

На правах рукописи



ЗАХАРЯНЦ

Арпеник Акоповна

**ДОКЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА БИОТРАНСФОРМАЦИИ
НОВЫХ АНТИГИПОКСИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ
В СИСТЕМЕ *IN VITRO* С ИМИТАЦИЕЙ
МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ**

**03.01.06 – биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)**

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2016

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор
Тишков Владимир Иванович

Официальные оппоненты:

Тевяшова Анна Николаевна

доктор химических наук
Федеральное государственное учреждение науки "Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе", лаборатория химической трансформации антибиотиков
ведущий научный сотрудник

Яненко Александр Степанович

доктор биологических наук, профессор
Федеральное государственное унитарное предприятие "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов"
заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Защита диссертации состоится 20 декабря 2016 года в 15 часов на заседании Совета Д 501.001.59 по защите докторских и кандидатских диссертаций по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.11, МГУ, Химический факультет, кафедра химической энзимологии, аудитория 202.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и на сайте Химического факультета МГУ (www.chem.msu.ru).

Автореферат разослан 19 октября 2016 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 501.001.59,
кандидат химических наук



Сакодынская И.К.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Разработка лекарственных препаратов (ЛП) представляет собой многостадийный процесс, в котором можно выделить четыре этапа: открытие нового соединения и изучение его фармацевтических свойств, проведение доклинических исследований на животных, выбор и разработка лекарственной формы и, наконец, клинические испытания ЛП на людях. С каждым годом разработка и выведение на рынок новых ЛП становится все дороже и дороже – в настоящее время для одного нового ЛП уже требуется 10 лет исследований и сотни миллионов долларов США. За последние 20 лет, почти 90% ЛП не прошли регистрацию либо были отозваны с рынка по причине токсичности. Ксенобиотики претерпевают три стадии метаболических превращений в гепатоцитах: 1) липофильные соединения превращаются в водорастворимые по реакциям, катализируемым ферментами группы цитохромов P450 (CYP450); 2) на второй стадии происходит ферментативная конъюгация ксенобиотиков и/или их метаболитов с полярными молекулами такими, как глюкоза, глюкуроновая кислота, сульфат-ион или глутатион, и 3) уже полярные производные выводятся транспортерами из гепатоцитов в желчь или попадают опять в кровоток, а с кровотоком - в почки и выводятся из организма. Несмотря на то, что стадии I и II принято считать «стадиями детоксикации», множество ксенобиотиков при этом метаболизируются в фармакологически активные формы, а нередко и в гораздо более токсичные соединения, чем исходные препараты. Проведение доклинических исследований лекарственных средств на животных, к сожалению, не гарантирует отсутствия токсичности для человека в связи с наличием серьезных видоспецифических различий, главным из которых является изоферментный профиль и активность изоферментов цитохрома P450 печени. Сравнение девяти ферментов из группы CYP450, полученных из печени мышей, крыс, кроликов, собак, свиней и обезьян, с таковыми из печени человека показало, что профиль активности/экспрессия и абсолютная активность изоформ у животных не похожи на данные параметры ферментов CYP450 печени человека. Именно поэтому, химическая природа и профиль продуктов окисления ксенобиотиков у человека отличается от таковых у животных. Половина ЛП, отозванных в связи с гепатотоксичностью, не показывала токсичности в доклинических испытаниях на животных. Одна из основных целей исследователей во всем мире заключается в том, чтобы создать *in vitro* платформу для поиска и (или) тестирования потенциальных лекарств, которая была бы недорогой, эффективной по времени и предсказуемой в смысле токсичности для человека, и гепатотоксичности в частности. Для успешного предсказания гепатотоксичности используемых или разрабатываемых ЛП наиболее перспективными считаются альтернативные *in vitro* тесты с использованием максимально адекватных клеточных моделей печени человека (КМПЧ), культивируемых в условиях микроциркуляции питательной среды – печень «на чипе».

Современный подход к лечению состоит в отказе от представления «одна болезнь – одна мишень»: в настоящее время болезнь рассматривается как нарушение

гомеостатического равновесия, со сдвигом профиля экспрессии и активности множества взаимодействующих белков, контролирующих определенные сигнальные пути, по отношению к норме. При такой точке зрения на болезнь следует вывод о необходимости разработки модуляторов разнообразных транскрипционных факторов или ферментов, контролирующими эпигенетические изменения. Наибольший интерес сейчас вызывают антигипоксанты – активаторы фактора, индуцируемого гипоксией (HIF – hypoxia inducible factor). Стабилизация этого транскрипционного фактора происходит при ингибировании фермента HIF пролилгидроксилазы (PHD, железо- и α КГ-зависимая диоксигеназа, существует в виде трех изоформ). Поскольку успешный пан-ингибитор (ингибитор всех трех изоформ) PHD может вытеснить рекомбинантный эритропоэтин с рынка, в последнее десятилетие поиском пан-ингибиторов данного фермента занимаются все ведущие мировые фармацевтические компании, такие как Amgen, Merck, Johnson&Johnson, Procter&Gamble, GlaxoSmithKline, Fibrogen, Bayer (США) и др.

Ранее коллективом под руководством И.Г. Газарян (Smirnova *et al*, Chem&Biol, 2010) были найдены два эффективных активатора HIF, которые были обозначены как Соединение 7 и Соединение 8. Эти соединения обеспечивали стабилизацию HIF в суб-микромольных концентрациях, однако работа была выполнена на целых клетках. На чистых препаратах PHD ингибирующее действие вышеуказанных соединений проверено не было.

Цели и задачи исследования. В диссертационной работе были поставлены следующие задачи:

- 1) Клонирование каталитического домена пролилгидроксилазы человека в клетках *E.coli* и разработка метода получения рекомбинантного фермента. Сравнение свойств растворимого фермента и препарата, полученного реактивацией из телец включения.
- 2) Подтверждение специфического ингибирования фермента молекулами-кандидатами, идентифицированными ранее как активаторы HIF с помощью метода высокопроизводительного скрининга на клеточных линиях.
- 3) Апробация соединений 7 и 8 в микробиореакторе (МБР) «Гомункулус» на основе сфероидов дифференцированных клеток линии *HepaRG* для предсказания их гепатотоксичности.
- 4) Разработка и валидация панели специфических субстратов и ингибиторов четырех изоферментов P450, наиболее вовлеченных в трансформацию ксенобиотиков у человека, для использования в МБР «Гомункулус».

Научная новизна работы. Впервые методом рефолдинга из телец включения получена рекомбинантная HIF пролилгидроксилаза человека. Для оптимизации реактивации была разработана непрерывная методика регистрации активности фермента по окислению ферроцианида в присутствии белка HIF или его короткого пептида. Было показано, что фермент, полученный методом рефолдинга, отличается более высокой каталитической активностью, чем фермент из растворимой фракции. Показано, что молекулы-кандидаты в антигипоксанты являются истинными ингибиторами очищенного фермента. Проведена

апробация и валидация панели субстрат-ингибитор в МБР на клеточной линии *HeraRG* для изучения метаболизма соединений 7 и 8.

Практическая значимость работы. Оптимизирована панель субстрат-ингибитор серии цитохромов P450 из печени человека и проведена ее валидация с использованием двух известных лекарственных препаратов – варфарина и дазатиниба - в микробиореакторе (МБР) «Гомункулус» на основе сфероидов дифференцированных клеток линии *HeraRG*. Далее панель субстрат-ингибитор была использована для доклинической оценки токсичности и путей биотрансформации молекул-кандидатов в антигипоксанты. Показано, что молекулы-кандидаты претерпевают гидроксилирование под действием цитохромов *HeraRG* и не являются гепатотоксичными в широком диапазоне концентраций.

Апробация работы. Основные результаты исследования были представлены на XXI International Conference INPEC-2014 (International Network of Protein Engineering Centers) (Санкт-Петербург, Россия, 2014), International Conference "Biocatalysis 2015: Fundamentals and Applications" (Московская область, Россия, 2015) и European Congresses on Alternatives to Animal Testing (Linz, Austria, 24.08-27.08.2016).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 7 печатных работ: 3 статьи (все журналы входят в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ) и 4 тезисов докладов конференций.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения; обзора литературы; описания материалов и методов; результатов и их обсуждения; выводов и списка цитируемой литературы, включающего 137 ссылок. Работа изложена на 131 странице и включает в себя 48 рисунков, 11 схем уравнений реакций и 14 таблиц.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

1. Клонирование и экспрессия каталитических доменов трех изоформ NIF пролилгидроксилазы человека в *E.coli*.

Ранее было показано, что кинетические свойства форм 1 и 2 полноразмерных PHD и их клонированных каталитических доменов не отличаются. В случае PHD3 фермент содержит только каталитический домен. Поэтому нами было решено клонировать только каталитические домены. Клонирование проводили из библиотеки кДНК в плазмиду pET47b (Novagen, США). Все три изоформы фермента были клонированы в двух вариантах - без гистидинового тага и с ним. Всего было получено шесть различных конструкций для экспрессии каталитических доменов всех трех изоформ фермента. Сайты клонирования для каждой из изоформ фермента, нумерация аминокислотных остатков клонированных доменов, и последовательность праймеров, использованных для клонирования, показаны в Таблице 1. Поскольку ген PHD2 содержит внутри сайт рестрикции NdeI, клонирование проводили по введенному сайту AseI. Секвенирование показало отсутствие в клонированных генах посторонних мутаций.

Таблица 1. Условия клонирования каталитических доменов трех форм PHD.

Описание вставки	Последовательность праймеров для клонирования	Сайты рЕТ47b
PHD1 (ак 175-407)	5'-ATTAАСТСТGCGCATATGCGCCTGGCCCTG-3' 5'-GCCCGCTAGTTAATTAAGTGGGCGTAGGC-3'	Nde1 Pac1
His-tag PHD1 (ак 175-407)	5'-ATATACTCTGCGCGGTACCGCCTGGCCCTG-3' 5'-GCCCGCTAGTTAATTAAGTGGGCGTAGGC-3'	Kpn1 Pac1
PHD2 (ак 184-426)	5'-ACCTGCGGCCATTAATGCAGACGAAG-3' 5'-CGCGCGCCGATTAATTAAGAAGGTTTATTGAGT-3'	Nde1/Ase1 Pac1
His-tag PHD2 (ак 184-426)	5'-CTACAGCCCAGGTACCAGACGAAGC-3' 5'-CGCGCGCCGATTAATTAAGAAGGTTTATTGAGT-3'	Kpn1 Pac1
PHD3	5'-TAAGCTTACCATGCATATGCCCCG-3' 5'-GCCCTCTAGTTAATTAATCTTCAGTGAGG-3'	Nde1 Pac1
His-tag PHD3	5'-GTTAAGCTTACCAGGTACCAGCCCCTGGGACAC-3' 5'-GCCCTCTAGTTAATTAATCTTCAGTGAGG-3'	Kpn1 Pac1

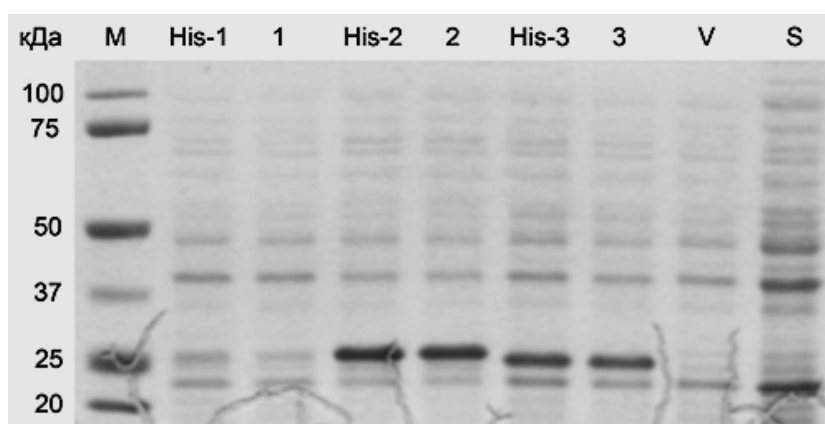


Рис. 1. Экспрессия каталитических доменов трех форм PHD в клетках *E.coli*. 1,2,3 – PHD1,2,3, и, соответственно, их формы с гистидиновым тагом (см. обозначения в Табл. 1). V – экспрессия вектора без вставки; S – нетрансформированные клетки *E.coli*.

Результаты экспрессии в клетках *E.coli* каталитических доменов PHD форм 1-3 в обоих вариантах (с His-tag и без него) представлены на рис. 1. Во всех случаях наблюдалась экспрессия, однако ее уровень зависел от конкретной конструкции, а именно: для PHD1 – при наличии His-tag уровень экспрессии был выше, чем

без такового, но в обоих случаях он был довольно низким. Для PHD2 принципиальной разницы в экспрессии при наличии и отсутствии His-tag в первичной структуре гена не наблюдалось; уровень экспрессии был наивысшим по сравнению с другими изоформами и составлял до 70% от общего белка. Уровень экспрессии полноразмерной формы PHD3 составлял около 50% от общего белка (рис. 1).

Результаты экспрессии согласуются с литературными данными и наглядно объясняют почему большинство лабораторий работают именно с формой PHD2 - она лучше всех экспрессируется в клетках *E.coli*. Поскольку одной из целей работы было сравнение растворимой формы фермента с препаратом, полученным рефолдингом из телец включения, было решено использовать конструкцию His-tag-PHD2, поскольку она позволяет выделить фермент из растворимой фракции после разрушения клеток в одну стадию. С учетом известной из литературы нестабильности ферментов этой группы, легкость и быстрота очистки являются существенными факторами при получении активного фермента.

2. Выделение растворимой формы PHD2 и метод непрерывной регистрации активности.

Предварительные исследования по продолжительности времени индукции 1 мМ IPTG, показали, что оптимальным для индукции является 2-2,5 часа. Для увеличения содержания растворимой фракции фермента PHD2 культивирование проводили при 30°C. Биомассу собирали центрифугированием, промывали буфером 50 мМ Трис-HCl, pH 7,0, содержащим 5 мМ DTT, и разрушали ультразвуком или на X-прессе. Все последующие стадии очистки проводили в буферных растворах, содержащих 5 мМ DTT. Суспензию клеток после разрушения центрифугировали. Супернатант использовали для выделения растворимого фермента с помощью хроматографии на Ni²⁺-NTA колонке (Qiagen, Германия). Бесклеточный экстракт пропускали через колонку, промывали буфером для разрушения. Элюцию фермента с колонки проводили 0,2 М имидазолом с последующим обессоливанием в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,0, содержащем 0,3 М NaCl. Выход активного гомогенного фермента составлял от 0,05 до 0,25 мг с 1 л культуральной среды. Полученные препараты использовали для разработки метода непрерывной детекции ферментативной активности, который затем был использован при разработке и оптимизации процедуры рефолдинга. Простая непрерывная методика регистрации каталитической активности пролилгидроксилаз в периодической литературе отсутствовала, что сильно затрудняло разработку и оптимизацию методов выделения фермента. При изучении одного из патентов фирмы Fibrogen (WO2005118836 A2, публ. 15 дек 2005) мы обнаружили упоминание о ферроцианиде, как альтернативе аскорбату в качестве донора электронов для обеспечения кругооборота двухвалентного железа. Однако в последнее десятилетие было однозначно показано, что PHD для катализа реакции аскорбат не нужен. Что же касается ферроцианида, то он, как хорошо известно, может восстанавливать оксоферрил напрямую и является альтернативным субстратом монооксигеназ (как железо-, так и ФАД-зависимых). Мы использовали этот факт для разработки способа непрерывной регистрации каталитической активности фермента, и именно эта методика была использована для разработки и оптимизации получения активного фермента путем рефолдинга из телец включения.

В отсутствие восстановителей и в присутствии ферроцианида как альтернативного субстрата, фермент катализирует его окисление, используя HIF (или его пептид) как кофактор, чье связывание активирует кислород как показано на Рис. 2. Оксоферрил, образуемый при окислении αКГ, окисляет ферроцианид в феррицианид, и эта реакция представляет собой простейший способ непрерывной регистрации активности HIF пролилгидроксилазы. Как показано на Рис. 3 для рекомбинантной PHD2, полученной из растворимой фракции белков клеток *E.coli*, активность наблюдается только в присутствии HIF пептида или GST-HIF, причем эффективность активации в обоих случаях одинакова.

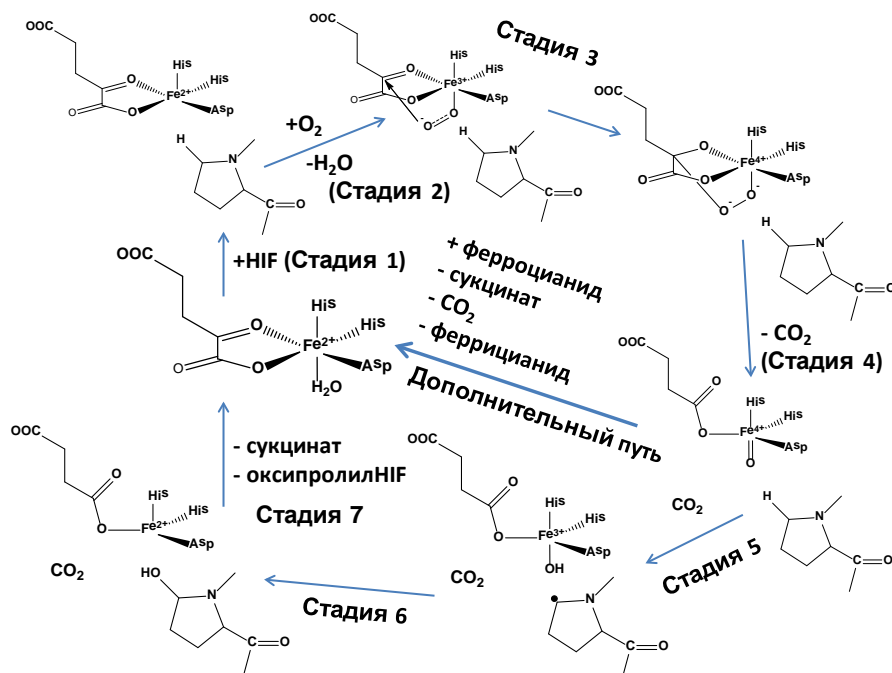


Рис. 2. Схема каталитического цикла HIF пролилгидроксилазы

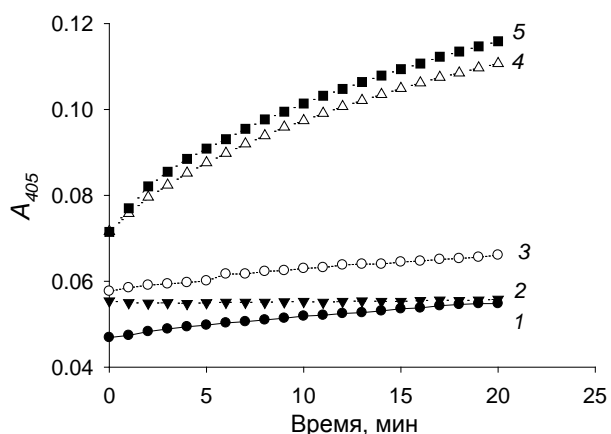


Рис. 3. Окисление ферроцианида, катализируемое HIF PHD2 в присутствии HIF субстратов. Условия реакции: 37°C, 50 мкг PHD2, 50 мкМ пептида, 100 мкМ α КГ, 8 мкМ FeSO_4 , 1 мМ $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 50 мМ Трис-НСI буфер, pH 7,5 (25°C). 1 – контроль (HIF пептид), 2 – контроль (PHD2 без субстрата), 3 – контроль (GST-HIF), 4 – PHD2 и HIF пептид, и 5 – PHD2 и GST-HIF.

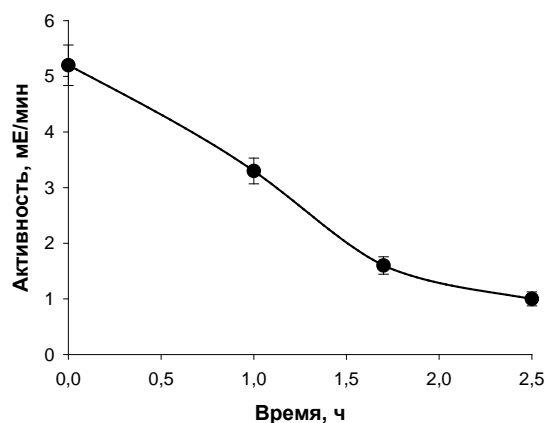


Рис. 4. Инактивация препарата His-PHD2 в отсутствие восстановителя (DTT) при инкубировании на льду. Активность измеряли по окислению ферроцианида (см. условия на Рис.3 и в материалах и методах).

Проблема этого метода измерения активности состоит в необходимости удаления восстановителя (дителиотрейтол), что приводит к быстрой инактивации фермента при хранении (80% инактивация на льду в течение 2-х часов, см. Рис. 4).

Однако, для целей разработки методики выделения и очистки фермента этот метод измерения активности самый подходящий. Интересно отметить, что недавно опубликованная статья (Kaelin, Cell, 2016) декларирует зависимость ферментативной активности HIF пролилгидроксилазы от восстановленных тиолов *in vivo* как «сенсора цистеина», а именно, показывает, что исчерпание в клетке восстановленного глутатиона при блокировании цистинового транспортера, приводит к инактивации фермента.

3. Рефолдинг PHD2 из телец включения *E.coli* и очистка:

При разработке процедуры рефолдинга проводилась оптимизация по концентрации мочевины, используемой для солюбилизации телец включения (6-8 М) и для проведения собственно рефолдинга (0,6-2,3 М), состава буфера (50 мМ Трис-НСl или фосфатные буфера) и его рН (от 7 до 8), содержания соли (NaCl), окисленного и восстановленного глутатиона, ЭДТА, NIF пептида, сукцината, глицерина, и концентрации солюбилизированного белка His-PHD2.

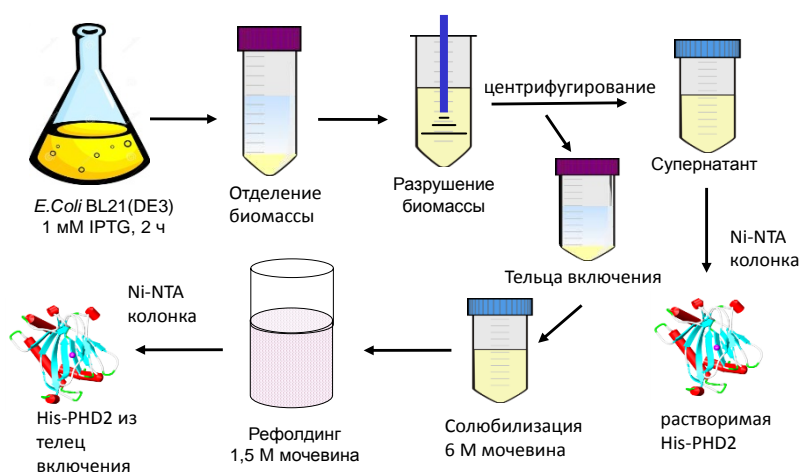


Рис. 5. Схема рефолдинга пролилгидроксилазы из телец включения *E.coli*

Оптимизированный протокол реактивации фермента из телец включения (Рис.5) включал в себя следующие стадии: (1) солюбилизацию телец включения в 6 М мочевины с последующим разбавлением в среде для рефолдинга, содержащей 1,5 М мочевины, 4 мМ дитиотрейтол (ДТТ), 0,1 мг/мл солюбилизированного белка в калий-фосфатном буфере с рН 7,8; (2) инкубацию в течение 16 часов, с последующим разбавлением инкубационной среды в 5 раз и концентрированием активного белка на Ni-NTA носителе, при добавлении последнего непосредственно в среду; (3) отделение носителя, промывание буфером, и затем элюция активного фермента с помощью 0,2 М раствора имидазола. Для предотвращения выпадения фермента в осадок, фермент очищали гель-фильтрацией от имидазола, используя буфер с высокой молярностью (минимум 0,2 М фосфат) либо содержащий 0,2-0,3 М NaCl. В растворах низкой молярности фермент, как оказалось, склонен к выпадению в осадок.

Было проведено сравнение двух способов разрушения биомассы на выход и чистоту активного фермента при рефолдинге из телец включения. Как оказалось, разрушение на Х-прессе (Френч-пресс) позволяет увеличить выход и улучшить чистоту конечного препарата фермента, реактивированного из телец включения (не показано). Следует отметить, что эффективность очистки благодаря присутствию His-tag очень высока, и чистота препаратов, полученных при элюировании фермента после рефолдинга, составляет более 95%.

В Таблице 2 приведены основные показатели процедуры реактивации PHD2 из телец включения в сравнении с растворимой формой, также полученной в данной работе.

Таблица 2. Очистка His-PHD2 из растворимой фракции и реактивация из телец включения (биомасса собрана с 0,5 л культуральной среды *E.coli*).

Фракция фермента	Общий белок, мг	Общая акт., Е	Уд. акт., Е/мг белка	Выход по активности, %	Реактивация, %	Очистка
Растворимая, в супернатанте	10,0	н.о.	н.о.	-	-	1
Растворимая, после очистки на Ni-NTA носителе	0,2	0,016	0,08	-	-	50
Нерастворимая, рефолдинг	30,0	3	0,1	100	100	1
Нерастворимая, рефолдинг после очистки на Ni-NTA носителе	6	2,7	0,45	67	20	4,5

Как следует из приведенных данных, фермент, полученный с помощью рефолдинга из телец включения, имеет существенно более высокую удельную активность, чем его растворимая форма. Дополнительным преимуществом является высокий выход по белку - порядка 5 мг активного фермента с литра культуральной среды. Активность фермента по потреблению α -кетоглутарата (α КГ) составляет порядка 0,2 Е/мг белка или 5 молей/мин/моль (принимая молекулярный вес рекомбинантного белка равным 25 кДа). Такая удельная активность превосходит по величине описанные в литературы препараты растворимых форм пролилгидроксилаз и находится уже в диапазоне значений, характерных для препаратов фермента His-PHD2, выделенных в системе экспрессии бакуловируса (4 - 20 молей/мин/моль).

Таким образом, впервые удалось разработать методику реактивации из телец включения HIF пролилгидроксилазы His-PHD2, экспрессированной в клетках *E.coli*, и провести сравнение ее каталитической активности с одновременно полученной растворимой формой фермента. Более высокая (в 4-5 раз) удельная активность фермента, полученного с помощью рефолдинга из телец включения, по-видимому, отражает достаточно быструю инактивацию фермента, находящегося в супернатанте после разрушения клеток, в отличие от телец включения, окисление которых в процессе очистки и реактивации удается предотвратить высокими концентрациями ДТТ. Разработанная процедура реактивации может применяться и при отсутствии His-тага, однако, в этом случае концентрирование фермента ультрафильтрацией из среды для рефолдинга занимает значительное время и приводит к существенным потерям как удельной активности вследствие инактивации, так и общей активности из-за необратимой сорбции белка на мембране, что еще раз подтверждает нестабильность фермента и его высокую гидрофобность.

4. Изучение ингибирования препарата фермента PHD2 оксихинолинами

В результате высокопродуктивного скрининга на клеточных линиях Н.А.Смирновой с соавт. были отобраны два лучших скаффолда 8-оксихинолинов, содержащих разветвленный заместитель в 7-ом положении (Рис. 6). Преимущество отобранных соединений перед

всеми, разработанными на различных фирмах, состоит в том, что эти молекулы проникают через гематоэнцефалический барьер и могут применяться не только для активации синтеза эритропоэтина, но и при инсультах. Соединение 8, без дополнительной оптимизации было использовано в модели геморрагического инсульта и показало хорошие результаты.

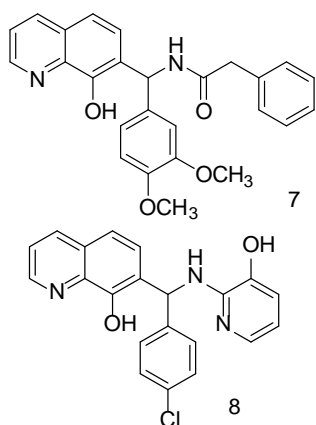


Рис. 6. Молекулы-кандидаты, отобранные как активаторы HIF.

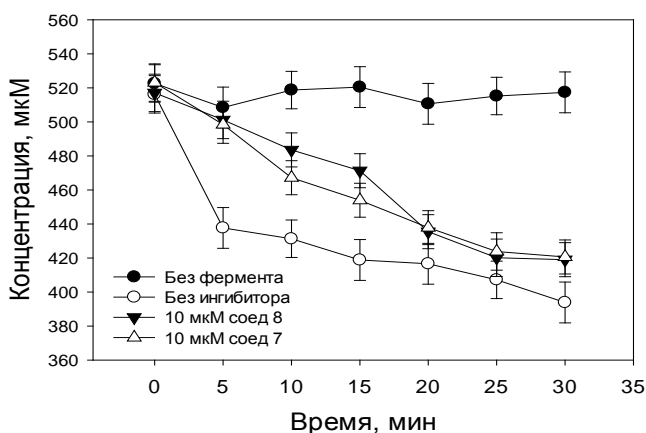


Рис. 7. Ингибирование активности PHD2 соединениями 7 и 8. Конечные концентрации фермента – 50 мкМ, пептида 200 мкМ, сульфата железа 25 мкМ, кетоглутарата 500 мкМ.

Выбор одного из скаффолдов для дальнейшей оптимизации требует как прямых доказательств ингибиторных свойств данных соединений на гомогенном ферменте, так и оценки их возможной гепатотоксичности. Для оценки ингибирующего влияния соединений 7 и 8 на реакцию декарбоксилирования α КГ проводилось определение концентраций ингибитора, при которой наблюдалось двукратное падение скорости реакции в заданных условиях ее проведения (Рис. 7). Использовали прямой метод определения активности PHD2, основанный на реакции измерения концентрации потребляемого α КГ с помощью его высокотемпературной химической модификации в присутствии *o*-фенилендиамина и образованием флуоресцентного аддукта. Поскольку концентрация железа (II) в реакционной смеси очень велика (25-30 мкМ) диапазон исследуемых концентраций ингибиторов был сдвинут в интервал 5-50 мкМ с шагом в 5 мкМ. При 5 мкМ, в пределах ошибки измерения, для соединений 7 и 8 падения активности не наблюдалось, а при 15 мкМ – почти полное ингибирование (не показано). Как следует из данных, представленных на Рис.7, соединения 7 и 8 в пределах ошибки измерения являются ингибиторами одинаковой силы ($IC_{50} \sim 10\mu\text{M}$).

Эти данные сильно отличаются от значений, определенных из кинетики возгорания люминесценции при использовании клеточного репортера - для соединения 7 эта величина составляла около 1,2 мкМ (Smirnova et al, 2012). Факт сильно завышенных результатов (в 5 раз) для значения IC_{50} при сравнении с данными, опубликованными для гомогенного фермента, и для клеточного репортера обсуждается для кверцетина в статье (Smirnova et al, 2016). Причиной таких завышенных значений IC_{50} является использование очень высоких концентраций железа в ферментативном анализе, и в случае ингибиторов, обладающих также и небольшой хелатирующей способностью (например, для оксихинолинов константа ассоциации 100-200 нМ, для кверцетина – 2 мкМ), это приводит к сильно завышенным

значениям концентрации, которая соответствует 50 % ингибирования, полученным в гомогенном методе с использованием очищенного фермента.

Таким образом, оба соединения являются ингибиторами очищенного фермента, и 5-7 кратное увеличение IC_{50} по сравнению с данными клеточного репортера и находятся в пределах литературной нормы. Следовательно, оба скаффолда могут представлять интерес с точки зрения их использования в качестве соединений-кандидатов для последующей оптимизации. В соответствии с развитием новой стратегии разработки ЛП, обе молекулы должны быть уже на этом этапе охарактеризованы на модели человеческих гепатоцитов для определения токсичности и путей биотрансформации.

5. Оценка гепатотоксичности и путей биотрансформации потенциальных антигипоксантов.

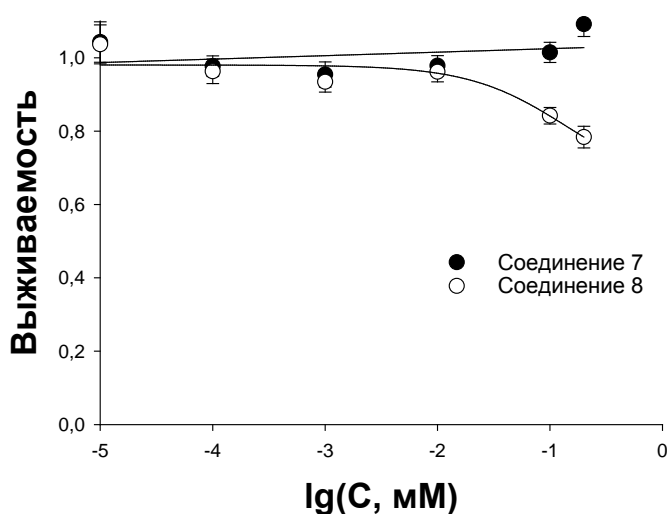


Рис. 8. Выживаемость гепатоцитов *HepaRG* в присутствии соединений 7 и 8 при инкубировании в течение 24 ч в условиях МБР (определяли колориметрическим способом, МТТ-тест)

Диапазон биологически активных концентраций соединений 7 и 8 лежит в области микромолярных концентраций (1-10 мкМ) в условиях репортерного анализа на клеточной линии. Поскольку одним из требований к потенциальным лекарственным препаратам является широкий диапазон отсутствия токсичности, нами был выбран диапазон 1-200 мкМ при исследовании данных препаратов на культивируемых дифференцированных клетках *HepaRG* в условиях МБР. Как следует из данных на Рис. 8, соединение 8 начинает проявлять токсичность при концентрации выше

100 мкМ, в то время как для соединения 7 нет признаков токсичности и при 200 мкМ. Таким образом, оба скаффолда являются практически нетоксичными в диапазоне биологически активных концентраций. При этом скаффолд соединения 7 заслуживает большего внимания, поскольку его производные могут в перспективе оказаться менее токсичными, чем производные соединения 8.

6. Выбор панели субстрат-ингибитор цитохромов P450 и оптимизация детектирования метаболитов

Для определения пути биотрансформации лекарственного соединения, а именно для выявления изоформы цитохрома P450, который вовлечен в метаболизм вещества, необходима разработка панели селективных ингибиторов к каждой изоформе P450. Поскольку не все из 57 изоформ детально охарактеризованы, первичная панель должна включать комбинацию изоформ, метаболизирующих большую часть известных

лекарственных средств. В нашем случае мы остановились на четырех изоформах, которые метаболизируют более 65% препаратов - CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, и CYP2B6.

CYP3A4 метаболизирует около 30% клинически используемых лекарственных средств из практически всех терапевтических категорий. В качестве специфического субстрата цитохрома 3A4 был выбран **тестостерон**. В качестве специфического ингибитора был выбран **кетоконазол (KZ)**, который при использовании в концентрации ниже 1 мкМ ингибирует только CYP3A4.

CYP2C19 оказывает воздействие на 10-15% используемых в настоящее время лекарственных препаратов. CYP2C19 является основным ферментом, осуществляющим метаболизм **омепразола**, поэтому в качестве специфического субстрата цитохрома CYP2C19 был выбран **омепразол. (+)-N-3-бензил-нирванол (NBN)** – специфический ингибитор цитохрома 2C19 – был впервые синтезирован в 2002 г.

Цитохром **CYP2C9** метаболизирует многие классы препаратов и уступает только CYP3A4 по количеству метаболизируемых лекарственных средств. Наиболее специфическим субстратом CYP2C9 является **толбутамид**, который расщепляется преимущественно по одному метаболическому пути с образованием 4-окситолбутамида на первой скорость-лимитирующей стадии, а наиболее селективным ингибитором является **сульфафеназол (SF)**.

Долгое время экспрессия **CYP2B6** в печени и его вклад в общий метаболизм ксенобиотиков считались незначительными (<1% от всех изоформ цитохрома P450). Однако в последние годы интерес к этой изоформе цитохрома P450 заметно возрос. С помощью более специфичных антител было показано, что на CYP2B6 приходится от 2% до 10% общего содержания цитохромов P450 в печени. Наиболее специфическим субстратом CYP2B6 является **бупропион** в низких концентрациях (меньше 500 мкМ), продуктом окисления которого является 6-оксибупропион. **2-фенил-2-(1-пиперидинил)пропан (PPP)** известен как специфический инактиватор цитохрома 2B6 человека.

Принцип действия панели субстрат-ингибитор состоит в следующем. При совместной инкубации исследуемого субстрата и ингибитора определенной изоформы P450 определяется содержание исходного вещества и его метаболитов. Изоформу цитохрома P450, вовлеченную в метаболизм исследуемого соединения, определяют по изменению соотношения концентраций метаболитов в отсутствие и в присутствии селективного ингибитора данной изоформы: если при совместной инкубации вещества с ингибитором накопления метаболита не наблюдается или его концентрация снижена по сравнению с начальной, делается вывод, что биотрансформация происходит с участием той изоформы цитохрома P450, для которой был подобран данный ингибитор. Обоснование выбора специфических субстратов и селективных ингибиторов было проведено на основе литературных данных и результаты выбора панели представлены в Таблице 3.

Была проведена оптимизация жидкостной хроматомасс-спектрометрии для одновременного определения метаболитов всех субстратов. Работа проводилась с использованием хроматомасс-спектрометра LCMS 8030 (Shimadzu, Япония), оснащенным

электроспреем, в качестве источника ионизации, и тремя квадруполями. Растворы подавались в источник ионизации при следующих настройках: поток газа в источнике спрея – 3 л/мин; поток осушающего газа – 15 л/мин; температура desolvation line – 300°C; температура heat block – 500°C; режим положительной ионизации. Оптимизацию параметров масс-спектрометрической детекции проводили в несколько этапов. Сначала регистрировали масс-спектры растворов исходных соединений в режиме сканирования без соударения (Q3 scan). При таком режиме вещества не подвергаются разрушению. Принимая во внимание известную молярную массу веществ и погрешность прибора, выбирали m/z ионов максимальной интенсивности.

Таблица 3. Панель субстрат/ингибитор для доклинического исследования биотрансформации лекарственных средств *in vitro*

Цитохром	CYP2B6	CYP2C9	CYP2C19	CYP3A4
Уровень относительной экспрессии, %	2-10	20		40
Относительное количество метаболизируемых субстратов, %	3-12	12		50
Субстрат и его концентрация, мкМ	Бупропион 10	Толбутамид 40	Омепразол 20	Тестостерон 10
Ингибитор и его концентрация (константа ингибирования), мкМ	30 ($K_i=5,10$) 2-фенил-2-(1-пиперидинил)-пропан	5 ($K_i=0,70$) сульфафеназол	1 ($K_i=0,26$) (+)-N-3-бензил-нирванол	1 ($K_i=0,13$) кетоконазол
Буквенное обозначение	PPP	SF	NBN	KZ

Таблица 4. Список МС/МС переходов, использованных для детекции субстратов и метаболитов.

Соединение	m/z иона-прекурсора	m/z фрагмента	Энергия соударения, эВ
Бупропион	239,95	183,95	-15
Толбутамид	271,00	90,90	-35
Омепразол	346,00	198,00	-10
Тестостерон	289,20	108,90	-26
6-гидроксибупропион	256,20	238,00	-10
4-гидрокситолбутамид	287,00	73,95	-15
5-гидроксиомепразол	261,75	213,75	-15
6-β-гидрокситестостерон	305,20	269,20	-20

На следующем этапе проводили варьирование энергии соударения при регистрации масс-спектров продуктов распада исходных соединений (Product ion scan). При таком режиме после отбора иона заданной массы, происходит его разрушение при соударении с атомами инертного газа. Совокупность данных о m/z исходного иона, m/z продукта его разрушения и энергии соударения, при которой данное разрушение произошло, позволяет идентифицировать вещество при реальном анализе. Для этого использовали полученные на первом этапе значения m/z ионов и отбирали ионы продуктов распада максимальной интенсивности. Полученные данные позволили проводить анализ соединений в режиме

multiple reaction monitoring (MRM), который обеспечивает повышенную селективность детектирования веществ в сложных смесях.

ВЭЖХ проводили на хроматографической колонке ZORBAX Eclipse Plus C18 4,6 мм x 150 мм, 5 мкм (Agilent, США). Для определения эффективности хроматографического разделения и детекции была приготовлена субстратная смесь, содержащая бупропион, толбутамид, омепразол, 6-гидроксибупропион, 4-гидрокситолбутамид, 5-гидроксиомепразол, тестостерон и 6-бета-гидрокситестостерон в концентрациях 10 мкМ. Объем инжектирования составлял 20 мкл. Были подобраны следующие параметры: скорость потока – 1 мл/мин; температура – 40°C; подвижная фаза А – 0,425 об.% муравьиной кислоты в 5% растворе ацетонитрила в воде; подвижная фаза Б – 0,425 об.% муравьиной кислоты в ацетонитриле. Градиентный режим: 0-3 мин – 100% фазы А, 3-11 мин – линейный градиент от 100 до 60% фазы А, 11-13 мин – линейный градиент от 60 до 0% фазы А, 13-15 мин – 0% фазы А, 15-18 мин – линейный градиент от 0 до 100% фазы А, 18-21 мин – 100 % фазы А. При использовании данного метода удалось идентифицировать все определяемые соединения с хорошей точностью (Таблица 5), поэтому дополнительная оптимизация не проводилась.

Таблица 5. Пределы определения (LOQ) и обнаружения (LOD) исследуемых соединений.

Исследуемое соединение	LOD, нМ	LOQ, нМ
Тестостерон	10,93	33,15
6-гидроксибупропион	5,41	16,41
4-гидрокситолбутамид	2,16	6,53
5-гидроксиомепразол	0,05	0,16

7. Аprobация панели в условиях МБР «Гомункулус»

Клетки *НераRG* культивировали, дифференцировали и формировали сфероиды. Культивирование осуществляли в полной питательной среде (Williams' Medium E (Gibco, США)), содержащей 2 мМ L-глутамин (Gibco, США), 10 % фетальной бычьей сыворотки (HyClone, Thermo Scientific, США), 5 мкг/мл рекомбинантного инсулина человека (Gibco, США), 5×10^{-5} М гидрокортизона гемисукцината (Sigma, США), 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco, США). Клетки дифференцировали с добавлением 2 % ДМСО в течение 14 дней, а затем формировали сфероиды в 96-луночных планшетах с низкой адгезией и U-образным дном в течение 5 дней. После 5 дней формирования сфероиды переносили в бессывороточную питательную среду (William`s E с добавлением L-глутамин (Gibco, США), 1 x Insulin-Transferrin-Selenium (ITS-G, Thermo Scientific, США), 1 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma, Германия), 5×10^{-5} М гидрокортизона гемисукцината (Sigma, США), 1 x заменимых аминокислот (NEAA, Thermo Scientific, США), 1 % пенициллин/стрептомицина (Gibco, США) и инкубировали еще сутки.

Культивирование образцов КМПЧ проводили в Микробиореактор «Гомункулус» (Микробиореактор БАВР.422522.001 по ТУ 4389-002-89584548-2014, далее МБР) и сменных клеточных блоках СКБ 005001 (далее СКБ). Для предварительного эксперимента использовали 15 СКБ. В ячейки для культивирования клеток СКБ МБР вносили по 100

образцов КМПЧ, затем из ячеек отбирали питательную среду и вносили по 125 мкл среды, содержащей субстратную смесь цитохромов P450 (10 мкМ бупропиона, 10 мкМ тестостерона, 40 мкМ толбутамида, 20 мкМ омепразола). Культивирование проводили в течение 24 ч при частоте работы клапанов 5 Гц и давлении ± 10 кПа. Рабочие растворы данных соединений готовили путем разведения стоковых 1000-кратных растворов в культуральной среде с последующим пропусканием ее через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. После 24 ч культивирования, из каждого СКБ было отобрано 100 мкл среды, к которым добавляли 35 мкл охлажденного до -20°C ацетонитрила и проводили хроматомасс-спектрометрический анализ для определения наличия исходных субстратов и их метаболитов. Результаты изучения биотрансформации субстратов цитохрома P450 в присутствии ингибиторов представлены на Рис. 9.

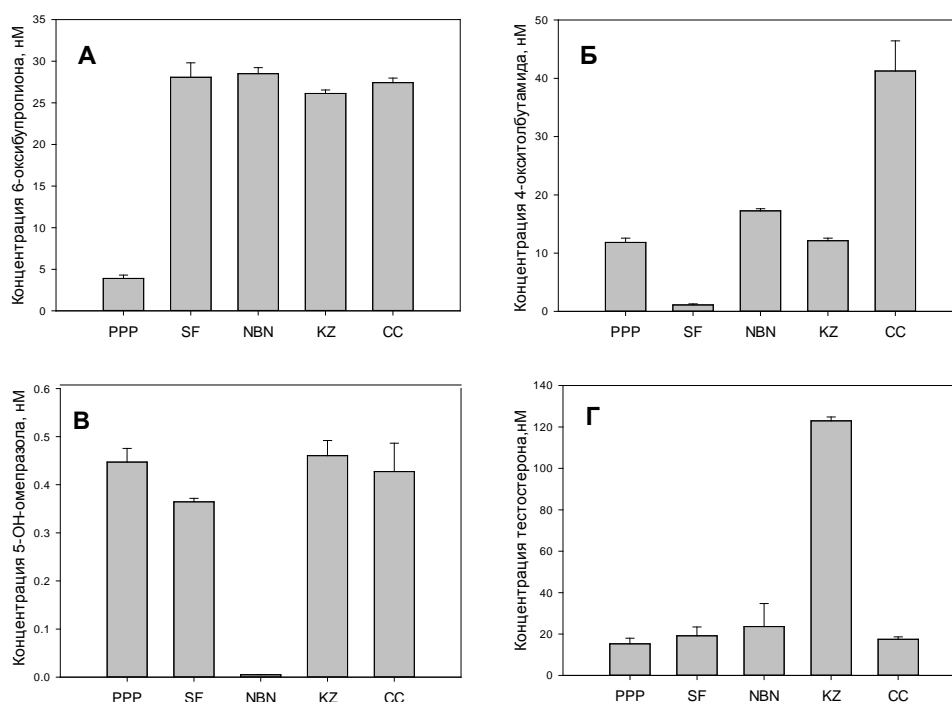


Рис. 9. Эффект специфических ингибиторов отдельных изоформ цитохрома P450 на концентрацию основных метаболитов бупропиона (А), толбутамида (Б), омепразола (В) и тестостерона (Г) при культивировании клеточной модели печени человека. PPP – специфический ингибитор CYP2B6, SF – сульфafenазол – ингибитор CYP2C9, NBN – (+)-N-3-бензил-нирванол - CYP2C19, KZ – кетоназол – CYP3A4, CC – субстратная смесь в отсутствие ингибиторов (контроль).

Результаты изучения панели субстрат-ингибитор, представленные на Рис. 9, демонстрируют правомерность рассуждений по выбору каждой из пар. А именно, в случае изоформы цитохрома CYP2B6 добавление селективного ингибитора – 2-фенил-2-(1-пиперидинил)пропана приводило к значительному снижению концентрации метаболита бупропиона - 6-оксибупропиона (рис. 9А). В случае цитохрома CYP2C9, специфическим субстратом которого является толбутамид, добавление всех ингибиторов приводило к снижению концентрации его метаболита - 6-окситолбутамида, однако при добавлении селективного ингибитора CYP2C9- сульфafenазола - концентрация 6-окситолбутамида была не только ниже предела количественного определения, но и ниже предела

обнаружения (рис. 9Б). В случае CYP2C19 (рис. 9В), добавление (+)-N-3-бензил-нирванола приводило к полному ингибированию образования 5-оксиомепразола.

В случае изоформы цитохрома CYP3A4 активность определяли по убыли субстрата, а не накоплению продукта, и наличие исходного субстрата – тестостерона - наблюдалось только при добавлении селективного ингибитора – кетоконазола (рис. 9Г). Таким образом, была разработана специфическая панель субстрат/ингибитор для оценки индивидуальной активности четырех наиболее важных изоферментов цитохрома P450.

8. Валидация панели субстрат-ингибитор с помощью варфарина и дазатиниба

Поскольку выбранные вещества являются хорошо изученными препаратами и метаболиты известны, на первом этапе проводили оптимизацию масс-спектрометрической детекции: массы исходного иона, энергии соударения и массы дочернего иона (Таблица 6).

Таблица 6. Список МС/МС переходов, использованных для детекции продуктов биотрансформации исследуемых лекарственных веществ.

Соединение	m/z иона-прекурсора	m/z фрагмента	Энергия соударения, эВ
Варфарин	309,05	163,00	-15
Дазатиниб	488,00	401,00	-30
7-гидроксиварфарин	325,05	178,75	-20
4'-гидроксидазатиниб	504,00	416,88	-30
Соединение 7	429,25	294,10	-15
Соединение 8	378,15	268,00	-20

Как видно из представленных на рис. 10 данных, селективным ингибитором биотрансформации варфарина является сульфафеназол, в то время как для дазатиниба таковым является кетоконазол. Это свидетельствует о том, что биотрансформация варфарина происходит с участием изоформы цитохрома P450 CYP2C9, что хорошо согласуется с литературными данными, а биотрансформация дазатиниба происходит с участием изоформы цитохрома P450 CYP3A4, что также хорошо соответствует литературным данным. При этом и варфарин, и дазатиниб являются ингибиторами биотрансформации толбутамида и омепразола, но не оказывают влияния на биотрансформацию тестостерона и бупропиона (рис. 11).

Можно сделать вывод о том, что применение данных лекарственных средств с соединениями, метаболизируемыми цитохромом CYP2C19, будет приводить к межлекарственным взаимодействиям. Данный результат хорошо согласуется с литературными данными. В случае дазатиниба, так же нежелателен совместный прием с препаратами, биотрансформация которых происходит с участием цитохрома CYP2C9, что согласуется с литературными данными. Помимо этого, возможно взаимодействие дазатиниба с другими ЛП, метаболизируемыми цитохромом CYP3A4.

В результате проведенных работ по валидации разработанной панели субстрат-ингибитор цитохромов P450 можно заключить о возможности ее использования в качестве стандартной панели для идентификации изоферментов P450, участвующих в биотрансформации, и оценки возможного межлекарственного взаимодействия.

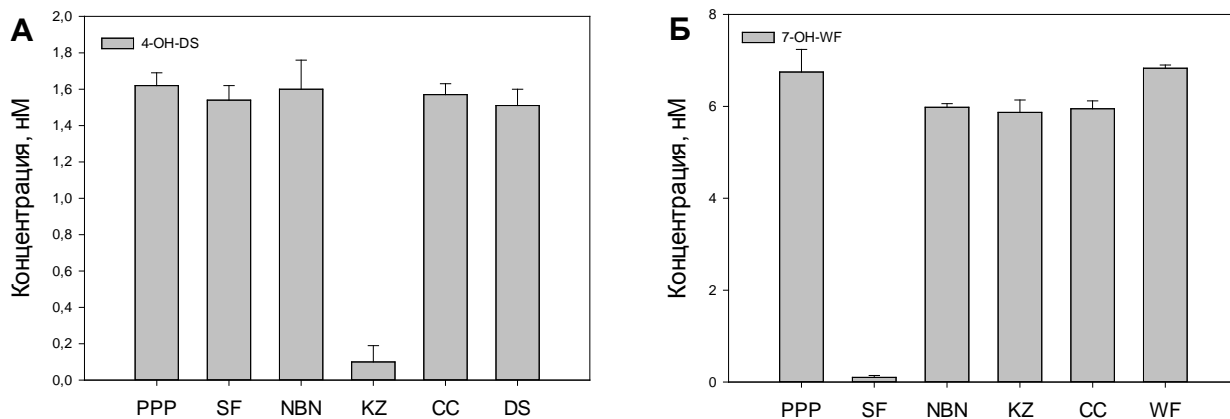


Рис. 10. Эффект специфических ингибиторов отдельных изоформ цитохрома P450 на концентрацию основных метаболитов дазатиниба, DS (А) и варфарина, WF (Б) при культивировании клеточной модели печени человека. PPP – ингибитор CYP2B6, SF – CYP2C9, NBN – CYP2C19, KZ – CYP3A4. Контроли: CC – субстратная смесь в отсутствие ингибиторов; DS – дазатиниб (А) и WF – варфарин (Б) в отсутствие субстратной смеси.

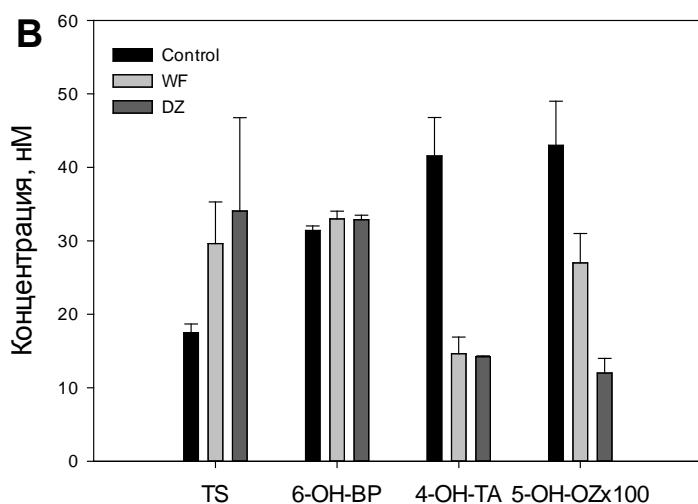


Рис. 11. Концентрация субстратов (TS – тестостерон) и метаболитов (6-OH-BP – 6-гидроксибупропин, 4-OH-TA – 4-гидрокситолбутамид, 5-OH-OZ – 5-гидроксиомепазол) после 24 ч инкубации разработанной панели в присутствии 1 мкМ варфарина или дазатиниба. (Концентрация 5-гидроксиомепазола показана с увеличением в 100 раз).

9. Апробация панели для оценки биотрансформации соединений 7 и 8

Поскольку литературные данные по метаболитам соединений 7 и 8 отсутствуют, была проведена оптимизация масс-спектрометрической детекции исходных соединений (Таблица 6). Изучаемые соединения и их метаболиты не перекрывались в ВЭЖХ с субстратами и метаболитами панели. Апробацию панели проводили при 1 мкМ испытуемого соединения и инкубации в МБР в течение 24 ч. Как следует из представленных данных (Рис. 12 А,Б), в присутствии обоих соединений концентрация бупропиона и тестостерона уменьшается вдвое, иными словами, их потребление сильно активизируется, что позволяет предполагать индукцию изоформ цитохрома, катализирующих гидроксилирование бупропиона и тестостерона, изучаемыми соединениями. Для идентификации природы индуцируемых цитохромов было проверено, как влияют изучаемые соединения на основные метаболиты субстратов панели (Рис. 12 В и Г). Для обоих изучаемых соединений наблюдалось резкое увеличение концентрации продукта гидроксилирования бупропиона – субстрата CYP2B6, но не наблюдалось увеличение концентрации продукта гидроксилирования тестостерона CYP3A4. Полученные результаты свидетельствуют об

индукции CYP2B6 под действием изучаемых соединений, но не CYP3A4. Поэтому можно говорить о специфическом характере индукции изучаемыми соединениями цитохрома CYP2B6, механизм которой может быть предметом дальнейших исследований.

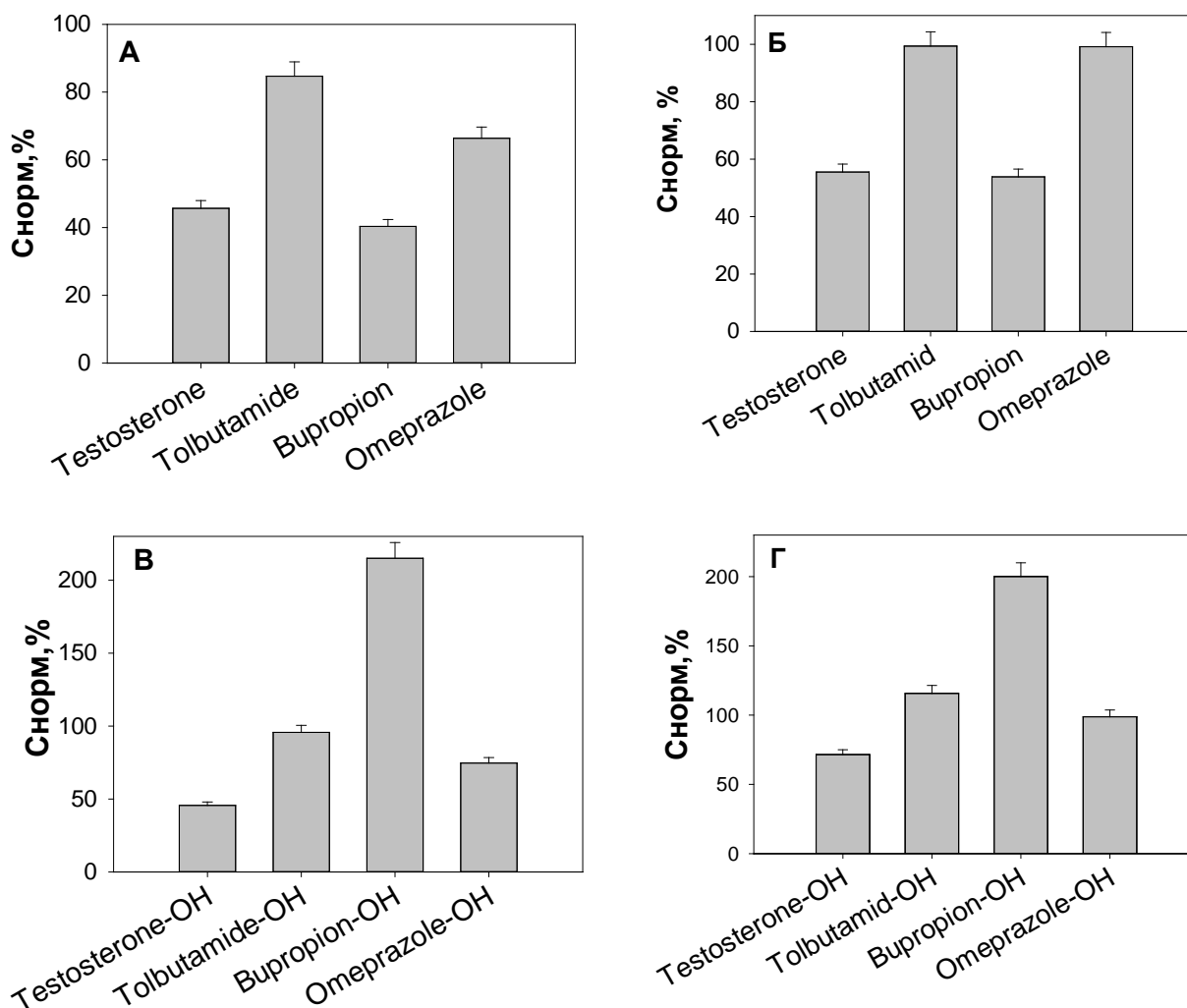


Рис. 12. Влияние соединений 7 и 8 на убыль субстратов панели (А и Б) и образование гидроксилированных метаболитов субстратов панели (В и Г) при совместной инкубации в МБР в течение 24 ч.

Проведение ингибиторного анализа на разработанной панели (рис. 13) демонстрирует эффективное, практически полное потребление изучаемого соединения, которое в значительной степени ингибируется только РРР и кетоконазолом – ингибиторами цитохромов CYP2B6 и CYP3A4. Таким образом, изучаемые соединения гидроксилируются в основном данными цитохромами, при этом являясь сильными индукторами цитохрома CYP2B6. Индукция цитохромов Р450 под действием субстратов гидроксилирования – хорошо известный в литературе феномен. При масс-спектрометрическом анализе удастся определить только массы продуктов (соответствующих фрагментов), но не положение кислорода, которое предсказывается исходя из литературных данных по гидроксилированию оксихинолинов различными изоформами цитохрома Р450 печени человека (на основе которых работает программа ChemAxon Metabolizer).

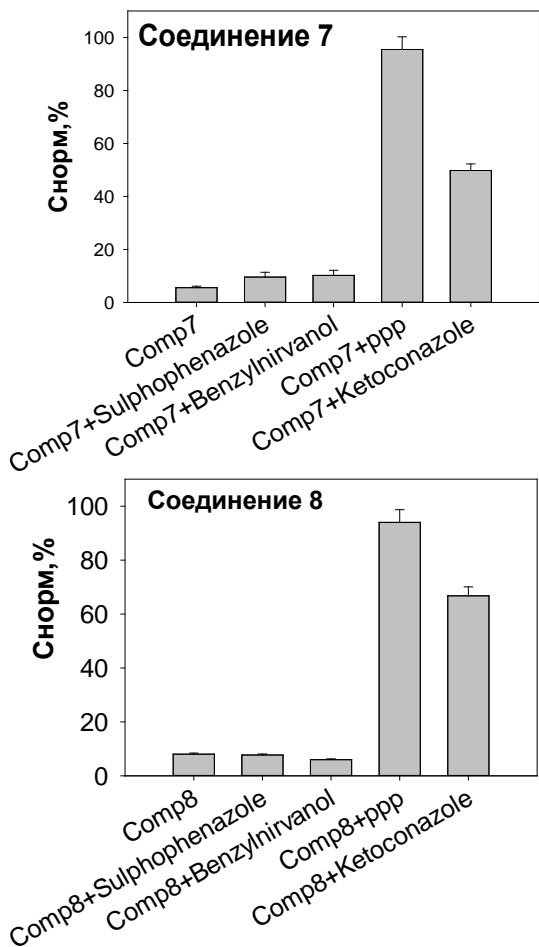


Рис. 13. Влияние ингибиторов разработанной панели на потребление соединений 7 и 8.

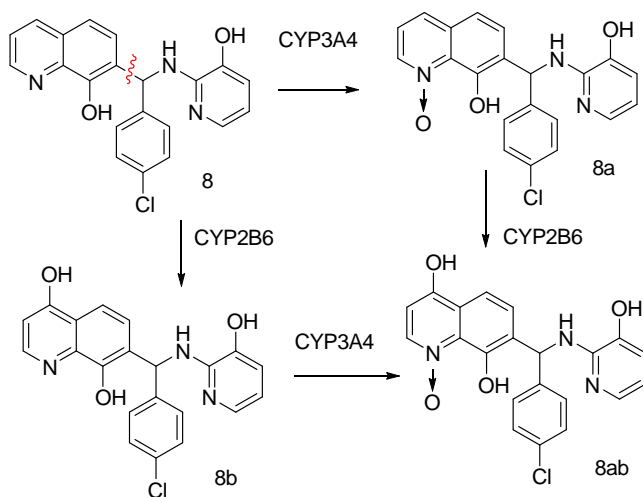


Рис. 14. Схема биотрансформации изучаемых соединений, предложенная на основании данных апробации панели и использования программы ChemaAxon Metabolizer. Продукт 8a – N-оксид, 8b – 4-гидроксипроизводное исходного соединения 8. Красным обозначено отщепление фрагмента при МС-анализе.

В результате апробации панели можно предложить следующую схему биотрансформации изучаемых соединений (рис. 14), а именно оба препарата гидроксилируются цитохромами CYP2B6 и CYP3A4 с образованием продуктов гидроксилирования, соответствующих продуктам, описанным в литературе для гидроксилирования оксихинолинов – 4-гидроксипроизводного (для

CYP2B6) и N-оксида (CYP3A4), а также продукта двойного гидроксилирования обоими цитохромами.

ВЫВОДЫ

1. Впервые разработана методика рефолдинга HIF пролилгидроксилазы человека из телец включения *E.coli*. Клонирование каталитических доменов всех трех изоформ фермента (PHD1-3) в *E.coli* показало наивысший выход экспрессии для изоформы PHD2, причем основная масса белка приходилась на тельца включения *E.coli*. Для данной изоформы была разработана процедура реактивации методом рефолдинга из телец включения *E.coli*. Для оптимизации реактивации была разработана непрерывная методика регистрации активности фермента по окислению ферроцианида в присутствии HIF белка или пептида. Сравнение фермента из растворимой фракции с ферментом, полученным реактивацией из телец включения, показало в 4-5 раз более высокую специфическую активность последнего (5 моль/мин/моль) в реакции потребления α КГ, регистрируемой по флуоресцентной детекции аддукта α КГ с о-фенилендиамином. Показано, что

потенциальные антигипоксанты – соединения 7 и 8, идентифицированные ранее в скрининге с использованием клеточного репортера, являются ингибиторами P₄₅₀.

2. Исследована гепатотоксичность соединений 7 и 8, и показано, что в случае соединения 7 токсичность отсутствуют вплоть до концентрации 200 мкМ, в то время как для соединения 8 наблюдается незначительная токсичность. Таким образом, оба препарата в диапазоне концентраций, превышающем более чем на порядок диапазон концентраций проявления биологической активности, являются нетоксичными для печени человека.

3. Разработана и оптимизирована панель субстрат-ингибитор для микробиореактора с микроциркуляцией – «печени на чине» - для доклинической оценки путей биотрансформации лекарственных соединений. Проведен выбор панели субстратов и ингибиторов цитохромов P₄₅₀: на основании изучения литературных данных были отобраны следующие специфические пары субстрат-ингибитор: бупропион/2-фенил-2-(1-пиперидинил)пропан для оценки активности CYP2B6, толбутамид/сульфафеназол для CYP2C9, омепразол/(+)-N-бензилнирванол для CYP2C19, тестостерон/кетоназол для CYP3A4. Оптимизированы концентрации субстратов и ингибиторов для обеспечения достоверной детекции основных метаболитов методом ВЭЖХ-масс-спектропии. Продемонстрирована специфичность выбранной панели к заданным формам цитохрома P₄₅₀.

4. Проведена валидация разработанной панели субстратов и ингибиторов цитохромов P₄₅₀ для доклинического исследования биотрансформации лекарственных средств *in vitro* на гистотипической трехмерной клеточной модели печени человека (КМПЧ), культивируемой в условиях микроциркуляции. Проведена экспериментальная оценка разработанной методики на примере двух тестовых лекарственных средств, варфарина и дазатиниба. Результаты по биотрансформации этих веществ клетками КМПЧ, культивируемыми в микробиореакторе, соответствуют ранее опубликованным данным по метаболизму этих препаратов *in vitro*: биотрансформация дазатиниба происходит с участием изоформы цитохрома P₄₅₀ CYP3A4, а варфарина - CYP2C9. Показано также возможное лекарственное взаимодействие дазатиниба и варфарина с лекарствами, метаболизируемыми цитохромом CYP2C19.

5. Проведено тестирование новых кандидатов антигипоксических препаратов на разработанной панели субстрат-ингибитор и показано, что оба изучаемых препарата гидроксилируются цитохромами CYP2B6 и CYP3A4. На основе результатов апробации панели субстрат-ингибитор и при использовании программы ChemAxon Metabolizer, предложена схема биотрансформации.

6. Обнаружено, что оба исследуемых соединения являются активаторами CYP2B6.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Хушпульян Д.М., **Захарянец А.А.**, Смирнова Н.А., Мороз Н., Тишков В.И., Газарян И.Г. Реактивация из телец включения HIF пролилгидроксилазы 2, экспрессированной в клетках *E.coli*. Известия Академии наук. Серия химическая, 2015, т.64, № 7, с.1671-1677. DOI 10.1007/s11172-015-1058-4.
2. **Захарянец А.А.**, Бурмистрова О.А., Шкурников М.Ю., Полозников А.А., Сахаров Д.А. Разработка специфической панели субстрат-ингибитор для оценки активности цитохромов P450. Клеточные технологии в биологии и медицине - 2016, №3, с. 208-219.
3. **Захарянец А.А.**, Бурмистрова О.А., Полозников А.А. Применение клеточной модели печени человека и панели "субстрат-ингибитор" изоформ цитохрома P450 для изучения межлекарственного взаимодействия дазатиниба и варфарина. Бюллетень экспериментальной биологии и мемедицины. 2016 г., т. 162, № 10, с. 517-523.
4. Hushpulia D.M., **Zakharyants A.A.**, Gazaryan I.G., Tishkov V.I. Recombinant prolyl hydroxylase 2: cloning, expression in *E.coli* and refolding from inclusion bodies. Program & Abstracts of International Conference "INPEC-2014", Gelios Hotel, Zelenogorsk, St.Petersburg region, September 10-14, 2014, p.50.
5. Hushpulia D.M., **Zakharyants A.A.**, Smirnova N.A., Moroz N.A., Tishkov V.I., Gazaryan I.G. Flavonoids as direct HIF prolyl hydroxylase inhibitors: structure-activity relationship. Program and Abstract Book of International Conference "Biocatalysis-2015: Fundamentals and Applications", Moscow region, Avantel Club Istra, June 21-26, 2015, p.106-107.
6. Poloznikov A.A., **Zakharyants A.A.**, Sakharov D.A., Tonevitsky A.G. Utilization of Homunculus platform for evaluation of cytochrome P450 activity in "liver-on-a-chip". Abstracts of European Congresses on Alternatives to Animal Testing (August 24-26, 2016, Linz, Austria). Altex Proceedings, ISSN 2194-047, 2016, Volume 5, No. 1, p.157.
7. **Zakharyants A.A.**, Hushpulia D.M., Smirnova N.A., Poloznikov A.A., Moroz N.A., Tishkov V.I., Gazaryan I.G. Continuous assay to monitor reactivation of various oxygenases from *E. coli* inclusion bodies. Program and Abstract Book of International Conference "Biocatalysis-2015: Fundamentals and Applications", Moscow region, Avantel Club Istra, June 21-26, 2015, p.106.

Работа выполнена в рамках и при поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы», Соглашение №14.579.21.0018, RFMEFI57914X0018, а также гранта РФФИ 14-04-32309-мол_а «Структурно-функциональные исследования HIF пролилгидроксилазы человека».