beal M.F. // Hum. Mol. Genet. 27, 2018, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy201>.
11. Smirnova N.A., Kaidery N.A., Hushpulian D.M., Rakhman I.I., Poloznikov A.A., Tishkov V.I., Karuppagounder S.S., Gaisina I.N., Pekcec A., Van Leyen K., Kazakov S.V., Yang L., Thomas B., Ratan R.R., Gazaryan I.G. // Aging Dis. 7, 2016, p. 745. <https://doi.org/10.14336/AD.2016.0505>.
12. Ahuja M., Kaidery N.A., Yang L., Calingasan N., Smirnova N., Gaisin A., Gaisina I.N., Gazaryan I., Hushpulian D.M., Kaddour-Djebbar I., Bollag W.B., Morgan J.C., Ratan R.R., Starkov A.A., Beal M., Thomas B. // J. Neurosci. 36. 2016. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0426-16.2016>.
13. Kaidery N.A., Banerjee R., Yang L., Smirnova N.A., Hushpulian D.M., Liby K.T., Williams C.R., Yamamoto M., Kensler T.W., Ratan R.R., Sporn M.B., Beal M.F., Gazaryan I.G., Thomas B. // Antioxid. Redox Signal. 18, 2013, p. 139. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4491>.
14. Wu K.C., McDonald P.R., Liu J.J., Chaguturu R., Klaassen C.D. // PLoS One. 7, 2012, p. e44686. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044686>.
15. Smirnova N.A., Rakhman I., Moroz N., Basso M.,

- Payappilly J., Kazakov S., Hernandez-Guzman F., Gaisina I.N., Kozikowski A.P., Ratan R.R., Gazaryan I.G. // *Chem. Biol.* 17, 2010, p. 380. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.03.008>.
16. Smirnova N.A., Haskew-Layton R.E., Basso M., Hushpalian D.M., Payappilly J.B., Speer R.E., Ahn Y.H., Rakhman I., Cole P.A., Pinto J.T., Ratan R.R., Gazaryan I.G. // *Chem. Biol.* 18, 2011, p. 752. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.03.013>.
17. Khristichenko Y., Hushpalian D.M., Smirnova N.A., Zakhariants A.A., Chubar T.A., Tishkov V.I., Gazaryan I.G., Poloznikov A.A. // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 75, 2020, p. 172. <https://doi.org/10.3103/S0027131420030062>.
18. Baell J.B., Holloway G.A. // *J. Med. Chem.* 53, 2010, p. 2719. <https://doi.org/10.1021/jm901137j>.
19. Fox R.J., Miller D.H., Phillips J.T., Hutchinson M., Havrdova E., Kita M., Yang M., Raghupathi K., Novas M., Sweetser M.T., Viglietta V., Dawson K.T. // CONFIRM Study Investigators, *N. Engl. J. Med.* 367, 2012, p. 1087–97. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1206328>.
20. Sweetser M.T., Dawson K.T., Bozic C. // *N. Engl. J. Med.* 368, 2013, p. 1659–61. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1300283>.
21. de Zeeuw D., Akizawa T., Agarwal R., Audhya P., Bakris G.L., Chin M., Krauth M., Lambers Heerspink H.J., Meyer C.J., McMurray J.J., Parving H.-H., Pergola P.E., Remuzzi G., Toto R.D., Vaziri N.D., Wanner C., Warnock D.G., Wittes J., Chertow G.M. // *Am. J. Nephrol.* 37, 2013, p. 212. <https://doi.org/10.1159/000346948>.
22. Lee A. // *Drugs.* 83, 2023, p. 725. <https://doi.org/10.1007/s40265-023-01874-9.23>.
23. Rowlands H., Tschapalda K., Blackett C., Ivanov D., Plant D., Shaw J., Thomas A., Packer M., Arnold L., Holdgate G.A. // *SLAS Discov. Adv. Life Sci. R D.* 28, 2023, p. 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.slasd.2023.01.006>.
24. Vachal P., Miao S., Pierce J.M., Guiadeen D., Colandrea V.J., Wyvratt M.J., Salowe S.P., Sonatore L.M., Milligan J.A., Hajdu R., Gollapudi A., Keohane C.A., Lingham R.B., Mandala S.M., DeMartino J.A., Tong X., Wolff M., Steinhuebel D., Kieczkowski G.R., Fleitz F.J., Chapman K., Athanasopoulos J., Adam G., Akyuz C.D., Jena D.K., Lusen J.W., Meng J., Stein B.D., Xia L., Sherer E.C., Hale J.J. // *J. Med. Chem.* 55, 2012, p. 2945. <https://doi.org/10.1021/jm201542d>.
25. Lipinski C.A. // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 44, 2000, p. 235. [https://doi.org/10.1016/s1056-8719\(00\)00107-6](https://doi.org/10.1016/s1056-8719(00)00107-6).
26. Marcotte D., Zeng W., Hus J.-C., McKenzie A., Hession C., Jin P., Bergeron C., Lugovskoy A., Enyedy I., Cuervo H., Wang D., Atmanene C., Roecklin D., Vecchi M., Vivat V., Kraemer J., Winkler D., Hong V., Chao J., Lukashev M., Silvian L. // *Bioorg. Med. Chem.* 21, 2013, p. 4011. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.04.019>.
27. Zhuang C., Narayanapillai S., Zhang W., Sham Y.Y., Xing C. // *J. Med. Chem.* 57, 2014, p. 1121. <https://doi.org/10.1021/jm4017174>.
28. Hu L., Magesh S., Chen L., Wang L., Lewis T.A., Chen Y., Khodier C., Inoyama D., Beamer L.J., Emge T.J., Shen J., Kerrigan J.E., Kong A.-N.T., Dandapani S., Palmer M., Schreiber S.L., Munoz B. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 2013, p. 3039. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.03.013>.
29. Zhuang C., Wu Z., Xing C., Miao Z. // *Medchemcomm.* 8, 2017, p. 286. <https://doi.org/10.1039/c6md00500d>.
30. O'Reilly L.P., Luke C.J., Perlmutter D.H., Silverman G.A., Pak S.C. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 69, 2014, p. 247. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.001>.
31. Pandey U.B., Nichols C.D. // *Pharmacol. Rev.* 63, 2011, p. 411. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003293>.
32. Delvecchio C., Tiefenbach J., Krause H.M. // *Assay Drug Dev. Technol.* 9, 2011, p. 354. <https://doi.org/10.1089/adt.2010.0346>.
33. Giacomotto J., Ségalat L. // *Br. J. Pharmacol.* 160, 2010, p. 204. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00725.x>.
34. Lehner B., Tischler J., Fraser A.G. // *Nat. Protoc.* 1, 2006, p. 1617. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.245>.
35. Gosai S.J., Kwak J.H., Luke C.J., Long O.S., King D.E., Kovatch K.J., Johnston P.A., Shun T.Y., Lazo J.S., Perlmutter D.H., Silverman G.A., Pak S.C. // *PLoS One.* 5, 2010, p. e15460. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015460>.
36. Leung C.K., Wang Y., Malany S., Deonaraine A., Nguyen K., Vasile S., Choe K.P. // *PLoS One.* 8, 2013, p. e62166. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062166>.
37. Wang R., Mason D.E., Choe K.P., Lewin A.S., Peters E.C., Luesch H. // *ACS Chem. Biol.* 8, 2013, p. 1764. <https://doi.org/10.1021/cb4000103>.
38. Lee K.-M., Lim J., Nam S., Yoon M.Y., Kwon Y.-K., Jung B.Y., Park Y., Park S., Yoon S.S. // *FEMS Microbiol. Lett.* 321, 2011, p. 67. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02311.x>.
39. Trinh K., Andrews L., Krause J., Hanak T., Lee D., Gelb M., Pallanck L. // *J. Neurosci.* 30, 2010, p. 5525. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4777-09.2010>.
40. Lombard D.B., Kohler W.J., Guo A.H., Gendron C., Han M., Ding W., Lyu Y., Ching T.-T., Wang F.-Y., Chakraborty T.S., Nikolovska-Coleska Z., Duan Y., Girke T., Hsu A.-L., Pletcher S.D., Miller R.A. // *Sci. Adv.* 6, 2020. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz7628>.
41. Delubac D., Highley C.B., Witzberger-Krajcovic M., Ayoob J.C., Furbee E.C., Minden J.S., Zappe S. // *Lab Chip.* 12, 2012, p. 4911. <https://doi.org/10.1039/c2lc40104e>.
42. Tsang M. // *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 90, 2010, p. 185. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20183>.
43. Evensen L., Link W., Lorens J.B. // *Curr. Pharm.*

- Des. 16, 2010, p. 3958. <https://doi.org/10.2174/138161210794455030>.
44. Wittmann C., Reischl M., Shah A.H., Mikut R., Liebel U., Grabher C. // *J. Vis. Exp.* 2012, p. 4203. <https://doi.org/10.3791/4203>.
45. Spomer W., Pfriem A., Alshut R., Just S., Pylatiuk C. // *J. Lab. Autom.* 17, 2012, p. 435. <https://doi.org/10.1177/2211068212464223>.
46. Takaki K., Cosma C.L., Troll M.A., Ramakrishnan L. // *Cell Rep.* 2, 2012, p. 175 <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.06.008>.
47. Walker S.L., Ariga J., Mathias J.R., Coothankandaswamy V., Xie X., Distel M., Köster R.W., Parsons M.J., Bhalla K.N., Saxena M.T., Mumm J.S. // *PLoS One.* 7, 2012, p. e29916. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029916>.
48. Shimada Y., Hirano M., Nishimura Y., Tanaka T. // *PLoS One.* 7, 2012, p. e52549. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052549>.
49. Endo Y., Muraki K., Fuse Y., Kobayashi M. // *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21031109>.
50. Hernández-Silva D., Alcaraz-Pérez F., Pérez-Sánchez H., Cayuela M.L. // *Expert Opin. Drug Discov.* 18, 2023, p. 903. <https://doi.org/10.1080/17460441.2022.2147503>.
51. Oikawa D., Akai R., Tokuda M., Iwawaki T. // *Sci. Rep.* 2, 2012, p. 229. <https://doi.org/10.1038/srep00229>.
52. Takagi T., Kitashoji A., Iwawaki T., Tsuruma K., Shimazawa M., Yoshimura S., Iwama T., Hara H. // *Free Radic. Biol. Med.* 72, 2014, p. 124–33. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.009>.
53. Ding M., Baker D. // *Expert Opin. Drug Discov.* 16, 2021, p. 303. <https://doi.org/10.1080/17460441.2021.1826433>.
54. Wang Y., Jeon H. // *Trends Pharmacol. Sci.* 43, 2022, p. 569. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2022.03.014>.
55. Blanes-Mira C., Fernández-Aguado P., de Andrés-López J., Fernández-Carvajal A., Ferrer-Montiel A., Fernández-Ballester G., *Molecules.* 28, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules28010175>.
56. Dreiman G.H.S., Bictash M., Fish P. V., Griffin L., Svensson F. // *SLAS Discov.* 26, 2021, p. 257 <https://doi.org/10.1177/2472555220949495>.
57. Poloznikov A. // *ALTEX.* 2018, p. 397. <https://doi.org/10.14573/altex.1803221>.

Информация об авторах

Дмитрий Михайлович Хушпулян – науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», науч. сотр. факультета биологии и биотехнологии Национального исследовательского университета «Высшая школа экономики», канд. хим. наук (hushpulian@gmail.com);

Ирина Николаевна Гайсина – науч. сотр. кафедры медицинской химии и фармакогнозии Университета Иллинойса в Чикаго, США, канд. биол. наук (igaysina@uic.edu);

Сергей Вячеславович Никулин – ст. науч. сотр. факультета биологии и биотехнологии Национального исследовательского университета «Высшая школа экономики», канд. биол. наук (snikulin@hse.ru);

Татьяна Анатольевна Чубарь – ассистент кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (tchubar@gmail.com);

Святослав Сергеевич Савин – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. биол. наук (savinslava@gmail.com);

Ирина Георгиевна Газарян – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; вед. науч. сотр. факультета биологии и биотехнологии Национального исследовательского университета «Высшая школа экономики», докт. хим. наук (igazaryan@gmail.com);

Владимир Иванович Тишков – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; гл. науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук; докт. хим. наук, профессор (tishkovvi@my.msu.ru).

Соблюдение этических стандартов

В данной работе отсутствуют исследования человека и животных.

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 30.10.2023;
одобрена после рецензирования 12.11.2023;
принята к публикации 14.11.2023.