

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ



*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)

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
доктор химических наук,  
профессор В.И. Тишков

Москва – 2016

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 НIF пролилгидроксилазы человека».

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- БПС - бессывороточная питательная среда
- ВЭЖХ-МС – высоко-эффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием
- ВПС – высокопроизводительный скрининг
- ДМСО - диметилсульфоксид
- ИПТГ – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид;
- αКГ- альфа-кетоглутарат
- КМПЧ - клеточная модель печени человека
- МБР - микробиореактор
- МФУ – микрофлюидное устройство
- ОСМ - онкостатин М
- ППС - полная питательная среда
- иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
- СКБ - сменный клеточный блок
- ФСБ - фосфатно-солевой буфер
- ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота
- СУР - цитохром P450
- DTT – дитиотрейтол
- FAD - флавинадениндинуклеотид
- FMN - флавинмононуклеотид
- HIF – фактор, индуцируемый гипоксией (hypoxia inducible factor)
- HPV – вирус папилломы человека
- IC<sub>50</sub> - концентрация вещества, при которой происходит ингибирование реакции на 50%
- LC<sub>50</sub> – полулетальная концентрация
- LD<sub>50</sub> – полулетальная доза
- LOD – предел обнаружения
- LOQ – предел определения
- Mcl-1 - Induced myeloid leukemia cell differentiation protein – ингибитор апоптоза, связывающийся с про-апоптотическими белками семейства Bcl-2
- NBN - (+)-N-3-бензил-нирванол

NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат, восстановленная форма

Nrf2 – транскрипционный фактор Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2  
(NFE2L2)

PHD – пролилгидроксилазный домен (prolyl hydroxylase domain)

PPP - 2-фенил-2-(1-пиперидинил)пропан

SDS – додецилсульфат натрия

VHL – Von Hippel-Lindau protein

## ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ .....	7
2. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....	15
2.1. СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМ КАТАЛИЗА ЦИТОХРОМА P450 (CYP450) И ЕГО РОЛЬ В ДЕТОКСИКАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ.....	15
2.1.1. Реакции, катализируемые цитохромом P450.....	16
1.1.2. Механизм катализа цитохромом P450 .....	18
1.1.3. Многообразие и субстратная специфичность изоферментов P450 .....	21
2.2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕПАТОЦИТОВ И КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В «ПЕЧЕНИ-НА-ЧИПЕ» .....	23
2.2.1. Первичные гепатоциты .....	24
2.2.2. <i>Upcyte</i> ® гепатоциты .....	25
2.2.3. Линия <i>HepG2</i> .....	26
2.2.4. Линия <i>HepaRG</i> . .....	26
2.2.5. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) .....	27
2.3. МИКРОБИОРЕАКТОР ГОМУНКУЛУС – РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ.....	31
2.4. НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ В РАЗРАБОТКЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ.....	35
2.4.1. Регуляция HIF - фактора, индуцируемого гипоксией .....	37
2.4.2. Поиск возможных ингибиторов HIF пролилгидроксилазы .....	39
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	43
3.1. МАТЕРИАЛЫ .....	43
3.2. МЕТОДЫ.....	43
3.2.1. Пептидные и белковые субстраты: .....	43
3.2.2. Клонирование изоформ HIF пролилгидроксилазы .....	44
3.2.3 Экспрессия в <i>E.coli</i> , выделение растворимого фермента и рефолдинг из телец включения .....	45
3.2.4. Измерение каталитической активности .....	47
3.2.5. Ингибирование фермента препаратами оксихинолинов.....	48
3.2.6. Изучение стабильности при хранении .....	48
3.2.7. Культивирование <i>HepaRG</i> в МБР «Гомункулус» .....	48
3.2.8. Масс-спектрометрическое детектирование субстратов и их метаболитов.....	49

3.2.9. ВЭЖХ субстратной смеси .....	50
3.2.10. Расчет пределов обнаружения и определения.....	50
3.2.11. Аprobация панели субстрат-ингибитор.....	51
3.2.12. Исследование гепатотоксичности.....	52
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	54
4.1. РАЗРАБОТКА МЕТОДА РЕФОЛДИНГА Н1F ПРОЛИЛГИДРОКСИЛАЗЫ ЧЕЛОВЕКА ИЗ ТЕЛЕЦ ВКЛЮЧЕНИЯ <i>E. COLI</i> .....	54
4.1.1. Сравнение уровней экспрессии различных изоформ РНD в клетках <i>E. coli</i> .....	54
4.1.2. Выделение растворимой формы РНD2 и метод непрерывной регистрации активности. ....	55
4.1.3. Рефолдинг РНD2 из телец включения <i>E. coli</i> и очистка: .....	57
4.1.4. Изучение ингибирования препарата фермента РНD2 оксихинолинами.....	60
4.2. ОПТИМИЗАЦИЯ И ВАЛИДАЦИЯ ПАНЕЛИ СУБСТРАТ-ИНГИБИТОР.....	62
4.2.1. Выбор субстратов и ингибиторов.....	63
4.2.2. Разработка и оптимизация метода детектирования метаболитов .....	76
4.2.3. Раздельное определение метаболитов панели методом ВЭЖХ .....	85
4.2.4. Аprobация панели .....	87
4.2.5. Валидация панели с помощью варфарина и дазатиниба.....	90
4.3. ДОКЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ГЕПАТОТОКСИЧНОСТИ КАНДИДАТОВ-АНТГИПОКСАНТОВ.....	101
4.3.1. Гепатотоксичность на дифференцированной линии <i>HepaRG</i> .....	101
4.3.2. Идентификация изоформ Р450, участвующих в окислении исследуемых соединений .....	102
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.....	112
6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	115

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Разработка лекарственных препаратов представляет собой многостадийный процесс, в котором можно выделить три этапа: открытие новой активной субстанции и изучение ее фармацевтических свойств, проведение доклинических исследований на животных и, наконец, клинических испытаний на людях. Только после успешного завершения клинических испытаний, которые длятся годами, проверенный препарат попадает на регистрацию. С каждым годом разработка и выведение на рынок новых лекарств становится все дороже и дороже – в настоящее время для этого уже требуется 12-15 лет и миллиард долларов США для одного нового препарата. На сегодняшний день основным инструментом поиска новых лекарственных препаратов является метод высокопроизводительного скрининга (ВПС). Цель ВПС – охватить как можно большее количество химических соединений (от десятков тысяч до миллионов), проверить их на активность или аффинность в специальной тестовой системе и выделить группу(ы) структур для последующей оптимизации с использованием методов медицинской химии, компьютерного моделирования и вторичных биологических тестов (Рис.1). Наибольшее влияние на стадии ВПС при поиске кандидата для дальнейшей разработки оказывает качество библиотеки тестируемых соединений. Чистота соединений в библиотеке обычно составляет 95 %, причем часто примесью является предшественник химического синтеза, обладающий значительным алкилирующим потенциалом, а также продукты окислительного разложения основного соединения, что в итоге приводит к ложному результату. Поэтому сроки использования библиотек химических соединений, приготовленных в диметилсульфоксиде (ДМСО), ограничены: библиотеку хранят при +4°C, и активно

используют не более полугода. Другой тип источников ошибок ВПС – это использование рекомбинантных белков при поиске ингибиторов белок-белковых взаимодействий: ВПС проводится в нефизиологических условиях с высокой концентрацией рекомбинантного белка, что способствует неспецифическим гидрофобным взаимодействиям в растворе. Анекдотическим примером служит идентификация молекулы, конкурирующей с транскрипционным фактором Nrf2 за связывание рекомбинантного Kelch домена Keap1 (ингибитора Nrf2): в результате расшифровки кристаллической структуры комплекса, было показано, что две молекулы пакуются внутрь домена за счет неспецифического гидрофобного взаимодействия, что и объясняет отсутствие биологической активности у молекулы-кандидата при проведении последующих биологических тестов на клеточных линиях [1]. Следует отметить, что упаковка двух молекул внутрь белкового домена не редкость, и не всегда означает полное отсутствие биологической активности в последующих биологических тестах. Например, для белка Mcl-1 – популярной мишени для разработки противораковых препаратов – недавно была разрешена кристаллическая структура с двумя молекулами ингибитора его взаимодействия с апоптотическими белками семейства Bcl-2 (5FC4.pdb). Другая проблема полученных в результате ВПС молекул-кандидатов – их низкая растворимость в водных средах. Требуется много времени и усилий для того, чтобы доработать структуры кандидатов до прототипов, подходящих для доклинических исследований.

Преимущества и недостатки первичного ВПС в условиях гомогенного анализа *in vitro* и с использованием различных клеточных и малых животных моделей представлены в Таблице 1. Как правило, при проведении ВПС мишень



известна, за исключением случаев скрининга на моделях заболеваний неизвестной этиологии, где мишень может быть определена с помощью процесса РНК-интерференции или анализа данных, полученных с помощью ВПС на клеточных моделях. Гомогенный анализ *in vitro* проводится на рекомбинантных белках человека. Нужно помнить об отличиях рекомбинантных белков, произведенных в разных организмах, будь то бактерии, дрожжи или насекомые, от эндогенных белков человеческого организма. Даже минимальные структурно-конформационные отличия способны влиять на аффинность биомолекул по отношению к молекулам-кандидатам и приводить к уменьшению или исчезновению биологической активности. Поэтому гомогенный анализ *in vitro* как правило дополняют вторичным биологическим анализом на клеточной модели перед тем, как перейти к этапу тестирования на животных.

ВПС на клеточных репортерах или моделях, использующих линии человеческих клеток, обладает рядом преимуществ, т.к. отбираются только те препараты, которые проникают через клеточную мембрану и не являются токсичными. Дополнительным преимуществом ВПС на линиях клеток является состав внутриклеточной среды, который очень близок по составу и концентрациям компонентов к *in vivo* параметрам в клетках человеческого организма. Это позволяет отбирать те препараты, которые успешно конкурируют за мишень с внутриклеточными метаболитами или белками. Молекулы, отобранные при первичном ВПС на клеточных моделях или репортерных линиях, как правило, нуждаются в валидации для доказательства их взаимодействия с желаемой мишенью, которая проводится с помощью гомогенного анализа *in vitro*.

В сравнении с целым животным организмом, клеточные модели не дают возможности проследить путь лекарственного препарата в органах и оценить его метаболическую нестабильность, которая может приводить как к появлению новой биологической активности, так и повышению токсичности продуктов окисления препарата. Использование в доклинических испытаниях мелких животных, таких как *Caenorhabditis elegans* [2], *Drosophila melanogaster* [3] и *Danio rerio* [4] натолкнуло на идею их использования в первичном ВПС [5]. Использование мелких животных в ВПС не заменяет доклинические испытания мышам, крысам и других высших млекопитающих из-за низкой гомологичности белков мелких животных по отношению к человеческим белкам (Табл.1). Тем не менее, для мелких животных существуют хорошо разработанные модели многих болезней, таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона, мышечная дистрофия Дюшенна, спинальная мышечная атрофия и другие мышечные расстройства, рак, нарушение жирового обмена, инфекции (туберкулез), которые поддаются количественному описанию и, следовательно, проведению ВПС на них. Модели, использующие мелких животных - лишь переходное звено между клеточными моделями и доклиническими испытаниями на млекопитающих, являются дополнением к стандартному ВПС и не заменяют тесты на млекопитающих.

Неудачи на стадии ВПС *in vitro* обходятся не так дорого в сравнении с провалом в конце клинических испытаний или после регистрации в FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США). Почти 90 % всех отозванных с рынка лекарственных препаратов оказались токсичными для человека. За период с 1975 года по 2005 год 20-30 % препаратов, отозванных с рынков США и ЕС, оказались токсичными

именно для печени. Для США эта цифра еще выше - препараты, вызывающие лекарственное поражение печени (ЛПП), составляют 40 % всех отозванных с рынка США. Как видно из Рис. 1.1, только 10% молекул-кандидатов, успешно прошедших стадии доклинических исследований, проходят и через клинические испытания. И снова, одна треть этих неудач на стадии клинических исследований связана с гепатотоксичностью. За 1992 - 2002 годы, процентное соотношение клинических исследований, которые были провальными в связи с гепатотоксичностью на I, II и III фазах клинических испытаний, составило 43, 23 и 35 %, соответственно.



**Рис. 1.1.** «Пирамида», иллюстрирующая путь разработки нового лекарственного препарата, в основании которой лежит ВПС. Существенное удешевление поиска и повышение предсказуемости токсичности связаны с перспективой использования «органов-на-чипе» и «организма-на-чипе».

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. Половина лекарственных препаратов, отозванных в связи с гепатотоксичностью, не показывала токсичности в доклинических испытаниях на животных. Животные модели также не гарантируют корректное определение механизмов действия лекарственного средства и его внутриклеточного метаболизма. Этическая сторона вопроса использования животных в доклинических исследованиях тоже очень важна. Одна из основных целей исследователей во всем мире заключается в том, чтобы создать *in vitro* платформу для поиска лекарств, которая была бы недорогой, эффективной по времени и предсказуемой в смысле токсичности для человека, и гепатотоксичности в частности. Эту цель можно достичь разработкой стандартизированной модели «печени-на-чипе», использующей человеческие клетки для изучения токсичности, а также «органа-на-чипе», подтверждающего эффективность модели, и «организма-на-чипе», в условиях которого можно имитировать метаболизм лекарства в организме и его биодоступность, на стадиях, предшествующих клиническим испытаниям как показано на Рис. 1.1. Такая платформа должна использоваться на ранних стадиях поиска лекарств, чтобы исключить провалы в конце клинических испытаний и соответственно исключить связанные с ними затраты (стратегия “failing early-failing cheaply”). В литературном обзоре мы сфокусировали свое внимание на клеточных моделях печени человека для разработки «печени-на-чипе». Для успешного предсказания гепатотоксичности используемых или

разрабатываемых лекарственных средств наиболее перспективными считаются альтернативные *in vitro* тесты с использованием максимально адекватных клеточных моделей печени человека (КМПЧ), культивируемых в условиях микроциркуляции питательной среды [6,7,8]. Применение таких моделей в разработке лекарственных средств напрямую связано с проблемой стандартизации, в особенности, в отношении изоферментного профиля и активности цитохромов P450.

**Целью настоящего исследования** являлась разработка и валидация панели специфических субстратов и ингибиторов четырех изоферментов P450, наиболее вовлеченных в трансформацию ксенобиотиков у человека, для использования в микробиореакторе (МБР) «Гомункулус» на основе сфероидов дифференцированных клеток линии *HepaRG*. Разработанная панель субстратов и ингибиторов цитохромов P450 для МБР «Гомункулус» была опробована для предсказания механизма окисления двух молекул-кандидатов, идентифицированных ВПС на клеточных линиях ранее как активаторы ННФ, вероятно действующие через ингибирование ННФ пролилгидроксилазы человека, и подтвержденных как специфические ингибиторы в данной работе на препарате фермента, впервые полученном методом рефолдинга из телец включения *E.coli*.

**Таблица 1.** Сравнение моделей и параметров исследований для целей ВПС *in vitro*

Типы исследований или типы моделей	Исследования		Модели				
	<i>In vitro</i> Гомогенные системы	<i>In vitro</i> клеточные модели человека	Клеточные линии человека	Животные модели			
				<i>D.melano gaster</i>	<i>C.elegans</i>	<i>D.renio</i> (рыба зебра)	<i>M.musculus</i>
Известные мишени	Да	Да	Да /Нет	Да /Нет	Да /Нет	Да /Нет	Да /Нет
Поиск соединений	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Нет
Поиск с помощью РНК-интерференции	N/A	Да	Да	Да	Да	Да	Нет
Гомология с человеком	N/A	Высокая	Высокая	Низкая 13 000 >60	Низкая 19 000 >50	Средняя 25 000 >70	Высокая 25 000 >90
Проницаемость через мембрану	Нет	Да	Да	Да	Да	Да	Да
Проходные через гемато-энцефалический барьер	N/A	N/A	N/A	Да /Нет	N/A	Да	Да
Токсичность	Нет	Да	Да	Да /Нет	Да /Нет	Да	Да
Конкуренция с внутриклеточными компонентами	Нет	Да	Да	Да	Да	Да	Да
Время получения культуры	n/a	3-4 дня	3-4 дня	10-14 дней	3-5 дней	3-4 месяца	3-4 недели
Затраты	+	++	++	++++	++++	+++	+
Возможность автоматизации процесса	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Нет
Возможность проведения ВПС	++++	++++	++++	++	+++	++	+
Затраты в год	+	+	+	++++	++++	+++	+

## 2. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 2.1. СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМ КАТАЛИЗА ЦИТОХРОМА P450 (CYP450) И ЕГО РОЛЬ В ДЕТОКСИКАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ

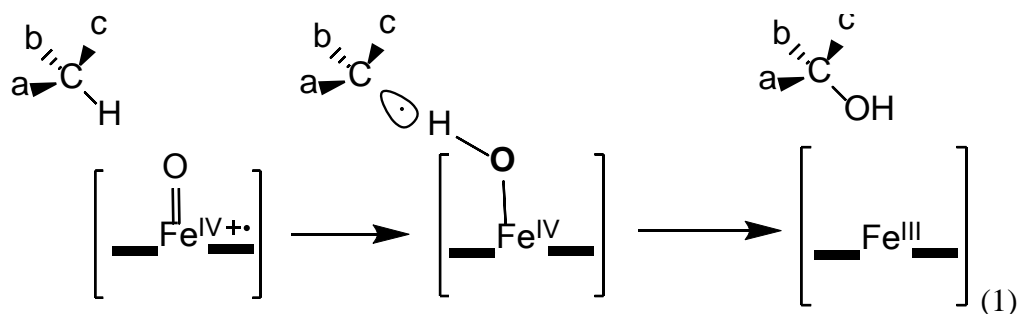
Печень - это живая химическая лаборатория с более чем 500 различными физиологическими функциями, включающими в себя синтез белков (таких как, альбумин, факторы свертывания крови), синтез желчных кислот, метаболизм холестерина, жирных кислот и глюкозы, и др. Одной из важных функций печени является также детоксикация (обезвреживание) эндогенных соединений (билирубин и аммоний), образовавшихся в организме в ходе метаболизма, а также чужеродных веществ (ксенобиотиков), в частности, аллергенов, ядов и токсинов, путём превращения их в безвредные, менее токсичные или легче удаляемые из организма соединения. 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; 3) на третьей стадии 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. Процесс биоактивации ксенобиотиков, происходящий в гепатоцитах,

является основной причиной плохого прогноза по гепатотоксичности препаратов и вносит отрицательный вклад в прогнозируемость неблагоприятных эффектов у человека.

### 2.1.1. Реакции, катализируемые цитохромом P450

Цитохром P450 – универсальная гем-содержащая монооксигеназа была открыта в конце 50-х годов, и обязана своим названием обнаружению в 1964 г. характерного пика на 450 нм у комплекса восстановленного фермента с окисью углерода. Несмотря на неудачное название – т.к. цитохромами обычно называют переносчики электронов - оно до сих пор используется при описании данной группы ферментов. Механизмом катализа цитохромом P450 занимались и занимаются многие академические лаборатории, и несмотря на значительный прогресс в понимании механизма катализа, кристаллизацию многих изоформ фермента с субстратами и ингибиторами и разработанную стратегию *in silico* скрининга, предсказать достоверно полный спектр продуктов окисления системой цитохромов P450 печени без проведения экспериментальных исследований невозможно, как станет очевидно из рассмотрения ниже многообразия реакций, катализируемых ферментом.

CYP450 обладает способностью окислять атомы углерода и гетероатомы. При этом образующиеся продукты окисления могут претерпевать дальнейшие превращения как спонтанно, так и под действием фермента. Наиболее простой вариант – реакция гидрокселирования, типичная для всех монооксигеназ, когда происходит отрыв атома водорода, образование радикала на атоме углерода и присоединение гидроксил-радикала (реакция 1):

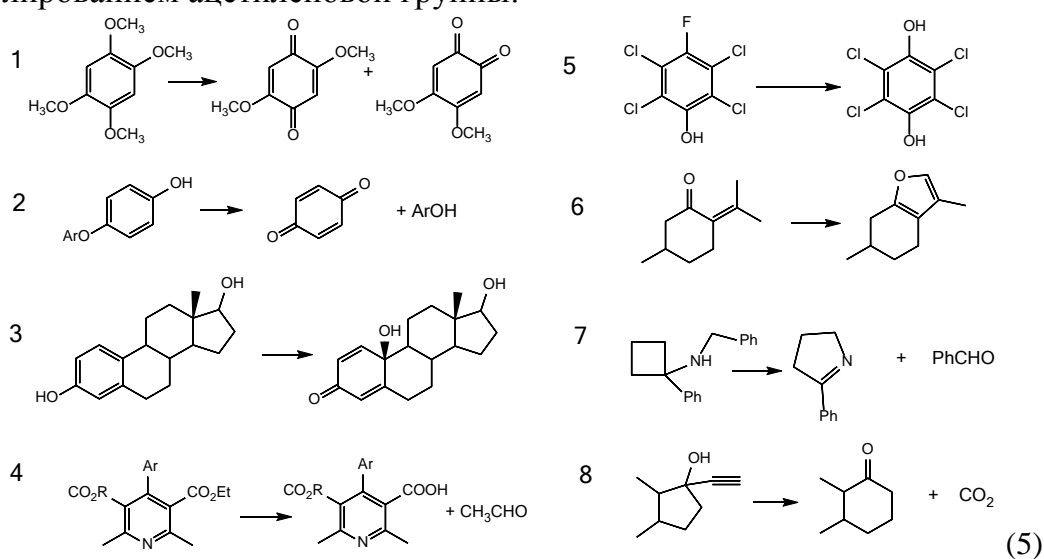






превратиться как в эпоксид, так и кетон с последующей изомеризацией в енольную форму (исключительно реактивное соединение), и наконец, может проалкилировать азот порфирина и инактивировать фермент.

Рассмотренные выше реакции – это «обычные» из катализируемых цитохромом P450, а есть еще и «необычные». А именно, ниже (реакции 5) представлены: (1) Одноэлектронное окисление арила с образованием хинонов; (2) Деарилирование, приводящее к образованию хинонов – активных радикал-образующих и алкилирующих агентов; (3) Деароматизация стероидов и образования акцептора Михаэля; (4) Окислительное расщепление сложных эфиров, с образованием кислоты и альдегида; (5) Окислительное дегалогенирование ароматических соединений; (6) Образование кольца; (7) Расширение кольца с отщеплением арила в виде альдегида; (8) Расширение кольца с декарбокслированием ацетиленовой группы:

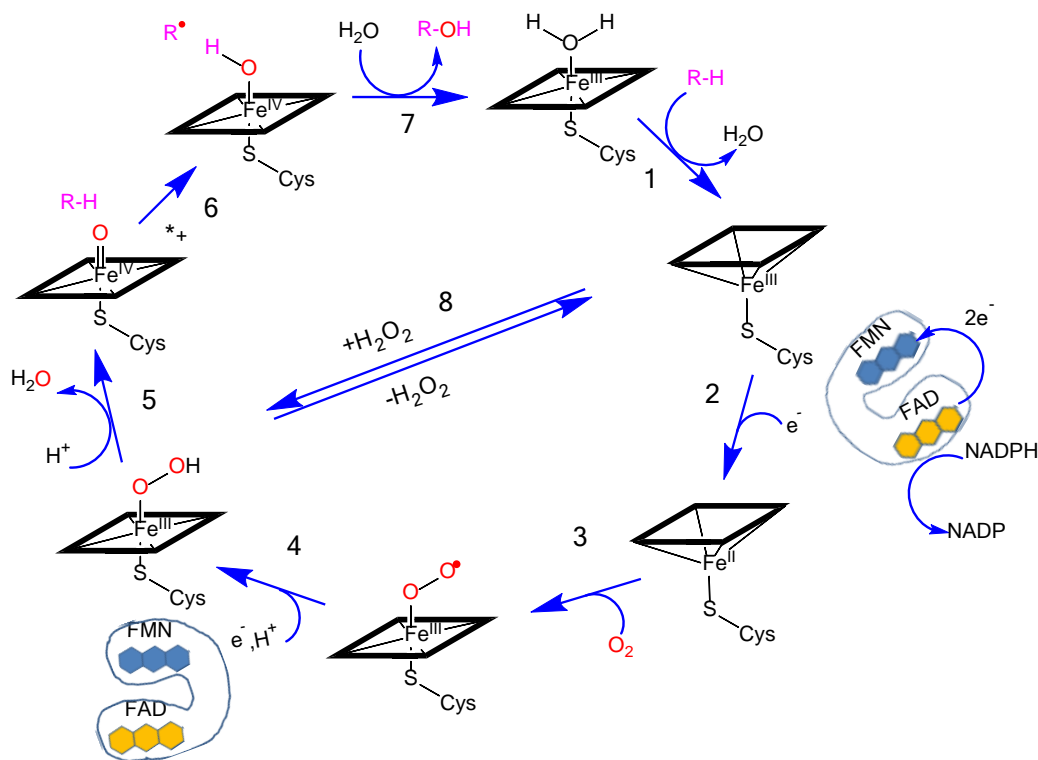


Даже такое краткое перечисление реакций, катализируемых цитохромом P450, указывает на всю сложность предсказаний состава продуктов окисления без проведения экспериментов на гепатоцитах, и как мы далее покажем, именно на гепатоцитах человека.

### 1.1.2. Механизм катализа цитохромом P450

Каталитический цикл цитохрома P450 представлен на Рис. 2.1.1. Цикл начинается со связывания субстрата (1), вытеснения молекулы воды, и перехода железа гема из 6-ти в 5-координационное состояние. На второй стадии происходит

перенос электрона на железо гема с фермента-партнера цитохрома P450 - NADPH-P450 оксидоредуктазы, которая поставляет восстановительные эквиваленты на железо гема P450, что приводит к незамедлительному связыванию и активации молекулярного кислорода (стадия 3).

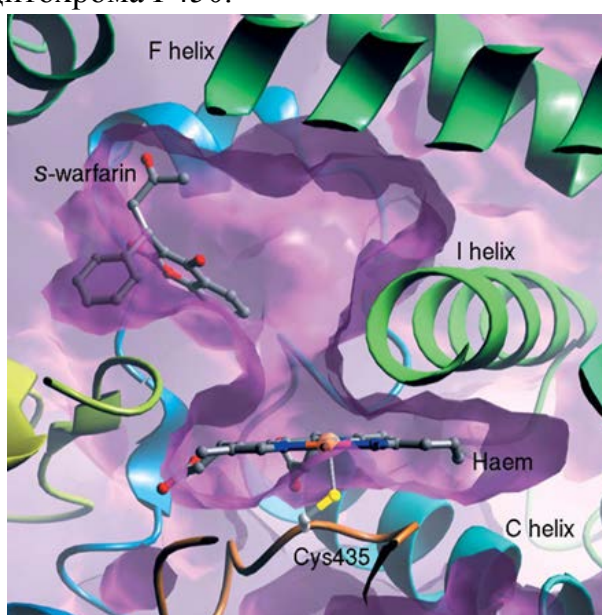


**Рис. 2.1.1.**Схема каталитического цикла цитохрома P450.

На стадии 4 происходит перенос второго электрона с NADPH-P450 оксидоредуктазы (либо цитохрома *b5*) и протонирование с образованием пероксо-формы. Пероксо-форма при отщеплении молекулы воды превращается в оксоферрил-гем и  $\pi$ -катион-радикал на порфириновом кольце - Соединение I - которое и обладает исключительно высоким окислительным потенциалом, обеспечивающим гидроксилирование атома углерода (стадия 5). Соединение I отрывает атом водорода от органической молекулы, образуя гидроксил-радикал на ферри-железе (стадия 6), который и гидроксилирует углеродный радикал на заключительной стадии цикла (7), при этом продукт гидроксилирования покидает активный центр, и молекула воды занимает 6-координационное положение в активном центре. Следует отметить, что стадии 2-4 цикла могут быть пропущены в

случае присутствия в системе пероксидов (особенно органических), которые напрямую окисляют ферри-форму в пероксо-форму железа - т.н. пероксидный шунт (8). Эта реакция в принципе может протекать и в обратную сторону, превращая P450 в генератор пероксида.

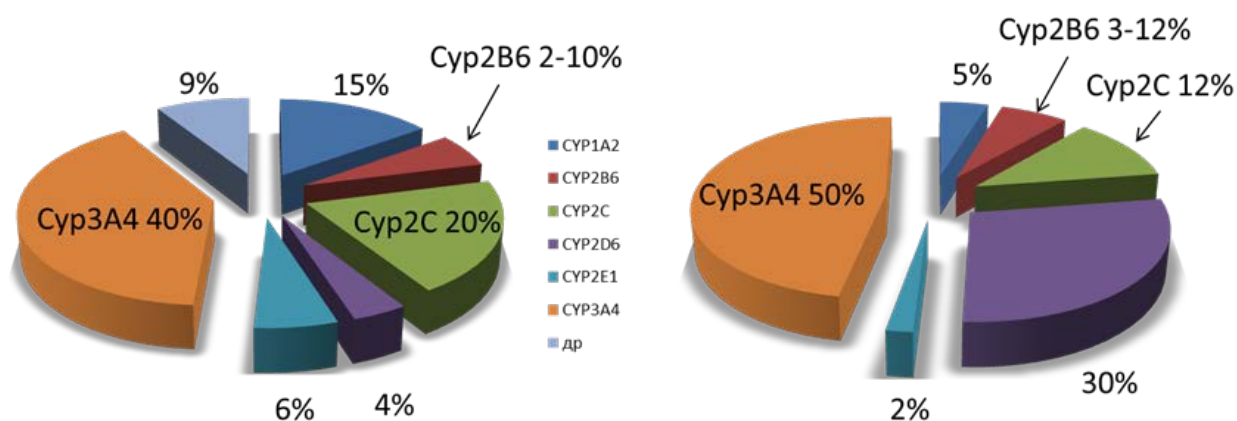
Механизм одноэлектронного переноса двух электронов в NADPH-P450 оксидоредуктазы на P450 являлся предметом детального изучения. На Рис. 2.1.1 схематично показано взаимодействие двух ферментов. Оба фермента являются мембранными ферментами и имеют мембранный «якорь» (не показан), экспонированная часть P450 представляет собой достаточно компактную глобулу, в то время как NADPH-P450 оксидоредуктаза имеет ярко выраженную двухдоменную структуру: один из доменов содержит FAD и центр связывания NADPH, а второй домен – FMN. Перенос восстановленных эквивалентов с FAD на FMN позволяет затем осуществлять одноэлектронный перенос с FMN на железо гема в цитохроме P450. Гем в цитохроме P450, в отличие от пероксидаз, связан с белком ковалентно через остаток цистеина, и перенос восстановительных эквивалентов со стороны NADPH-P450 оксидоредуктазы происходит именно с этой стороны плоскости гема, в то время как окисляемый субстрат располагается с другой стороны плоскости гема как показано на Рис.2.1.2 для комплекса варфарина с одной из изоформ цитохрома P450.



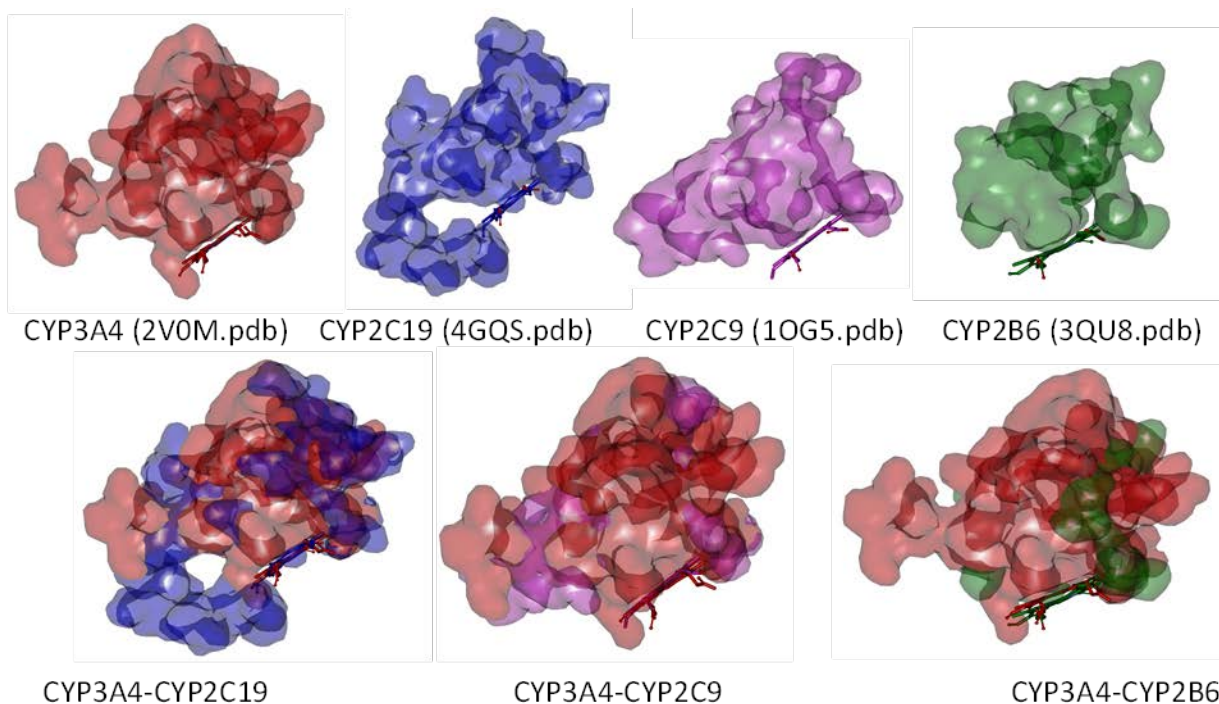
**Рис. 2.1.2.** Кристаллическая структура цитохрома P450 2C9 человека со связанным варфарином [9]. Субстрат-связывающая полость показана лиловым.

### 1.1.3. Многообразие и субстратная специфичность изоферментов P450

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/экспрессии и абсолютная активность изоформ у животных не похожи на данные параметры ферментов CYP450 печени человека [10]. Именно поэтому, химическая природа и профиль продуктов окисления ксенобиотиков у человека отличается от таковых у животных. Несмотря на то, что I стадия детоксикации ксенобиотика может протекать при различной комбинации 57 изоформ CYP450, подкласс ферментов, включающий 6 изоформ CYP450 (Рис. 2.1.3), метаболизирует 90 % всех лекарственных соединений [11,10]. Рациональных подходов к предсказанию субстратной специфичности изоферментов P450 не существует, за исключением структурных аналогий с известными субстратами и формального сравнения размеров полостей активного центра, которые накладывают стерео-ограничения на размер молекул субстрата. Как показано на Рис. 2.1.4, внутренняя полость активного центра сильно отличается по объему и конфигурации у разных изоформ.



**Рис. 2.1.3.** Относительная экспрессия изоформ цитохрома P450 (слева) и относительное количество субстратов, метаболизируемое ими (справа).



**Рис. 2.1.4.** Полости активных центров основных изоферментов P450 и сравнение их объемов с CYP3A4. Рисунок выполнен с помощью программы Discovery Studio 2.5 с использованием вышеуказанных pdb-файлов.

Как видно из Рис. 2.1.4, активный центр CYP3A4 самый объемный и поэтому может связать и метаболизировать большое количество субстратов, в основном это липофильные вещества с достаточно объемной структурой [12]. Типичными объемными субстратами являются иммуносупрессоры такие как циклоспорин А и такролимус, макролидные антибиотики (эритромицин), противоопухолевые препараты (таксол) [13]. CYP3A4 является самым важным из всех изоформ цитохромов P450, он наиболее высоко экспрессирован и метаболизирует около 30 % клинически используемых лекарственных средств из практически всех терапевтических категорий [14,15,16].

Цитохром CYP2C19 имеет довольно разветвленную полость связывания субстратов, хотя она и значительно меньше по объему, чем у CYP3A4. CYP2C19 метаболизирует различные классы лекарственных средств таких как антидепрессанты, барбитураты и ингибиторы протонных насосов. Данный фермент оказывает воздействие на 10-15 % используемых в настоящее время лекарственных препаратов.

Цитохром 2С9 имеет достаточно большую по объему и компактную субстрат-связывающую полость, хотя она и меньше, чем у СYP3A4. СYP2С9 метаболизирует многие классы препаратов, в том числе блокаторы ангиотензина II, антидепрессанты, а также нестероидные противовоспалительные средства, и уступает только СYP3A4 по количеству метаболизируемых лекарственных средств. СYP2С9 является одним из четырех членов семейства СYP2С, которые имеют >82 % гомологичности аминокислотной последовательности. Несмотря на высокую схожесть, субстратная специфичность этих изоформ пересекается мало [17].

СYP2В6 из рассмотренных изоформ имеет наименьший объем субстратной полости (Рис. 2.1.4). Долгое время экспрессия СYP2В6 в печени и его вклад в общий метаболизм ксенобиотиков считались незначительными (<1 % от всех изоформ цитохрома Р450). Однако в последние годы интерес к этой изоформе цитохрома Р450 заметно возрос. С помощью более специфичных антител было показано, что на СYP2В6 приходится от 2 % до 10% общего содержания цитохромов Р450 в печени [18]. Кроме того, оказалось, что только эта форма катализирует N-деметилирование антиэпилептического препарата мефобарбитала, и O-деметилирование и орто-гидроксилирование метоксихлора. Другими словами, данная форма катализирует «необычные» реакции.

Резюмируя все выше сказанное о реакциях, механизме катализа и различиях в изоферментном профиле цитохрома Р450 у человека и животных, перспективность изучения *in vitro* метаболизма кандидатов в лекарственные соединения с помощью технологии «печени-на-чипе», использующей клетки человека, очевидна. Принципиальным вопросом при разработке таких устройств является выбор клеточного материала. В следующем разделе мы рассмотрим свойства различных клеточных линий по сравнению с гепатоцитами человека.

## **2.2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕПАТОЦИТОВ И КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В «ПЕЧЕНИ-НА-ЧИПЕ»**

Печень состоит из гепатоцитов (60 %) и непаренхимных типов клеток. Очевидно, что использование целого органа или срезов ткани дает наиболее реалистичную

картину, но получение и, главное, долговременное поддержание таких систем является исключительно сложной задачей. С точки зрения разработки и использования экспериментальной платформы, имитирующей печень *in-vitro* с ее физиологическими свойствами и ответом на лекарства, специфические функции печени в ней должны воспроизводиться как минимум в течение 28 дней. Это очень сильное ограничение, когда речь идет о тканях или клетках, выделенных из печени человека. Поэтому в настоящее время разрабатываются альтернативные клеточные материалы для воспроизведения функции гепатоцитов в условиях органов «на-чипе», которые, в свою очередь, хорошо подходят для целей ВПС. В таблице 2 приведены основные характеристики различных культур клеток, которые предлагаются сегодня для целей органов «на-чипе».

### **2.2.1. Первичные гепатоциты**

Выделенные изначально из печени человека с помощью коллагеназы *гепатоциты* рассматривались как «золотой стандарт» *in-vitro* моделей печени и использовались в основном для тестирования лекарственных препаратов. Поддержание *in-vivo* фенотипа в выделенной линии гепатоцитов является сложной задачей, так как клетки в монослое претерпевают значительные изменения и теряют свои функции в течение 72 часов. Различные подходы используются для увеличения срока жизни функционирующих гепатоцитов. Наиболее многообещающим является подход, когда из гепатоцитов формируют сфероиды. Метод основан на подавлении способности гепатоцитов прикрепляться к стенке сосуда, в котором они находятся, таким образом, усиливается сила клеточной агрегации и формируется плавающий сфероид. Существуют различные подходы формирования сфероидов, включая механический с помощью ротационного шейкера или центрифужной пробирки, метода подвешенной капли или химии липкого слоя. Клеточные сфероиды сохраняют функции гепатоцитов - такие, как выделение альбумина, мочевины, трансферрина и желчи, - несколько недель. По данным последних протеомных исследований [19,20] печеночный метаболизм не сильно видоизменяется в 3-х мерных сфероидах, по сравнению с 2-мерным монослоем, в котором биотрансформационные активности и продуцирование



ферментов I и II фазы сохраняются только 2 недели. Сфероиды можно культивировать в среде в отсутствие сыворотки до 35 дней, а также возможно культивировать их вместе с непаренхимными клетками Купфера (звёздчатые эндотелиоциты) и желчеобразующими клетками печени [19,20]. Многоклеточные сфероиды получают в клеточной среде и позволяют создавать модели тканей *in vivo*, используя сами сфероиды в качестве элемента больших конструкций.

### 2.2.2. *Upcyte*® гепатоциты

*Upcyte*® процесс (*Upcyte technologies GmbH [www.upcyte.technologies.com](http://www.upcyte.technologies.com)*) основан на вирусной трансфекции генов, которые индуцируют и поддерживают клеточный рост до момента конfluence (полное покрытие монослоем). Человеческие *upcyte*® *гепатоциты* получают из первичных гепатоцитов человека трансфекцией, в результате которой экспрессия HPV E6 и E7 белков позволяет гепатоцитам делиться в ответ на воздействие онкостатином M (OCM), стимулируя рост иммортализованной линии клеток, не имеющих таких функций как производство альбумина, маркеров дифференцированной клетки, метаболизирующих ксенобиотики ферментов [21]. Стимуляция OCM вызывает деление клеток со временем удвоения от 33 до 49 часов. Удаление из среды OCM приводит к ингибированию пролиферации и включению дифференцировки клеток, позволяя в течение 4 дней получить высокофункциональную клеточную линию. Этот метод позволяет увеличить число делений гепатоцитов до 35 циклов и, как результат достигчь  $10^{15}$  (квадриллиона) клеток из каждого образца печени. Свыше 12 миллиардов *upcyte*® гепатоцитов могут быть получены делением одной первичной клетки человека, в то время как из целого органа можно выделить всего  $10^9$  клеток (миллиард) гепатоцитов. Гепатоциты второго поколения [20] демонстрируют фенотипические функции взрослых дифференцированных клеток, образуют поляризованные структуры с желчными канальцами. Использование *Upcyte*® технологии в перспективе может быть очень востребованным для ВПС при условии повышения сходства с первичными гепатоцитами - как видно из Табл. 2, *Upcyte*-гепатоциты экспрессируют далеко не все изоформы CYP450 и транспортеры, характерные для первичных гепатоцитах.

### 2.2.3. Линия *HepG2*

Использование популярной у исследователей печени линии клеток *HepG2*, происходящей из клеток печеночной карциномы 15-ти летнего мальчика европейского типа, для целей выявления токсичности ксенобиотиков проблематично. Вследствие сниженной активности цитохромов P450 по сравнению с первичными гепатоцитами, химически активные метаболиты имеют слабое влияние на клетки *HepG2* и слабо обнаруживают токсический эффект [22]. Клетки *HepG2* можно «заставить» экспрессировать P450(CYP) ферменты, используя метод трансфекции, чтобы приблизить их свойства к гепатоцитам, но даже это не решает проблемы - эта клеточная линия имеет минимальное сходство из всех рассмотренных с гепатоцитами печени (Таблица 2).

### 2.2.4. Линия *HepaRG*.

Наибольшие ожидания связаны сегодня с использованием линии клеток *HepaRG*. Первичные гепатоциты человека встречаются в большом разнообразии, но в ограниченном количестве. Клетки *HepaRG* помогают решить эти проблемы. Эта линия клеток была выделена из печени пациентки с гепатоаденомой, перенесшей гепатит С и страдающей циррозом [23]. Клеточная линия *HepaRG* не похожа на другие линии печени человека, так как эти клетки имеют гены для превращения многих ксенобиотиков, не уступая в этом первичным гепатоцитам человека при определенных условиях. Эти клетки экспрессируют ферменты, метаболизирующие различные соединения, ядерные рецепторы и производят специфические для зрелых гепатоцитов маркеры (альбумин, гаптоглобины и альдолазу В) на уровне первичных гепатоцитов [24]. При культивировании, клетки *HepaRG* могут дифференцироваться из стволовых клеток/предшественников в зрелые гепатоциты и примитивные желчеобразующие клетки, и затем сохранять стабильность функций в течение нескольких недель [25]. Естественно, что клетки *HepaRG* рассматривают в первую очередь для создания оптимальной и надежной модели для оценки гепатотоксичности лекарственных препаратов: органоподобная 3-х мерная структура из клеток *HepaRG*, полученная с помощью метода

неподвижной подвешенной капли, дала прекрасные результаты при *in vitro* оценке острой и хронической лекарственной гепатотоксичности [26].

При изучении транскрипционных профилей клеток *HepaRG* в дифференцированном и недифференцированном состоянии в сравнении с таковыми для *Upcyte* и *HepG2* клеток и с данными для первичных гепатоцитов и тканями печени человека [27] было обнаружено гораздо большее сходство линии *HepaRG* с первичными гепатоцитами и печенью человека, чем у линии *HepG2*, которая обычно используется для изучения физиологии печени. Данные транскриптомного анализа были подтверждены протеомным анализом для всех трех линий человеческих клеток печени (*HepG2*, *Upcyte* и *HepaRG*). При рассмотрении способности продуцировать метаболизирующие ксенобиотики ферменты и осуществлять транспорт белков, было отмечено снижение экспрессии цитохрома P450 на 90 % в *HepG2* и *Upcyte* линиях относительно первичных гепатоцитов, а в линии клеток *HepaRG* только на 60 % [28]. Экспрессия транспортеров лекарств также занижена по сравнению с гепатоцитами, но она достигает значительных показателей в клетках *HepaRG*. Сходство данных транскриптомного и протеомного анализа для клеток *HepaRG* и первичных гепатоцитов человека очень обнадеживает, так как дает возможность использовать клеточные линии *HepaRG* в изучении метаболизма ксенобиотиков, их гепатотоксичности, а также процесса дифференциации гепатоцитов.

### **2.2.5. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК)**

Еще один многообещающий в перспективе вариант клеточного материала представляют иПСК. Технология получения индуцированных плюрипотентных клеток была представлена учеными из Киотского Университета Японии в 2006 году [29]. Эти клетки могут быть получены перепрограммированием взрослых клеток, введением нескольких генов из эмбриональных стволовых клеток (с факторами Oct3/4, Sox2, c-Myc, and Klf4). Как и обычные стволовые клетки, иПСК образуют при дифференциации энтодерму, мезодерму и эктодерму. Эта технология оказала огромное влияние на развитие биомедицины и сделала важный вклад в изучение токсичности лекарств [30]. Использование иПСК позволяет

решить основную проблему, связанную с ограниченными ресурсами, вариабельностью и коротким временем жизни *in vitro* первичных гепатоцитов, к тому же эта технология помогает разрешить этические вопросы, связанные с использованием стволовых клеток из эмбрионов [5]. Более того, подход с использованием iPСК является ключом к персонализированной медицине, позволяя разработать панели с полиморфными вариациями для оценки лекарственных препаратов. Такие панели на iPСК могут стать хорошим дополнением в исследованиях как общей гепатотоксичности, так и для изучения специфической гепатотоксичности для определенной группы пациентов. Специфическая гепатотоксичность определяется несколькими факторами, такими как возраст, пол и воспалительный процесс, включая полиморфизм обмена веществ. Гепатоциты, полученные из iPСК, являются ценным инструментом для исследований индивидуальной токсичности и метаболизма.

Первый протокол получения гепатоцитов из iPСК был опубликован в 2010 году [31]. Несмотря на то, что гепатоциты из iPСК имели основные функции гепатоцитов (синтез альбумина, экспрессия цитохрома P450, накопление гликогена и др.), они имели сниженную жизнеспособность в сравнении с первичными гепатоцитами [32]. Другим лимитирующим фактором в использовании iPСК в исследованиях лекарственных препаратов является проблема их стандартизации: iPСК получают из различных типов клеток и от разных доноров, и они имеют отличающиеся эпигенетические профили, содержание микроРНК и уровень дифференциации клеток [33,34,35]. Все это приводит к плохо коррелирующим между собой результатам исследования токсичности у разных групп исследователей. Кроме того, эффективность дифференциации составляет только 60 % [36].

**Таблица 2.2.1. Сравнение источников клеток для использования в «печени-на-чипе»**

Типы источников	Первичные гепатоциты	UpCyte®	HepG2	Дифференцированные <i>HepaRG</i>	iPSC derived
Сходство с первичными гепатоцитами	Полное	Полное	Среднее (70-80%)	Высокое (81-92%)	Полное
Вариабельность	Высокая	Низкая	Высокая	Низкая	Высокая
Стандартизация	Невозможна	Возможна	Невозможна	Возможна	Невозможна
Использование в персонализированной медицине	Да	Нет	Нет	Нет	Да
Применение	Ограничено	Не ограничено	Ограничено	Не ограничено (относительно)	Не ограничено
Живучесть	10-14 дней	10 дней	7 дней	30 дней	2-4 дней
Количество делений	невозможна	40	Ограниченно	20	50
Функциональная стабильность	Да	Да	Нет	Да	n/a
Профили CYP	1A2, 2A6, 2C8, 2B6, 2C19, 2C8, 2D6, 2E1, 2C9, 3A4, 3A5, 3A7	1A2, 2C8, 2B6, 2C19, 2C9, 3A4	1A2, 2C8, 2B6, 2C9, 3A5, 3A7	1A2, 2A6, 2C8, 2B6, 2C19, 2C8, 2E1, 2D6, 2C9, 3A4, 3A5, 3A7	1A2, 2A6, 2C8, 2B6, 2C19, 2C8, 2E1, 2D6, 2C9, 3A4, 3A5, 3A7
Активность P450 (CYP)	Высокая	Низкая	Низкая	Средняя	Высокая
Транспортеры	ABCBA, ABCB7, ABCF3, MDR1, MRP1, MRP2, MRP3, ABCE1, ABCF1, ABCF2, GTR1	ABCF3, MDR1, MRP1, ABCE1, ABCF1, ABCF2, GTR1	ABCF3, MDR1, MRP1, ABCE1, ABCF1, ABCF2, GTR1	ABCBA, ABCB7, ABCF3, MDR1, MRP1, MRP2, MRP3, ABCE1, ABCF1, ABCF2, GTR1	ABCBA, ABCB7, ABCF3, MDR1, MRP1, MRP2, MRP3, ABCE1, ABCF1, ABCF2, GTR1
Трансфекция клеточных линий репортерами	Невозможна	Возможна	Возможна	Возможна с ограничениями	Возможна

Справиться с этими проблемами смогла компания Cellular Dynamics International, которая разработала производные iPSC *iCell® гепатоциты*, которые получают с 95 % чистотой и с первичными функциями гепатоцитов, но до сих пор

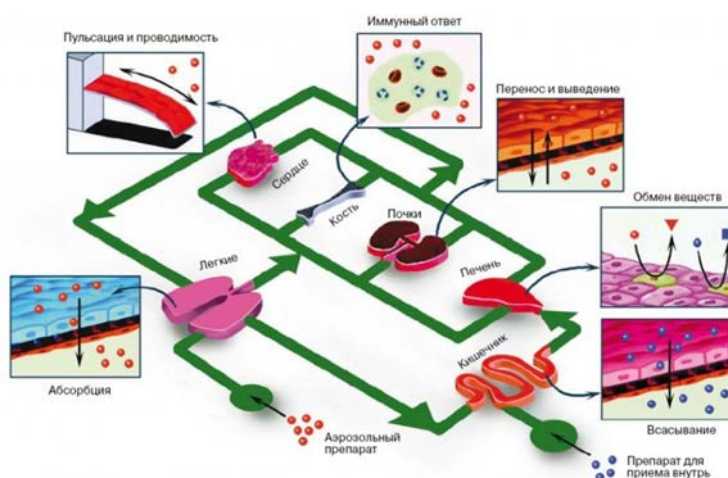
еще не проведено тщательное сравнение с первичными человеческими гепатоцитами и другими коммерческими клеточными линиями.

Разработка стандартной технологии «печень-на-чипе» во многом зависит от стандартизации образцов клеток по четырем параметрам: а) жизнеспособность и функциональная стабильность клеток являются главным требованием; б) секреторный потенциал характеризуется двумя важными маркерными реакциями - синтезом альбумина и выделением мочевины. Высокое выделение альбумина (~1–5 мкг/ч/10<sup>6</sup> клеток) не только соответствует сохранению синтетической функции, но и является индикатором общего метаболического здоровья клеток, мочевина играет такую же роль в общем метаболическом потенциале клеток. в) Ферментативная активность подгруппы ферментов (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, и CYP3A5), метаболизирующих 90 % всех лекарственных препаратов [10,11], должна соответствовать уровню *in vivo* и оставаться стабильной в течение времени работы чипа; г) профиль экспрессии и активность транспортеров должен также соответствовать уровню *in vivo*.

Как видно из Таблицы 2, только свойства клеток *Upcyte* и *HepaRG* отвечают требованиям стандартизации, причем линия *HepaRG* – наиболее близка по свойствам к первичным гепатоцитам при рассмотрении профилей экспрессии ферментов P450 и транспортеров. Для полной стандартизации свойств культуры клеток в «печени-на-чипе» идеальным было бы создание стандартной панели, состоящей из 100 различных субстратов различной категории: безопасные и эффективные, безопасные и неэффективные, небезопасные и эффективные, небезопасные и неэффективные препараты с известными *in vivo* метаболизмом и эффективностью. Такая панель субстратов будет востребована в дальнейшем для определения IC<sub>50</sub>/LD<sub>50</sub> (тест на острую токсичность) препаратов и функциональных маркеров (альбумина, мочевины и тест на хроническую токсичность).

### 2.3. МИКРОБИОРЕАКТОР ГОМУНКУЛУС – РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ

Разработкой технологии «человека на чипе» занимаются в Европе, США и России. Идея объединения клеточных моделей и других органов и тканей (в организме человека их около 220): для кожи, кишечника, эндотелия сосудов, мозга, лёгкого, - в одной системе, в одном миниатюрном организме, появилась сравнительно недавно. С точки зрения применения подобной системы для изучения токсичности препаратов, биочип должен позволять вводить препарат в циркуляцию через клетки кишечника, или клетки кожи, а затем попасть в клетки печени, где идет основной метаболизм, и продукты метаболизма уже затем попадают в органы-мишени. На Рис. 2.3.1 представлен пример схемы расположения клеток различных органов в биочипе, и различные входы в систему, имитирующие как пероральный, так и аэрозольный пути введения препаратов.



**Рис. 2.3.1.** Схема микроциркуляции и расположения «органов» в «человеке на чипе».

В России в компании «Биоклиникум» при поддержке субсидий в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» создан вариант технологии «человек-на-чипе» - микробиореактор (МБР) «Гомункулус». Установка состоит из двух частей – собственно биочипа, в ячейках которого культивируются клетки моделей органов (кишечника, печени, легких, сердца, мозга, кожи), и блока

управления, с помощью которого задаются все параметры омывающей культуральной среды. Устройство биочипа показано на Рис. 2.3.2. В конструкции учитывается скорость обновления жидкости и последовательность ее поступления к моделям органов, и кроме этого, к печени подводится свежая культуральная жидкость (имитация печеночной артерии). В чипе предусмотрены и отсеки для установки биосенсоров — электрохимических и оптических датчиков для анализа гомеостаза среды, чтобы поддерживать концентрации питательных веществ и метаболитов в физиологических пределах. Есть зона, где осуществляется обогащение среды  $\text{CO}_2$ : через два близко идущих капилляра под воздействием диффузии через слой полимера углекислый газ поступает в культуральную среду. Это позволяет обходиться без  $\text{CO}_2$ -инкубатора и поддерживать pH среды. Система термостатирования помогает поддерживать постоянную температуру  $37^\circ\text{C}$  или любую другую, если необходимо имитировать тепловой стресс.



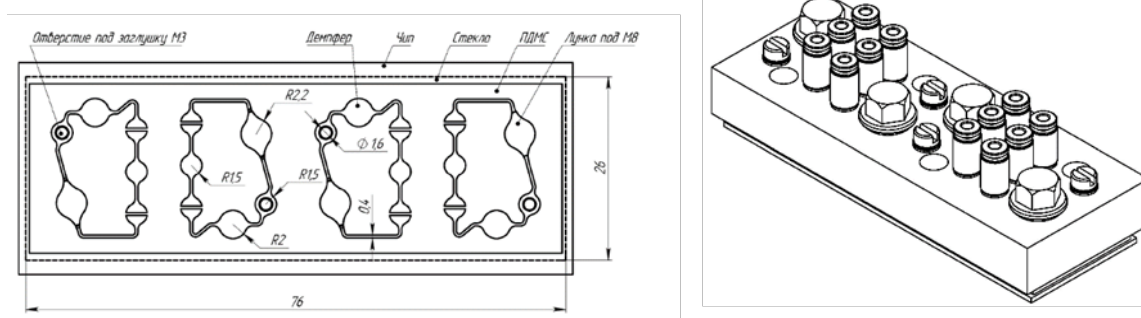
**Рис. 2.3.2.** Схема устройства биочипа «Гомункулус» (слева) и его внешний вид (справа)

В рамках работ по соглашению о предоставлении субсидий от 5 июня 2014 г. № 14.579.21.0018 в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» была разработана методология доклинических исследований гепатотоксичности и биотрансформации лекарственных средств *in vitro*, основанная на гистотипической трехмерной клеточной модели печени человека, культивируемой в условиях микроциркуляции, позволяющая получить достоверные данные о безопасности лекарственного средства для здоровья



человека и исследовать метаболизм ксенобиотиков в краткосрочных лабораторных тестах без использования лабораторных животных, а также необходимое для ее реализации специализированное микрофлюидное устройство (МФУ), обеспечивающее проведение стандартизованных однотипных одномоментных независимых исследований, количество которых достаточно для получения статистически достоверных результатов.

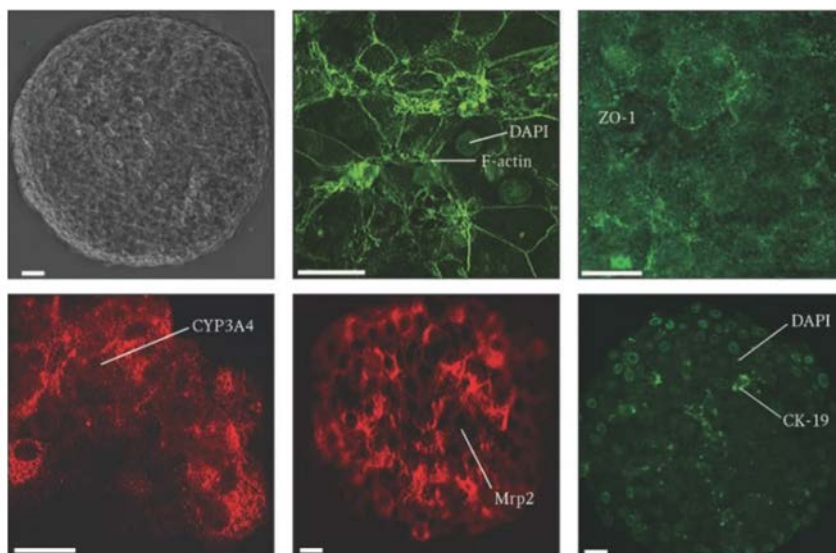
Данное устройство позволяет проводить культивирование не менее 4-х однотипных клеточных моделей печени человека в условиях независимых замкнутых контуров с циркулирующей питательной средой. Каждый замкнутый контур обладает одной клеточной ячейкой для культивирования клеток. Диапазон расходов питательной среды в МФУ составляет от 0.2 мкл/мин до 76 мкл/мин. Каждый замкнутый контур МФУ имеет демпфирующий элемент – гибкую эластичную мембрану, которая обеспечивает плавное изменение давления в клеточной ячейке. В процессе работы насоса МФУ происходит циклическое изменение давления в клеточной ячейке. Введение препаратов в этом случае является имитацией внутривенного введения. Схема и внешний вид устройства представлены на Рис. 2.3.3.



**Рис. 2.3.3.** Схематичное изображение устройства для культивирования клеточной модели печени человека с замкнутым контуром потока питательной среды

Перед помещением культуры клеток в биочип, клетки *HepaRG* культивируют в планшетах, и затем индуцируют дифференцирование клеток, об успешности которого судят как по внешним признакам, так и по биохимическим маркерам – *HepaRG*-гепатоциты начинают синтезировать альбумины и цитохромы. Растущие на пористой полиэтиленовой мембране клетки сами создают себе

дополнительную «подложку» - матрикс из коллагена, и самоорганизуются в сфероиды. На Рис. 2.3.4 [37] показаны образующиеся сфероиды и их иммунофлуоресцентное окрашивание, подтверждающее сильное межклеточное взаимодействие внутри сфероида.



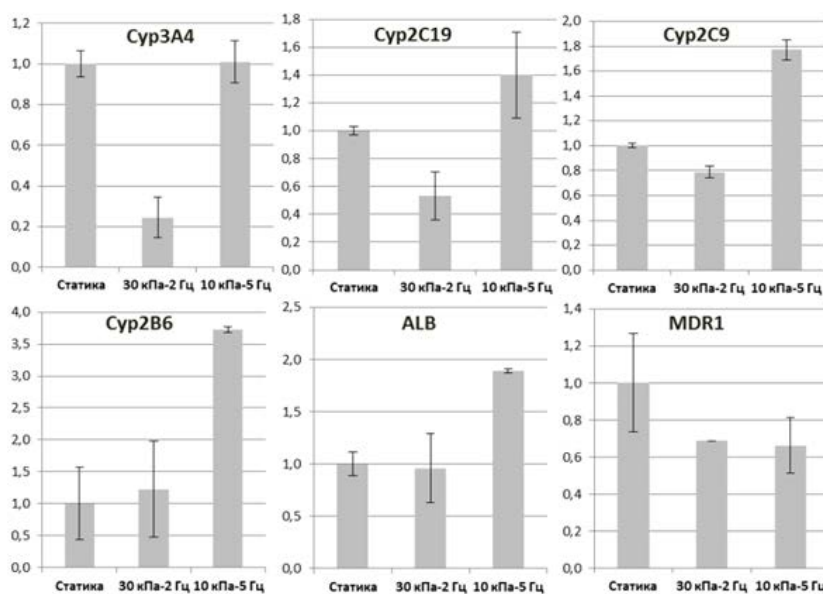
**Рис. 2.3.4.** Иммунофлуоресцентный анализ наличия основного цитохрома печени (Сур3А4), маркера желчных канальцев (транспортера MRP2), маркера холангиоцитов (СК19), маркеров плотных контактов (F-актина и ZO-1) в сфероидах *HepaRG* [37].

С технической точки зрения, в замкнутой системе биочипа создаются условия, наиболее близко имитирующие «жизнь» одной сотысячной человека — как по количеству клеток, так и по количеству омывающей их жидкости. Печень — плотно пронизанный сосудами орган. Через 100 г печени проходит ~25-30 % общего объема крови (примерно 100 мл крови) или ~1,5 л через 1,5 кг ткани печени взрослого человека каждую минуту. Скорость движения жидкости рассчитывается таким образом, чтобы соответствовать таковой в капиллярах человеческого организма. Поскольку сердце создает пульсацию, приводящую к циклам расширения-сжатия для всех клеток организма, то имитация этого процесса механической деформации в «Гомункулусе» достигается за счет работы клапанов насосов, нагнетающих жидкость в биочип.

Была проведена оптимизация режимов микроциркуляции и подобран режим, при котором не превышаются физиологически допустимые значения механических воздействий на клетки линии *HepaRG* в составе сфероидов и поддерживается, как

экспрессия функциональных генов печени, к которым относятся изоформы цитохрома P450, так и секреция альбумина. Сфероиды культивировали в МБР при различных режимах работы насоса: при давлении на мембранах насоса  $\pm 30$  кПа и частоте переключения клапанов 2 Гц, и при  $\pm 10$  кПа и 5 Гц [37]. Анализ экспрессии основных изоформ цитохрома P450, альбумина, и маркера желчных канальцев (Рис. 2.3.5) позволил выбрать второй режим как наиболее оптимальный.

Таким образом, на фирме «Биоклиникум» была создана «печень-на-чипе» на основе использования сфероидов дифференцированных клеток линии *HepaRG* и оптимизирован режим ее работы для дальнейшей стадии создания панели субстрат-ингибитор для использования этой панели в новых исследованиях по изучению гепатотоксичности разнообразных кандидатов в лекарственные препараты.



**Рис. 2.3.5.** Экспрессия генов цитохромов 3А4 (*Cyp3A4*), 2С9 (*Cyp2C9*), 2С19 (*Cyp2C19*), 2В6 (*CYP2B6*), альбумина (*ALB*), транспортера желчных канальцев (*MDR1*) в клетках линии *HepaRG* в составе сфероидов, культивируемых в МБР при разных режимах работы насосов.

## 2.4. НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ В РАЗРАБОТКЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Современный подход 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, контролирующих эпигенетические изменения. Клеточные репортеры идеально подходят для целей ВПС в поиске активаторов или ингибиторов транскрипционных факторов.

Существует несколько типов клеточных репортеров: (1) Классические коммерчески доступные **промоторные репортеры** основаны на принципе клонирования гена флуоресцентного или люминесцентного белка под контролем интересующего промотора, активируемого определенным транскрипционным фактором (если таковой известен). Такие репортеры последнее время используются для мониторинга экспрессии генов цитохромов, чтобы подтвердить профиль P450 в линиях *HepG2* и *HepaRG* [38]. В целом, промоторные репортеры могут быть использованы для целей наблюдения за индукцией любого интересующего белка. Проблема такого рода репортеров состоит в сравнительно низком и запаздывающем сигнале. Запаздывание возникает из-за времени, необходимого для активации промотора и следующих за этим процессов транскрипции и трансляции. (2) **Фьюжн-репортеры** обеспечивают суперэкспрессию флуоресцентных или люминесцентных белков, пришитых к интересующему белку, под контролем конститутивного промотора, например,  $p_{CMV}$ . Такие репортеры позволяют следить за судьбой интересующего белка в клетке, так как фьюжн-белок накапливается в клетке немедленно (нет необходимости в активации промотора). Проблема, которая возникает с такого рода репортерами, состоит в биологической активности фьюжн-белка, которая может специфически влиять на внутриклеточное равновесие. Суперэкспрессия полноразмерного пришитого к репортеру транскрипционного фактора будет запускать экспрессию генов белков-мишеней и изменять транскриптомный и протеомный профили, что может сильно исказить биологическую эффективность и токсичность изучаемого препарата. (3) **Новый тип репортеров**, подходящий для ВПС и микрофлюидных систем, был разработан для транскрипционных факторов, регулируемых методом убиквитинирования и

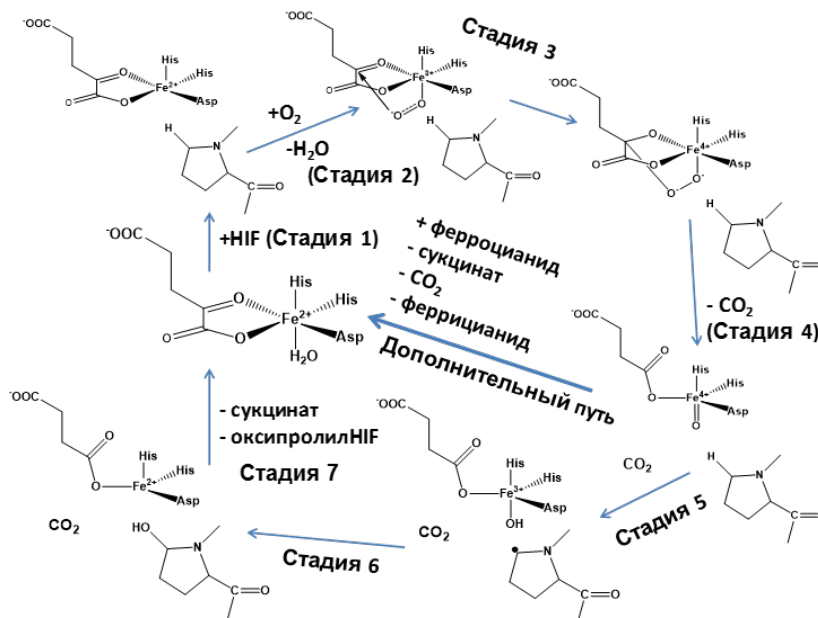
протеосомной деградации. Фьюжн-белок включает в себя только меченый люциферазой (например) домен транскрипционного фактора, распознаваемый системой убиквитинирования. Домен распознавания не имеет сродства к ДНК и, следовательно, не запускает программу, регулирующую конкретным транскрипционным фактором. Суперэкспрессия домена распознавания может немного стабилизировать эндогенный транскрипционный фактор, но этот эффект обычно незначительный.

Известно большое количество транскрипционных факторов, регулируемых убиквитинированием и протеосомной деградацией. В данном обзоре мы ограничимся рассмотрением лишь одного из них, поскольку данная работа посвящена исследованию гепатотоксичности потенциальных активаторов транскрипционного фактора, индуцируемого гипоксией (HIF - hypoxia inducible factor) с помощью разработанной панели субстратов-ингибиторов «печени-на-чипе».

#### **2.4.1. Регуляция HIF - фактора, индуцируемого гипоксией**

HIF – основной регулятор клеточного ответа на гипоксию и активирует более 100 генов, вовлеченных в потребление и метаболизм глюкозы, контроль внеклеточного значения pH, ангиогенез, эритропоэз, митогенез и апоптоз. HIF1 состоит из двух субъединиц, уровни HIF1- $\alpha$  регулируются гидроксигированием, при этом основным регулятором стабильности HIF1- $\alpha$  является гидроксигирование остатков пролина Pro564 и/или Pro402 в HIF1- $\alpha$ , что является необходимым условием для взаимодействия с опухолевым супрессором белком фон Хиппеля-Линдау (VHL). В результате такого взаимодействия образуется комплекс, который обеспечивает дальнейшее убиквитинирование HIF $\alpha$  и последующую протеасомную деградацию [39]. Гидроксигирование фактора HIF катализируется  $\alpha$ -кетоглутарат ( $\alpha$ КГ) зависимой негеминовой диоксигеназой, так называемой HIF пролилгидроксилазой (PHD), для которой известны три изоформы. Повышенная экспрессия транскрипционного фактора HIF свидетельствует о кислородном голодании и о том, что метаболизм проходит по гликолитическому пути (эффект Варбурга).

Механизм реакции, катализируемой HIF PND, включает активацию молекулярного кислорода, превращение  $\alpha$ КГ в сукцинат и двуокись углерода, и гидрокислирование основного субстрата HIF1 $\alpha$  субъединицы как показано на Рис. 2.4.1.



**Рис. 2.4.1.** Схема каталитического механизма HIF пролилгидроксилазы

Механизм предполагает связывание железа в активном центре, затем координацию железом  $\alpha$ КГ через С-1 карбоксильную группу и кислород кетонной группы, а затем связывание HIF пептида (белкового субстрата), которое приводит к вытеснению молекулы воды из 6-го положения координационной сферы железа (Стадия 1). Освобождение координационной сферы для связывания молекулы кислорода приводит к немедленной активации последнего. А именно, атом кислорода, некоординированный железом, атакует углеродный атом кетонной группы (Стадия 2) образуя бициклический комплекс Fe(IV)-пероксигемикеталь (Стадия 3), в котором декарбоксилирование происходит одновременно с образованием оксоферрилла (Стадия 4) [40]. Последний гидрокислирует пролин субстрата через образование промежуточного радикального соединения (Стадия 5): оксоферрил атакует пролин, забирая атом водорода, а затем возвращает гидроксирадикал (Стадия 6). Следует отметить принципиальное сходство каталитических механизмов двух рассмотренных в данном обзоре монооксигеназ – HIF

пролилгидроксилазы и цитохрома P450, а именно: (а) активация фермента происходит при переходе железа из 6-ти в 5-ти координационное состояние при связывании специфического субстрата, и (б) высокий потенциал окисленной формы фермента позволяет расщеплять связь углерод-водород субстрата с образованием углеродного радикала, который потом гидроксيليруется. Различие ферментов состоит в их специфичности, поскольку субстратами HIF пролилгидроксилазы являются только некоторые определенные белки, в то время как P450 окисляет практически любые низкомолекулярные органические соединения.

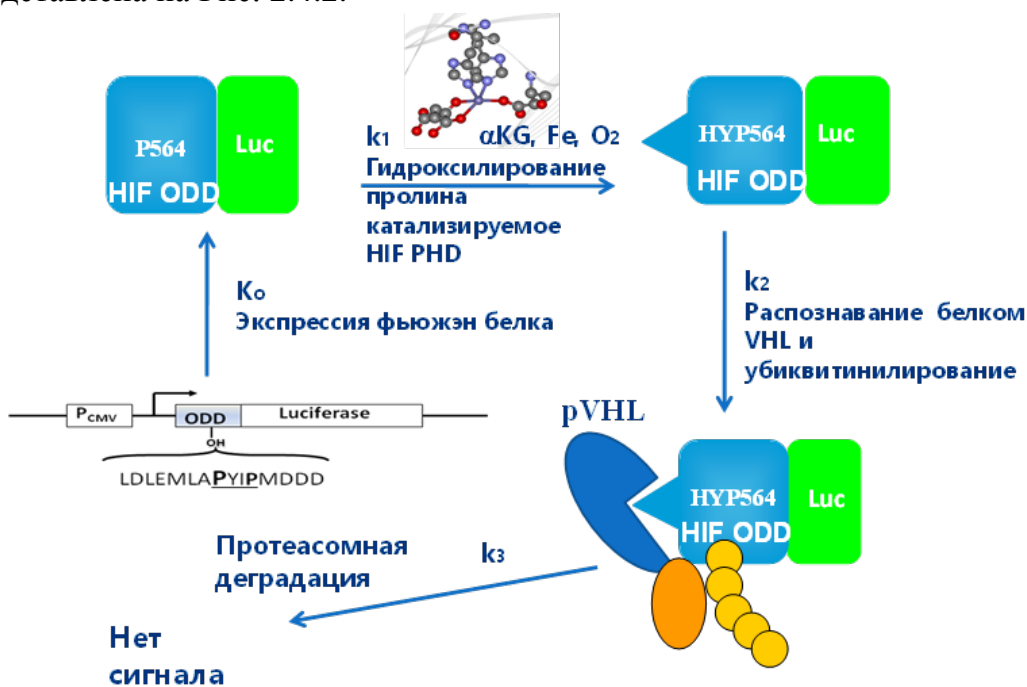
#### **2.4.2. Поиск возможных ингибиторов HIF пролилгидроксилазы**

HIF PHD у человека представлены тремя изоформами. Каталитические домены всех изоформ высокоомологичны, и это усложняет проблему создания изоформ-специфических ингибиторов фермента [41], хотя такая задача становится актуальной в результате выявления новых различных белковых субстратов, а соответственно и физиологической роли, у различных изоформ фермента.

Поскольку успешный пан-ингибитор (ингибитор всех трех изоформ) HIF PHD может вытеснить рекомбинантный эритропоэтин с рынка, разработкой пан-ингибиторов фермента занимались в последнее десятилетие все ведущие фармацевтические компании, такие как Amgen [42], Merck, Johnson & Johnson [43,44,45,46], Procter & Gamble, GlaxoSmithKline, Fibrogen, Bayer (США), используя рекомбинантные формы HIF пролилгидроксилазы 2 (PHD2), экспрессируемые в растворимой форме в *E.coli* [47] либо бакуловиром. Запатентованные структуры детально рассмотрены в обзоре [48]. Несколько препаратов находятся в настоящее время в стадии клинических испытаний. Следует отметить, что во всех случаях были отобраны препараты, конкурирующие с кетоглутаратом, что отражает проблемы использования рекомбинантного фермента (нестабильность, невозможность варьировать белковый субстрат в широком диапазоне концентраций, сложная методика регистрации активности). В результате заявленные наномолярные константы ингибирования при переходе на биологические системы тестирования оказались на несколько порядков выше,

поскольку концентрация кетоглутарата в клетках составляет 1-2 мМ, что и увеличивает кажущиеся константы ингибирования на многие порядки [49]. И таким образом реально действующие дозы препаратов для активации эритропоэтина и повышения уровня гемоглобина составляют порядка 20 мг на кг веса в клинических испытаниях [50].

Фьюжн-репортер кислород-чувствительного домена HIF1, меченого люциферазой светляков, - HIF1 ODD-luc (oxygen degradable domain-luciferase) был разработан исследователями [51], а его вариант, меткой в котором служит люцифераза *Renilla*, недавно стал коммерчески доступным (Promega, США). Лишь в одной работе [52] был проведен первичный ВПС на клеточных линиях, экспрессирующих фьюжн-репортер. Схема действия HIF1 ODD-luc репортера представлена на Рис. 2.4.2.



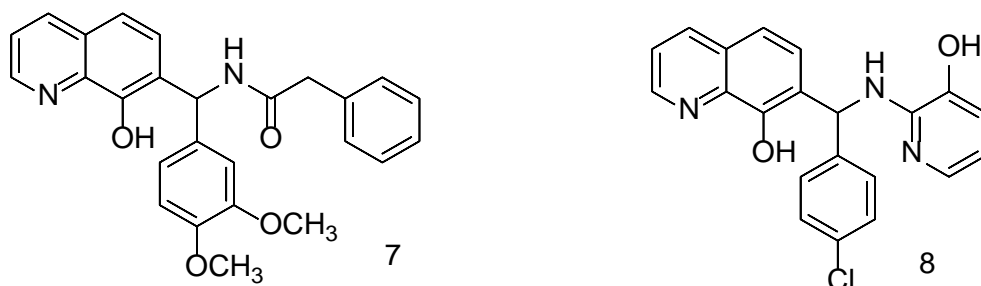
**Рис.2.4.2.** Схема действия HIF1 ODD-luc репортера. P564 – остаток пролина, гидроксилируемый ферментом, и HYP564 – оксипролин, распознаваемый белком вон Хиппеля-Линдау (VHL).

Конструкция обеспечивает синтез фьюжн-белка, состоящего из кислород-чувствительного домена HIF и люциферазы светляков. HIF пролилгидроксилаза катализирует окисление пролина в означенном домене, что приводит к его распознаванию убиквитинлигазой. Домен убиквитинилируется и весь фьюжн-



белок подвергается протеасомной деградации, включая люциферазу. Базовая линия люминесценции репортера соответствует стационарной концентрации фьюжн-белка, которая обеспечивает равенство скоростей его наработки и деградации. Скорость-лимитирующей стадией всего процесса является реакция, катализируемая NIF пролилгидроксилазой, и поэтому отбор ингибиторов фермента можно легко проводить по возгоранию люминесценции вследствие накопления фьюжн-белка. Принципиальное преимущество ингибиторов фермента, отобранных в данной системе, состоит в том, что они конкурируют с NIF фьюжн-белком за фермент, поскольку фьюжн нарабатывается непрерывно, и все это происходит при насыщающей внутриклеточной концентрации  $\alpha$ КГ (2 мМ).

Были отобраны два лучших скаффолда 8-оксихинолина, содержащих разветвленный заместитель в 7-ом положении (**Рис. 2.4.3**) [52].



**Рис. 2.4.3.** Молекулы-кандидаты, отобранные как активаторы NIF в [52]

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 [53]. Выбор одного из скаффолдов для дальнейшей оптимизации требует, как прямых доказательств ингибиторных свойства данных соединений на гомогенном ферменте, так и оценки их возможной гепатотоксичности. Задачей данной работы являлось подтверждение ингибиторной активности обоих соединений на препарате гомогенного фермента

PHD, и тестирование обеих структур в системах *in vitro* с имитацией микроциркуляции («печени-на-чипе») для доклинической оценки биотрансформации и гепатотоксичности лекарственных средств (установления продуктов первичного окисления и изоформ цитохрома P450, участвующих в реакции окисления).

### 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

#### 3.1. МАТЕРИАЛЫ

В работе были использованы сульфат железа (II), ферроцианид калия, уксусная кислота, фосфат калия однозамещенный, фосфат калия двухзамещенный, соляная кислота, додецилсульфат натрия (SDS), хлорид натрия, ацетат натрия, гидроокись натрия, восстановленный глутатион, дитиотрейтол, изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозид, мочеви́на (ultra pure), о-фенилендиамин, имидазол,  $\alpha$ -кетоглутаровая кислота, каталаза, 2-фенил-2-(1-пиперидинил)пропан, (+)-N-3-бензил-нирванол, кетоконназол и фармацевтические стандарты бупропиона, толбутамида, омепразола и тестостерона фирмы Sigma-Aldrich (США), трисаминометилметан (Tris) (ultra pure), глицерин (ultra pure), бактотриптон, дрожжевой экстракт фирмы ICN Biomedicals Inc. (США), акриламид, бис-акриламид фирмы Lancaster (Англия), глицин фирмы Merck (Германия); 6-гидроксипропион, 4-гидрокситолбута́мид, 5-гидроксиомепразол, 6- $\beta$ -тестостерон, варфарин и дазатиниб фирмы Cayman Chemical (Анн Арбор, Мичиган, США); 7-гидроксиварфарин и 4'-гидроксидазатиниб фирмы Santa Cruz Biotechnology (Даллас, Техас, США). Соединения 7 и 8 – 8-оксихинолины с разветвленным заместителем в положении 7 – приобретены у Химрар (Москва, Россия).

#### 3.2. МЕТОДЫ

##### 3.2.1. Пептидные и белковые субстраты:

В качестве субстрата фермента использовали 19-мерный HIF пептид H2N-DLDLEMLAPYIPMDDDFQL-OH (чистота > 90 %), заказанный в New England Peptides, LLC (Массачусетс, США), либо GST-HIF1 ODD фьюжн белок, экспрессируемый в растворимой форме в *E.coli* с использованием плазмиды pGST/HIF1 $\alpha$ (429-608), полученной клонированием по сайту рестрикции BamHI соответствующей последовательности HIF1 $\alpha$  в плазмиду pGEX-5X-1 с селекцией по ампициллину (Amersham Pharmacia Biotech, Великобритания). Между GST и

HIF ODD имеется сайт узнавания фактора Ха, IGGRG [54]. Плазмида была любезно предоставлена проф. Г. Семенца (Гарвардский университет). GST-HIF1 ODD белок получали в растворимой форме при экспрессии в *E.coli* и выделяли с помощью гранулированной глутатион-сефарозы (GE Healthcare), добавляемой непосредственно к супернатанту после разрушения биомассы, отделению носителя, и элюированию белка 20 мМ раствором глутатиона, с последующим обессоливанием.

### 3.2.2. Клонирование изоформ HIF пролилгидроксилазы

Клонирование каталитических доменов HIF пролилгидроксилазы человека из кДНК библиотеки проводили в плазмиду pET-47b (Novagen, США) (Рис. 3.2.1). Три изоформы фермента были клонированы в двух вариантах (без гистидинового тага и с ним) и получены 6 различных конструкций. Сайты клонирования для каждой из изоформ фермента, нумерация аминокислотных остатков клонированных доменов, и последовательность праймеров, использованных для клонирования, показаны в Таблице 3.2.1.

**Таблица 3.2.1.** Список конструкций для экспрессии трех изоформ каталитических доменов пролил гидроксилазы человека и их композиция.

Изо-форма	Сайты рЕТ47b	Последовательность праймеров для клонирования	Описание вставки
1	Nde1 Pac1	5'-ATTAACCTCTGCGCATATGCGCCTGGCCCTG-3' 5'-GCCCGCTAGTTAATTAAGTGGGCGTAGGC-3'	PHD1 (175-407)
His-1	Kpn1 Pac1	5'-ATATACTCTGCGCGGTACCGCCTGGCCCTG-3' 5'-GCCCGCTAGTTAATTAAGTGGGCGTAGGC-3'	His-tag PHD1 (175-407)
2	Nde1/ Ase1 Pac1	5'-ACCTGCGGCCATTAATGCAGACGAAG-3' 5'-CGCGCGCCGATTAATTAAGAAGGTTTATTGAGT-3'	PHD2 (184-426)
His-2	Kpn1 Pac1	5'-CTACAGCCCAGGTACCAGACGAAGC-3' 5'-CGCGCGCCGATTAATTAAGAAGGTTTATTGAGT-3'	His-tag PHD2 (184-426)
3	Nde1 Pac1	5'-TAAGCTTACCATGCATATGCCCCG-3' 5'-GCCCTCTAGTTAATTAATCTTCAGTGAGG-3'	PHD3
His-3	Kpn1 Pac1	5'-GTTAAGCTTACCAGGTACCAGCCCCTGGGACAC-3' 5'-GCCCTCTAGTTAATTAATCTTCAGTGAGG-3'	His-tag PHD3



индукции является 2-2,5 часа. Для увеличения содержания растворимой фракции фермента PND2 культивирование проводили при 30°C. Биомассу собирали центрифугированием, промывали раствором 50 мМ Трис-НСl буфера, рН 7,0, содержащим 5 мМ DTT, и разрушали ультразвуком или на X-прессе. Биомассу собирали центрифугированием, промывали раствором 50 мМ Трис-НСl буфера, рН 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. Растворимую фракцию отделяли центрифугированием. Супернатант использовали для выделения растворимого фермента с помощью хроматографии на Ni<sup>2+</sup>-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, рН 7,0, содержащем 0,3 М NaCl. Выход составлял активного гомогенного фермента от 0,05 до 0,25 мг с 1 л культуральной среды.

Осадок промывали, и солюбилизировали в 6 М мочеvine, с 10 мМ DTT. Солюбилизованную порцию отделяли от нерастворимого осадка центрифугированием. Далее солюбилизированный фермент разбавляли, добавляя по каплям в среду для рефолдинга до конечной концентрации 1,5 М мочеvины (50 мМ Na-фосфатный буфер, рН 7,8, 0,3 М NaCl, 10% глицерина и 4 мМ DTT). Рефолдинг проводили в течени 16 часов при 4°C. По окончании инкубации фермент разбавляли водой в 5 раз и добавляли Ni<sup>2+</sup>-NTA носитель (концентрация DTT выше 1 мМ влияет на сорбционную способность носителя), носитель отделяли фильтрацией, промывали, и элюировали активный фермент 0,2 М имидазолом. Чистоту препаратов фермента на каждой стадии выделения и очистки контролировали с помощью аналитического электрофореза в 14% полиакриламидном геле в присутствии SDS. Белок определяли методом Бредфорда. Для предотвращения выпадения фермента в осадок, фермент очищали гель-фильтрацией от имидазола, используя буфер с высокой молярностью (минимум 0,2 М). Фермент можно концентрировать до 8 мг/мл без выпадения осадка в 50 мМ Na-фосфатном буфере, рН 7,0, содержащем 0,3 М NaCl и 1 мМ

DTT. Непосредственно перед измерением активности по ферроцианиду удаляли DTT гель-фильтрацией.

### 3.2.4. Измерение каталитической активности

1. Методика измерения ферментативной активности пролилгидроксилазы по потреблению  $\alpha$ КГ [55] основана на измерении концентрации потребляемого  $\alpha$ КГ с помощью его высокотемпературной химической модификации в присутствии *орто*-фенилендиамина с образованием флуоресцентного аддукта. Метод измерения активности заключался в смешивании 1 мМ DTT, 0,6 мг/мл каталазы, 0,5 мМ  $\alpha$ КГ (при более высоких концентрациях аддукта его флуоресценция начинает отклоняться от линейной зависимости), пептидного субстрата, в 44 мкл 50 мМ HEPES-HCl буфера, pH 7,5, и нагревании при 37°C в течение 5 мин. Отдельно при комнатной температуре в течение 3 мин инкубирули смесь фермента с сульфатом железа (II) (последнее готовится в виде 500 мМ раствора в 20 мМ водном растворе HCl). Реакцию запускали добавлением 6 мкл смеси фермента (10 мг/мл) с сульфатом железа (в молярном соотношении 1:1) к раствору субстратов в буфере. Реакцию останавливали через 15 мин (приблизительно соответствует окончанию линейного участка кинетической кривой падения концентрации  $\alpha$ КГ) с помощью 100 мкл 0,5 М HCl; затем добавляют 50 мкл 10 мг/мл *о*-фенилендиамина в 0,5 М HCl и проводят дериватизацию в течение 10 мин при 95°C. Далее отбирали 50 мкл смеси, переносили в черные микропланшеты для измерения интенсивности флуоресценции. Раствор нейтрализули добавлением 30 мкл 1,25 М NaOH, и измеряли флуоресценцию на 420 нм при возбуждении на 340 нм. За единицу измерения активности фермента принимали количество потребленного  $\alpha$ КГ за 1 мин на 1 мг белка активного фермента.

2. Непрерывное измерение активности фермента по окислению ферроцианида проводили сразу после обессоливания препарата фермента с целью удаления DTT. Реакционная смесь общим объемом 250 мкл содержала 50 мкл раствора PHD2 (1 мг/мл) из телец включения, 50 мкМ HIF-пептида или 30 мкМ GST-HIF, 100 мкМ  $\alpha$ КГ, 8 мкМ FeSO<sub>4</sub>, 1 мМ K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>. Увеличение поглощения на 420 нм (коэффициент молярного поглощения 1,04 мМ<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>) соответствовало скорости

окисления ферроцианида, максимальный наклон принимался за меру каталитической активности.

### **3.2.5. Ингибирование фермента препаратами оксихинолинов**

Использовали методику 1 (по потреблению  $\alpha$ КГ). Оксихинолины 7 и 8 варьировали в диапазоне концентраций 5-50 мкМ (с учетом концентрации 30 мкМ железа в инкубационной смеси). Оценку эффективности ингибирования проводили на основе определения концентрации, при которой наблюдалось падение скорости реакции в заданных условиях в 2 раза.

### **3.2.6. Изучение стабильности при хранении**

Обессоленный препарат фермента (5 мг/мл, 0,2 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0) хранили при 0°C. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты и измеряли активность по окислению ферроцианида.

Все измерения активности проводили на приборе SpectraMax5e фирмы Molecular Devices, США. Все измерения проводились как минимум в трех повторах.

### **3.2.7. Культивирование *HepaRG* в МБР «Гомункулус»**

Клетки *HepaRG* культивировали в ППС (Williams' Medium E (Gibco, США), 2 мМ L-глутамин (Gibco, США), 10 % фетальной бычьей сыворотки (HyClone, Thermo Scientific, США), 5 мкг/мл рекомбинантного инсулина человека (Gibco, США),  $5 \times 10^{-5}$  М гидрокортизона гемисукцината (Sigma, США), 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco, США). Клетки дифференцировали в ППС 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 (БПС) питательную среду и инкубировали еще сутки. В состав БПС входят: 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),  $5 \times 10^{-5}$  М гидрокортизона гемисукцината (Sigma, США), 1 x заменимых аминокислот (NEAA, Thermo Scientific, США), 1 % пенициллин/стрептомицина (Gibco, США).



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) [56]. Для предварительного эксперимента использовали 15 СКБ. В ячейки для культивирования клеток сменного клеточного блока (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  $\pm 10$  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  $-20^{\circ}\text{C}$  ацетонитрила и проводили хроматомасс-спектрометрический анализ для определения наличия исходных субстратов и их метаболитов.

### **3.2.8. Масс-спектрометрическое детектирование субстратов и их метаболитов**

Работа проводилась с использованием хроматомасс-спектрометра LCMS 8030 (Shimadzu, Япония), оснащенный электроспреем, в качестве источника ионизации, и тремя квадруполями. Сухие навески бупропиона, тестостерона, толбутамида, омепразола, их метаболитов - 6-гидроксибупропиона, 4-гидрокситолбутамида, 5-гидроксиомепразола, и 6- $\beta$ -гидрокситестостерона (для разработки панели), а также варфарина, дазатиниба, 7-гидроксиварфарина и 4'-гидроксидазатиниба (для валидации панели) растворяли в ДМСО до конечной концентрации 10 мМ, получая, таким образом, запасные растворы. Рабочие растворы данных соединений готовили путем разведения стоковых растворов в деионизированной воде, содержащей 50 об.% ацетонитрила особой чистоты и 0,425 об.% муравьиной кислоты особой чистоты. 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.

### 3.2.9. ВЭЖХ субстратной смеси

ВЭЖХ проводили на хроматографической колонке ZORBAX Eclipse Plus C18 4,6 мм × 150 мм, 5 мкм (Agilent, США). Для определения эффективности хроматографического разделения и детектирования была приготовлена субстратная смесь, содержащая бупропион, толбутамид, омепразол, 6-гидроксипропион, 4-гидрокситолбутамид, 5-гидроксиомепразол, тестостерон и 6-β-гидрокситестостерон в концентрациях 10 мкМ. Объем инъектирования 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.

### 3.2.10. Расчет пределов обнаружения и определения

Расчет нижнего предела обнаружения (LOD) - минимальное содержание определяемого вещества в пробе, сигнал от которого можно надёжно отличить от фона - вычисляли по следующей формуле:

$$LOD = \frac{3,3\sigma}{k} \quad (3.2.1)$$

где  $\sigma$  – стандартная ошибка предсказанных значений  $y$  для каждого значения  $x$  в линейной регрессии, описывающей калибровочный график для исследуемого соединения, вычисляемая по формуле:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{(n-2)} \left[ \sum (y - \bar{y})^2 - \frac{[\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})]^2}{\sum (x - \bar{x})^2} \right]} \quad (3.2.2)$$

$k$  – коэффициент линейной регрессии, вычисляемый по формуле.

$$k = \frac{\partial y}{\partial x} \quad (3.2.3)$$

Предел определения (LOQ) – значение концентрации исследуемого вещества, выше которой возможно определение с заданной точностью- вычисляли по следующей формуле:

$$k = \frac{\partial y}{\partial x} \quad (3.2.4)$$

### 3.2.11. Апробация панели субстрат-ингибитор

Изучение биотрансформации субстратов цитохрома P450 в присутствии ингибиторов проводили с использованием 25 СКБ. Культивирование образцов клеточной модели печени человека проводили при условиях, аналогичных используемым в предварительном эксперименте по оптимизации масс-спектроскопического детектирования. Ингибиторы изоформ цитохромов также растворяли в ДМСО для получения 1000-кратных стоковых растворов, и затем растворяли в культуральной среде до необходимой концентрации. Составы использованных культуральных сред представлены в таблице 3.2.2.

После проведения культивирования, образцы собирались и анализировались в соответствии с разработанным хроматомасс-спектрометрическим методом.

**Таблица 3.2.2.** Состав сред в СКБ для культивирования КПМЧ при исследовании биотрансформации панели субстратов цитохрома P450.

№ СКБ	Состав среды
1	Субстратная смесь (10 мкМ бупропиона, 10 мкМ тестостерона, 40 мкМ толбутамида, 20 мкМ омепразола)
2	Субстратная смесь, 30 мкМ 2-фенил-2-(1-пиперидинил)пропана (PPP)
3	Субстратная смесь, 5 мкМ сульфафеназола
4	Субстратная смесь, 1 мкМ (+)-N-3-бензил-нирванола (NBN)
5	Субстратная смесь, 1 мкМ кетоконазола

Скорость биотрансформации рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{C_{24}}{N \times t} ,$$

где  $V$  - скорость биотрансформации лекарственного соединения,  $C_{24}$  – концентрация метаболита после 24 часов инкубации лекарственного соединения с КМПЧ в отсутствие субстратной смеси и ингибиторов,  $N$  - число клеток.

**Таблица 3.2.3.** Состав сред в СКБ для культивирования КМПЧ при исследовании биотрансформации лекарственных веществ (дазатиниб, варфарин, оксихинолины)

№ СКБ	Состав среды
1	10 мкМ бупропиона, 10 мкМ тестостерона, 40 мкМ толбутамида, 20 мкМ омепразола
2	1 мкМ исследуемого вещества
3	1 мкМ исследуемого вещества, 30 мкМ 2-фенил-2-(1-пиперидинил)пропана (PPP)
4	1 мкМ исследуемого вещества, 5 мкМ сульфафеназола
5	1 мкМ исследуемого вещества, 1 мкМ (+)-N-3-бензил-нирванолола (NBN)
6	1 мкМ исследуемого вещества, 1 мкМ кетоконазола
7	1 мкМ исследуемого вещества, 10 мкМ бупропиона, 10 мкМ тестостерона, 40 мкМ толбутамида, 20 мкМ омепразола

### 3.2.12. Исследование гепатотоксичности

Клетки линии *HepaRG* культивировали и дифференцировали как описано выше в п. 3.2.7.

Для получения трехмерной клеточной модели печени человека дифференцированные клетки линии *HepaRG* промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) от остатка сыворотки, диссоциировали раствором трипсина с 0,25 % ЭДТА. Подсчет клеток производили с помощью автоматического счетчика (Countess, Qiagen). Суспензию клеток (5000 кл/45 мкл) переносили в планшет Perfecta3D™ Hanging Drop Plates (3D Biomatrix, США), который позволяет методом висячей капли формировать сфероид в течение 3 дней. Образовавшиеся сфероиды, состоящие из дифференцированных клеток *HepaRG*, затем переносили в 96-луночный планшет с низкой адгезией Culture low attachment plates (Costar, США), культивировали в 250 мкл ППС в течение 2 дней в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (37°C, 95% воздуха, 5 % CO<sub>2</sub>, относительная влажность 98 %) для завершения формирования трехмерных образований.

Для проведения исследований гепатотоксичности использовали бессывороточную культуральную среду: William`s E (Gibco, США), 2 мМ L-глутамин (Gibco, США), 1 мг/мл альбумина сыворотки крови человека (Sigma, США), питательной добавки, состоящая из инсулина, трансферрина и селена (5,5 мкг/мл инсулина, Gibco, США), несущественных аминокислот (Gibco, США), 50 мкМ гидрокортизона гемисукцината (Sigma, США), 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco, США). В ячейки для культивирования клеток микробиореактора вносили по 10 образцов клеточной модели печени человека (что соответствовало 50 тыс. клеток *HepaRG*), затем из ячеек отбирали питательную среду и вносили по 125 мкл раствора контрольного вещества в бессывороточной культуральной среде в исследуемых концентрациях (экспериментальные образцы) или бессывороточную культуральную среду (контрольные образцы). Инкубировали в течение 48 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при режиме работы МБР 5 Гц и давлении ±10 кПа. Затем выполняли цитотоксический МТТ-тест.

Для проведения МТТ-теста из ячеек микробиореактора отбирали питательную среду, образцы клеточной модели печени человека или ячейки без клеток (фон) промывали дважды 250 мкл фосфатно-солевого буфера, затем инкубировали с 0,5 мг/мл МТТ, растворенного в бессывороточной культуральной среде, в течение 3 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. После чего, образцы клеточной модели печени человека промывали 250 мкл фосфатно-солевого буфера. Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в 130 мкл ДМСО в течение 20 мин в темноте с использованием шейкера. Переносили по 100 мкл раствора в 96-ти луночный планшет. Оптическую плотность раствора измеряли при длине волны 570 нм на микропланшетном спектрофотометре BioRad X-mark (BioRad, США). Оценку жизнеспособности производили по формуле: жизнеспособность % = 100 % \* (оптическая плотность экспериментального образца - оптическая плотность раствора экспериментального образца) / (оптическую плотность контрольного образца - оптическая плотность растворителя контрольного образца).

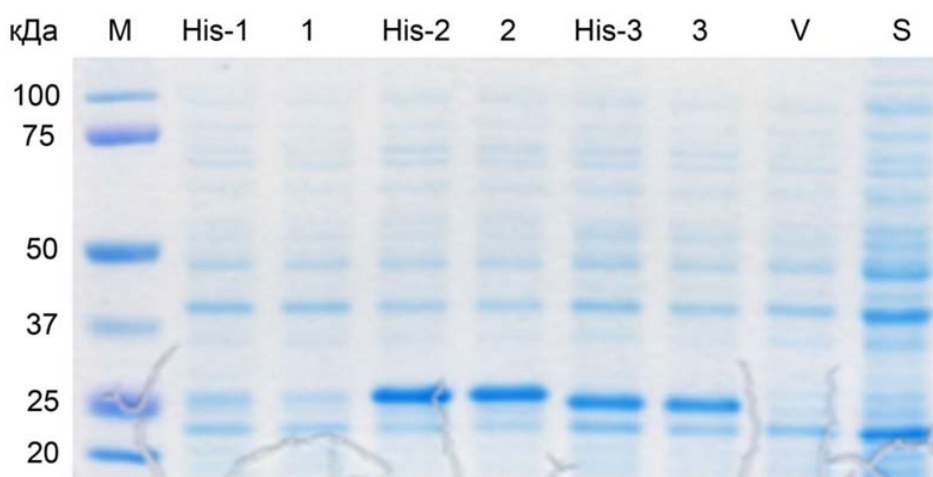
## 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1. РАЗРАБОТКА МЕТОДА РЕФОЛДИНГА Н1F ПРОЛИЛГИДРОКСИЛАЗЫ ЧЕЛОВЕКА ИЗ ТЕЛЕЦ ВКЛЮЧЕНИЯ *E. COLI*.

#### 4.1.1. Сравнение уровней экспрессии различных изоформ РНD в клетках *E. coli*.

Результат анализа экспрессии доменов пролилгидроксилаз РНD1-3 с His-tag и без него в клетках *E. coli* с помощью SDS-электрофореза в ПААГ представлен на Рис. 4.1.1. Во всех случаях наблюдалась экспрессия пролилгидроксилазных доменов, однако уровень экспрессии зависел от конкретной конструкции, а именно: для пролилгидроксилазы 1 - РНD1 – при наличии полигистидинового тага уровень экспрессии был выше, чем при его отсутствии, но в обоих случаях уровень экспрессии был довольно низким. Для пролилгидроксилазы 2 – РНD2 - принципиальной разницы в экспрессии при наличии и отсутствии в первичной структуре полигистидинового тага не наблюдалось; уровень экспрессии был наивысшим по сравнению с другими изоформами и составлял до 70 % от общего белка. Уровень экспрессии полноразмерной формы РНD3 составлял около 50 % от общего белка. Результаты экспрессии согласуются с литературными данными и наглядно объясняют почему большинство лабораторий работают именно с РНD2: она лучше всех экспрессируется в клетках *E. coli*. Поскольку целью работы ставилось сравнение препаратов фермента, полученных рефолдингом из телец включения одновременно с растворимой формой фермента, было отдано предпочтение конструкции His-tagged РНD2, 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.



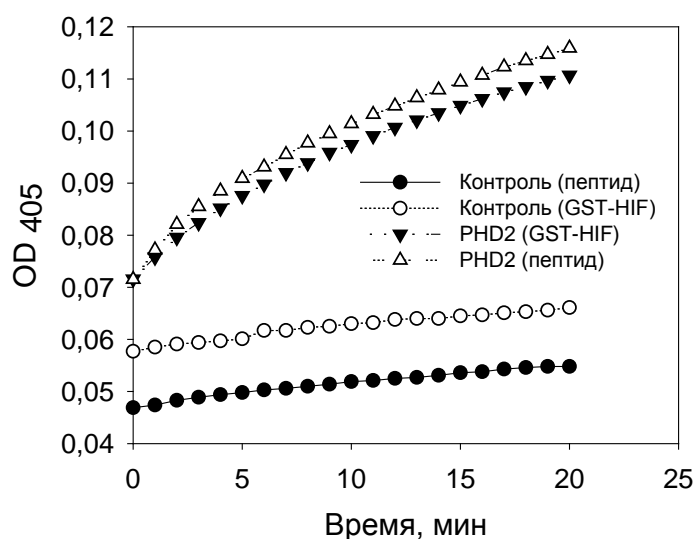
**Рис. 4.1.1.** Экспрессия каталитических доменов HIF пролилгидроксилаз в *E.coli*. 1,2,3 – PHD1,2,3, и соответственно, их формы с гистидиновым тагом (см. обозначения в Табл. 1). V – экспрессия вектора без вставки; S – нетрансформированные клетки *E.coli*.

#### **4.1.2. Выделение растворимой формы PHD2 и метод непрерывной регистрации активности.**

Растворимую форму выделяли как описано в разделе Материалы и методы. Полученные препараты использовали для разработки метода непрерывного детектирования 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, а именно «HIF prolyl hydroxylase activity assay», WO2005118836 A2, публ. 15 дек 2005, автор М.С. Brenner (<http://www.google.com/patents/WO2005118836A2?cl=en>), в одном из примеров, мы обнаружили упоминание о ферроцианиде, который может быть использован вместо аскорбата с целью обеспечения кругооборота двухвалентного железа. Однако в последнее десятилетие было однозначно показано, что ферменту аскорбат не нужен для катализа реакции. 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 это наблюдение для разработки 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.2.4.1 (литобзор). Оксоферрил, образуемый при окислении кетоглутарата, окисляет ферроцианид в феррицианид, и эта реакция представляет собой простейший способ непрерывной регистрации активности HIF пролилгидроксилазы. Как показано на Рис. 4.1.2, 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.

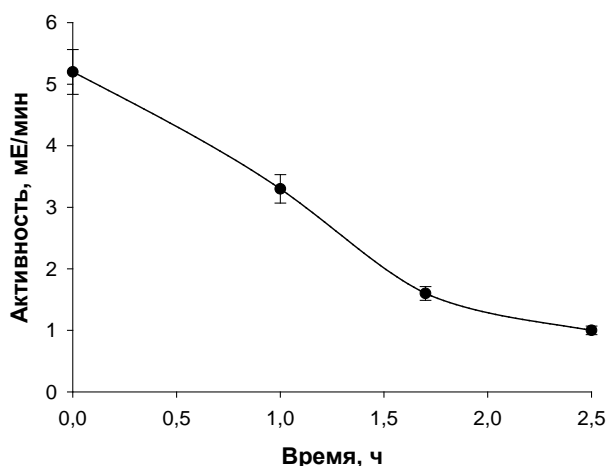


**Рис. 4.1.2.** Окисление ферроцианида, катализируемое HIF пролилгидроксилазой в присутствии HIF субстратов. Условия реакции: 50 мкг PHD2, 50 мкМ пептида, 100 мкМ  $\alpha$ КГ, 8 мкМ  $\text{FeSO}_4$ , 1 мМ  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 50 мМ Трис-НСl буфер, pH 7,5 (25°C). Реакцию проводили при 37°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.

Проблема этого метода измерения активности состоит в необходимости удаления восстановителя (дитиотреитол), что приводит к быстрой инактивации фермента при хранении (80 % инактивация на льду в течение 2х часов, см. Рис. 4.1.3). Однако, для целей разработки методики выделения и очистки фермента этот метод



измерения активности самый подходящий. Интересно отметить, что недавно опубликованная статья [57] декларирует зависимость ферментативной активности NIF пролилгидроксилазы от восстановленных тиолов *in vivo* как «сensors цистеина», а именно, показывает, что исчерпание в клетке восстановленного глутатиона при блокировании цистинового транспортера, приводит к инактивации фермента.

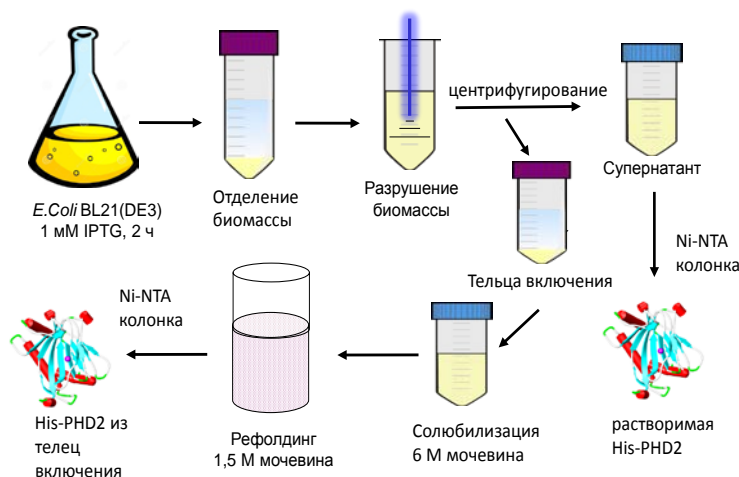


**Рис. 4.1.3.** Инактивация препарата His-PHD2 в отсутствие восстановителя (DTT) при инкубировании на льду. Активность измеряли по окислению ферроцианида (см. условия на Рис. 4.1.2 и в материалах и методах).

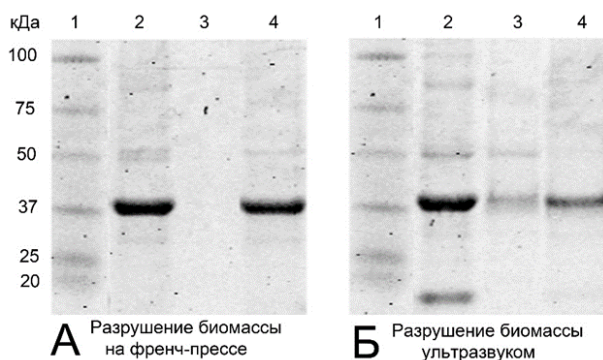
#### 4.1.3. Рефолдинг PHD2 из телец включения *E.coli* и очистка:

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. Оптимизированный протокол реактивации фермента из телец включения 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 (DTT), 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.



**Рис. 4.1.4.** Схема рефолдинга пролилгидроксилазы из телец включения *E. coli*



**Рис. 4.1.5.** Влияние метода разрушения на рефолдинг и очистку His-PHD2. А – разрушение на френч-прессе, Б – разрушение ультразвуком. 1 – маркеры, 2 – фермент после рефолдинга, 3 – фракция, не сорбирующаяся на Ni-NTA, 4 – фракция после очистки на Ni-NTA.

Было проведено сравнение двух способов разрушения биомассы на выход и чистоту активного фермента при рефолдинге из телец включения. Как оказалось, разрушение на X-прессе (Френч-пресс) позволяет увеличить выход и улучшить чистоту конечного препарата фермента, реактивированного из телец включения. А именно, при использовании ультразвука, тельца включения имеют более низкую

исходную чистоту, что приводит к неполной адсорбции фермента на Ni-NTA, и уменьшению выхода фермента после аффинного отделения почти вдвое (Рис. 4.1.5). Следует отметить, что эффективность очистки благодаря присутствию His-tag очень высока, и чистота препаратов, полученных при элюировании фермента после рефолдинга составляет более 95 %.

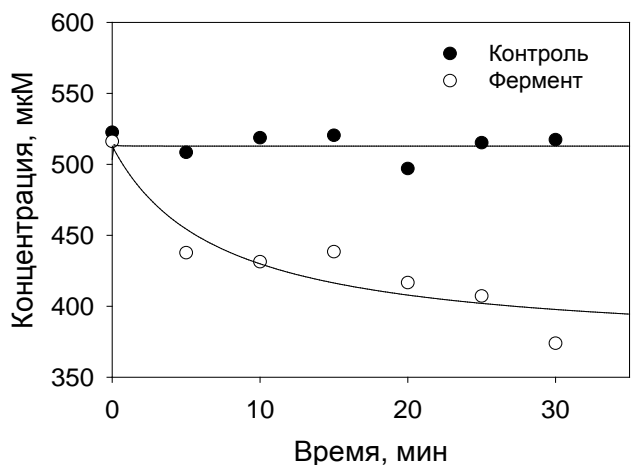
В Таблице 4.1.1 приведены основные показатели процедуры реактивации PHD2 из телец включения в сравнении с растворимой формой, также полученной в данной работе. Как следует из приведенных данных, фермент, полученный с помощью рефолдинга из телец включения, имеет существенно более высокую удельную активность, чем его растворимая форма. Дополнительным преимуществом является высокий выход по белку - порядка 5 мг активного фермента с литра культуральной среды. Активность фермента по потреблению  $\alpha$ КГ составляет порядка 0,2 ед на мг белка или 5 молей/мин/моль (принимая молекулярный вес рекомбинантного белка равным 25 кДа). Такая удельная активность превосходит по величине описанные в литературе 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 [58]).

**Таблица 4.1.1.** Очистка His-PHD2 из растворимой фракции и реактивация рефолдингом из телец включения (биомасса собрана с 0,5 л культуральной среды *E.coli*).

Фракция фермента	Общий белок, мг	Общая акт., усл.ед.	Уд.акт., усл.ед. на мг белка	Выход по активности, %	Реактивация, %	Очистка, раз
Растворимая, в супернатанте	10,0	н.о.	н.о.	-	-	1
Растворимая, после очистки на Ni-NTA	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

Таким образом, впервые удалось разработать методику реактивации из телец включения NIF 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 DTT. Разработанная процедура реактивации может применяться и при отсутствии гистидинового 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 потерям общей активности из-за необратимой сорбции белка на мембране, что еще раз подтверждает нестабильность фермента и его высокую гидрофобность.

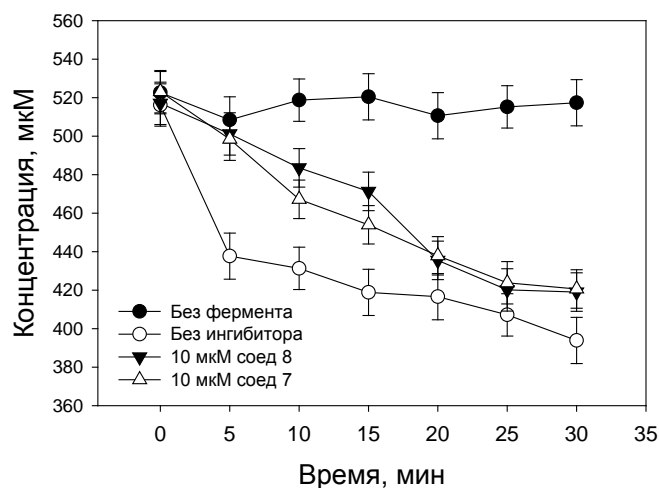


**Рис. 4.1.6.** Измерение активности по расходу αКГ. Конечные концентрации фермента – 50 мкМ, пептида 200 мкМ, сульфата железа 25 мкМ, кетоглутарата 500 мкМ (детали см. в Методах исследования).

#### 4.1.4. Изучение ингибирования препарата фермента PHD2 оксихинолинами

Для оценки ингибирующего влияния соединений 7 и 8 на реакцию декарбоксилирования кетоглутарата проводилось определение концентраций

ингибитора, при которой наблюдалось двукратное падение скорости реакции в заданных условиях ее проведения (Рис. 4.1.6). Поскольку концентрация железа (II) в реакционной смеси очень велика (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. 4.1.7, соединения 7 и 8 в пределах ошибки измерения являются ингибиторами одинаковой силы. Кажущаяся константа, которая соответствует 50 % ингибированию (по максимальной скорости, вычисляемой из наклона кинетической кривой за первые 10 мин), составляет около 10 мкМ. Это значение сильно отличается от значений, определенных из кинетики возгорания люминесценции при использовании клеточного репортера, - для соединения 7 рассчитанная кажущаяся константа составляла около 1,2 мкМ [59]. Факт сильного увеличения кажущейся константы при сравнении данных, опубликованных для гомогенного фермента, и  $IC_{50}$  на клеточном репортере обсуждается для кверцетина в статье [60] а именно для клеточного репортера  $IC_{50}$  составляет около 2 мкМ, а для гомогенного фермента 10 мкМ [61]. Причиной такого увеличения кажущейся константы 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 кажущейся константы ингибирования, полученным в гомогенном методе с использованием очищенного фермента.



**Рис.4.1.7.** Ингибирование активности PHD2 соединениями 7 и 8. Условия измерения активности те же, что и на Рис. 4.1.6. Концентрация ингибитора 10 мкМ.

Таким образом, оба соединения являются ингибиторами очищенного фермента, и 5-7 кратное увеличение кажущейся константы ингибирования по сравнению с данными клеточного репортера находятся в пределах литературной нормы. Следует отметить, что Соединение 8 не отличается в гомогенном анализе по своим ингибиторным способностям от соединения 7, хотя в репортерном анализе соединение 7 было более активно (в полтора раза). Одно из объяснений этому – присутствие всех трех изоформ фермента в клетках, в то время как ингибиторный анализ был выполнен на гомогенном препарате изоформы PHD2. Т.е. может оказаться, что скаффолд Соединения 8 оптимален именно для изоформы PHD2. Таким образом, оба скаффолда могут представлять интерес с точки зрения их использования в качестве соединений-кандидатов для последующей оптимизации. В соответствии с развитием новой стратегии разработки лекарственных препаратов, обе молекулы должны быть уже на этом этапе охарактеризованы на модели человеческих гепатоцитов для определения токсичности и путей биотрансформации.

## 4.2. ОПТИМИЗАЦИЯ И ВАЛИДАЦИЯ ПАНЕЛИ СУБСТРАТ-ИНГИБИТОР

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 как по «обычным», так и по «необычным» реакциям окисления. В нашем случае мы остановились на панели из четырех изоформ, которые обеспечивают детоксикацию более 65 % препаратов - CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, и CYP2B6.

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 представлено ниже, в 4.2.1.

#### **4.2.1. Выбор субстратов и ингибиторов**

##### **4.2.1.1. CYP2B6**

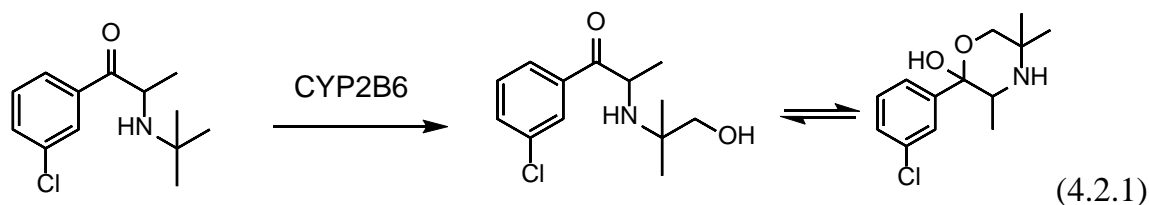
###### ***Выбор субстрата***

Большой интерес к этой изоформе обусловлен появлением все новых субстратов этого фермента, среди которых такие как циклофосфамид, ифосфамид, тамоксифен, а также противовирусные, психотропные, и противовоспалительные. **Циклофосфамид** – это противоопухолевый препарат, 4-гидроксилирование которого катализируется несколькими изоформами цитохромов P450, при этом CYP2B6 является основной изоформой (вклад более 50 %) [62] главным путем инактивации препарата является N-дехлорэтилирование, которое катализируется в основном цитохромом 3A4, вклад CYP2B6 в эту реакцию является незначительным [63] терапевтической точки зрения 4-гидроксилирование является наиболее важным метаболическим путем, однако его вклад в общий метаболизм

циклофосфомида не охарактеризован. **Петидин** (меперидин) – это опиоидный анальгетик, который быстро гидролизуется в печени до петидиновой кислоты карбоксилэстеразой, а также N-деметируется до норпетидина. Основные метаболиты затем конъюгируются с глюкоронидом и выводятся из организма. N-деметилирование катализируется в основном CYP2B6 (больше 50 %) и CYP3A4 [64]. Превращение петидина в норпетидин является важным в связи с тем, что норпетидин нейротоксичен. **7-этокси-4-трифторметилкумарин** был предложен как специфический субстрат цитохрома CYP2B6, однако позже было показано, что CYP1A2, CYP2E1 и CYP2C19 способны O-деэтилировать этот субстрат [65]. CYP2B6 катализирует реакцию N-деметилирования **кетамин**, которая представляет собой основной путь метаболизма препарата. Однако данные по вкладу этой изоформы, а также CYP2C19 и CYP1A2 в эту реакцию противоречивы [66]. **Эфавиренз** – это ингибитор обратной транскриптазы, используемый в лечении ВИЧ инфекции. 8-гидроксилирование эфавиренза является основным путем окисления в микросомах печени человека и катализируется в основном CYP2B6. При более высокой концентрации препарата также продемонстрирован каталитический вклад CYP3A4/5 и CYP2C9 [67].

**Бупропион** – это анти-депрессант, который также используют для лечения никотиновой зависимости. Биологически активным является его гидроксилированный метаболит. При низкой концентрации бупропиона гидроксилирование катализирует CYP2B6 [68,69], и только при очень высокой концентрации другие изоформы [70]. Метаболизм бупропиона под действием цитохрома 2B6 является стереоспецифическим: CYP2B6 обладает большей селективностью к S-энантиомеру [71]. В клинике бупропион используется как рацемическая смесь R- и S-энантиомеров. Таким образом, на основании анализа литературных данных, наиболее подходящим для создания панели специфическим субстратом CYP2B6 является **бупропион** в низких концентрациях (меньше 500 мкМ), реакция биотрансформации которого в оксибупропион приведена ниже:





### **Выбор ингибитора**

**Клопидогрел** – лекарственный препарат, снижающий склонность тромбоцитов к агрегации, за счет ингибирования связывания АДФ с рецепторами тромбоцитов и активации комплекса GPIIb/IIIa. В условиях совместного инкубирования клопидогрел ингибирует CYP2B6 со значениями  $IC_{50}$  0,0146-0,046 мкМ [72], и на два порядка хуже CYP2C9 -  $IC_{50}$  3,7 мкМ [72] и CYP2C8 с  $IC_{50}$  10,2 мкМ [73]. Клопидогрел в концентрации 3 мкМ при инкубировании в течении 10 мин ингибирует CYP2B6 более чем на 90 %, а остальные изоформы цитохрома P450 менее чем на 10 %. К сожалению, это вещество не стабильно в клетках печени и микросомах и подвергается быстрому гидролизу, который приводит к образованию неактивного производного [72]. **Триклопидин** также, как и клопидогрел является ингибитором связывания АДФ с рецепторами тромбоцитов. В условиях совместного инкубирования триклопидин ингибирует CYP2B6 с  $IC_{50}$  0,21 мкМ [72]. Однако триклопидин в том же диапазоне концентраций ингибирует CYP2C19 ( $K_i$  0,02-3,7 мкМ [74] и CYP2D6 ( $K_i$  0,4-10 мкМ [75]). При инкубировании в концентрации 3 мкМ в течение 10 минут, триклопидин ингибирует CYP2B6 более чем на 90 %, а остальные изоформы цитохромов P450 не более чем на 20 % [72]. ***N,N',N''-триэтилендиофосфориамид (тиоТЕПА)*** - алкилирующий агент, используемый в онкологии. В условиях совместного инкубирования тиоТЕПА ингибирует CYP2B6 с  $IC_{50}$  8,3 мкМ [72]. Это соединение также ингибирует CYP3A4 с  $IC_{50}$  100 мкМ при измерении  $\beta$ -гидроксилазного превращения тестостерона и  $IC_{50}$  230 мкМ при измерении 1'-гидролазного превращения мидазолама [72]. При преинкубировании тиоТЕПА в концентрации 30 мкМ в течение 30 минут активность CYP2B6 ингибируется более чем на 90 %, однако также ингибируются CYP2A6 на 60 % и CYP3A4 на 20 % [72]. Эти данные указывают на то, что тиоТЕПА является более селективным ингибитором CYP2B6

в условиях совместного ингибирования. **Сертралин** — антидепрессант из группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина - ингибирует CYP2B6 с  $IC_{50}$  0,2-3,2 мкМ [68], но также ингибирует CYP2C19 с  $K_i$  0,089 мкМ [74], CYP2D6  $K_i$  0.7-1,5 мкМ [76] и CYP3A4 с  $K_i$  3,5 мкМ [77]. **Амлодипин** – блокатор медленных кальциевых каналов II поколения, который оказывает гипотензивное действие - ингибирует CYP2B6 с  $IC_{50}$  01,42 мкМ [78]. Соединение также ингибирует CYP2C8 с  $IC_{50}$  10,79 мкМ [73], CYP2C9  $IC_{50}$  14 мкМ, CYP2D6 с  $IC_{50}$  57 мкМ и CYP3A4 с  $IC_{50}$  4 мкМ [79].

**2-фенил-2-(1-пиперидинил)пропан (PPP)** - аналог фенциклидина - был идентифицирован как инактиватор цитохрома 2B6 человека [68]. В условиях совместного инкубирования и при использовании бупропиона в качестве субстрата PPP ингибирует CYP2B6 в микросомах человека с  $IC_{50}$  5,1 мкМ, а CYP2D6 с  $IC_{50}$  74 мкМ [72]. Все остальные изоформы цитохром P450 демонстрировали  $IC_{50} > 300$  мкМ, за исключением CYP3A4 с  $IC_{50} = 200$  мкМ. При инкубировании 30 мкМ PPP в течение 30 минут с микросомами человека, CYP2B6 был ингибирован на 90 %, в то время как другие изоформы цитохрома P450 менее чем на 10 % [72].

Таким образом, на основании максимальной селективности, устойчивости и доступности, в качестве ингибитора цитохрома 2B6 был выбран **2-фенил-2-(1-пипери-динил)пропан (PPP)** в концентрации 30 мкМ.

#### 4.2.1.2. CYP2C9

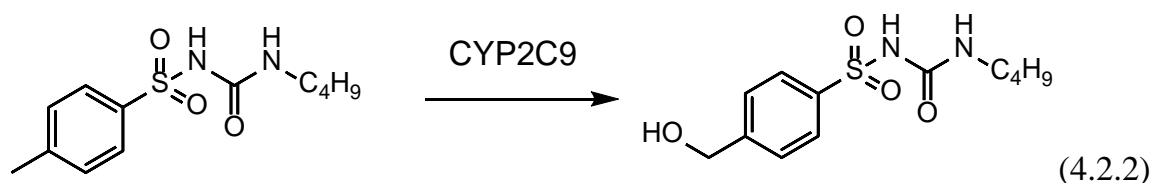
##### **Выбор субстрата**

CYP2C9 играет важную роль в окислительном метаболизме нестероидных противовоспалительных препаратов производных пропионовой кислоты, фенемата и оксикама. Многие, но не все субстраты цитохрома 2C9 являются слабыми кислотами с анионным центром примерно в  $7 \text{ \AA}$  от окисляемого атома углерода [80]. Генетические полиморфизмы этого фермента приводят к значительным изменениям его каталитической активности. **Фенитоин** – противоэпилептическое лекарственное средство из группы производных гидантоина. Основным путем

метаболизма фенитоина (примерно на 80%) является 4'-гидроксилирование с образованием 5-(4-р-гидроксифенил)-5-фенилгидантоина, катализируемое CYP2C9 [81]. Роль CYP2C9 в метаболизме этого препарата была определена с помощью специфических ингибиторов этой изоформы как *in vitro*, так и *in vivo*. Однако по каким-то причинам это вещество не получило распространение как субстрат для определения активности цитохрома 2C9.

**Толбутамид** – гипогликемический препарат, применяемый как противодиабетическое средство. В организме человека толбутамид биотрансформируется почти полностью по одному метаболическому пути. Первым этапом, который является лимитирующим по скорости, является метилгидроксилирование с образованием окситолбутамида, затем происходит окисление окситолбутамида алькоголь- или альдегид-дегидрогеназой до карбокситолбутамида [81]. Существует большое количество доказательств роли цитохрома 2C9 в гидроксилировании толбутамида, и это вещество является признанным субстратом для определения активности этой изоформы как *in vitro* так и *in vivo*. Показано, что  $K_m$  реакции, катализируемой рекомбинантным ферментом CYP2C9, находится в том же диапазоне концентраций, что и константа биотрансформации толбутамида микросомами печени человека. Эксперименты с использованием специфических ингибиторов CYP2C9 и толбутамида показали, что эта изоформа ответственна за 4'-гидроксилирование R- и S-**флурбипрофена**, и является основной изоформой, катализирующей 2- и 3-гидроксилирование R- и S-**ибупрофена** [82]. CYP2C9 участвует в O-деметиловании S-**напроксена** и гидроксилировании тиофенового кольца **супрофена** [83], однако эти метаболические пути являются вторичными, и CYP1A2 вносит вклад в вышеуказанные реакции практически в той же степени, что и CYP2C9. *In vitro* исследования также показали основную роль CYP2C9 в реакциях 4'-гидроксилирования **ацеклофенака** и **диклофенака** и 5'-гидроксилирования **пироксикама**, **теноксикама** и **лорноксикама** [81,84]. 4'-гидроксилирование **диклофенака** довольно часто используется для определения активности цитохрома 2C9 [84,15].

Таким образом, анализ литературных данных указывает на толбутамид как наиболее специфический субстрат CYP2C9. Схема реакции биотрансформации толбутамида CYP2B6 представлена ниже:



### **Выбор ингибитора**

**Сульфafenазол** – сульфонамидный антибиотик, ингибирующий реакцию 4-метилгидроксилирования толбутамида, катализируемую CYP2C9 с  $K_i$  0,12-0,7 мкМ [85,86,87]. При ингибировании реакции 4'-гидроксилирования диклофенака сульфafenазолом  $K_i$  составило 0,11-0,7 мкМ [85,86]. Сульфafenазол является слабым ингибитором следующих изоформ цитохрома P450: CYP2C18 –  $K_i$  29 мкМ [88], CYP2C19 –  $K_i$  14 мкМ [89] со значением  $IC_{50} > 50$  мкМ и CYP2C8 с  $K_i > 50$  мкМ. Значения  $IC_{50}$  реакций ингибирования сульфafenазолом остальных изоформ цитохрома P450 составляют более 100 мкМ [88]. **Флуоксетин** — антидепрессант, один из основных представителей группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина. Флуоксетин ингибирует CYP2C9 со значениями  $K_i$  19-87 мкМ [88,90], но является более сильным ингибитором CYP2D6 со значением  $K_i$  0,025 мкМ [91], CYP1A2 -  $K_i$  4,4 мкМ [92], CYP2C19 -  $K_i$  64 мкМ [89]. **Флувоксамин** — также антидепрессант из группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина. По фармакологическим свойствам он близок к флуоксетину, с тем отличием, что его эффект наступает несколько быстрее. Флувоксамин ингибирует CYP2C9 со значениями  $K_i$  0,63-16 мкМ [93,94,95]. Это соединение также ингибирует CYP1A2 со значениями  $K_i$  0,08-0,28 мкМ [89,92], CYP2D6 -  $K_i$  1,3-3,9 мкМ [94] и CYP3A -  $K_i$  50,8-5,6 мкМ [95,77,92].

Таким образом, наиболее селективным ингибитором, доступным на сегодняшний день, является сульфafenазол.

### 4.2.1.3. CYP2C19

#### **Выбор субстрата**

CYP2C19 оказывает воздействие на 10-15 % используемых в настоящее время лекарственных препаратов, включая такие средства, как Клопидогрел, Омепразол, Мефенитоин, Прогуанил, Диазепам. До 5 % европейского и до 20% азиатского населения подвержены генетическим полиморфизмам в отношении гена *CYP2C19*, что приводит к низкой чувствительности пациентов к ряду лекарственных средств. Для исследования функциональной активности полиморфизмов CYP2C19 используют *S-мефенитоин* – антиконвульсивный препарат, открытый в 1940-х гг. В связи с этим наряду с классическим названием для CYP2C19 также используют термин *S-мефенитоин гидроксилаза* [16]. Низкая эффективность 4'-гидроксилирования молекулы данного лекарства, осуществляемого CYP2C19, свидетельствует о низкой активности соответствующего геномного варианта цитохрома и коррелирует со слабым метаболизмом многих других препаратов и ксенобиотиков. Основным метаболитом *S-мефенитоина* является нирванол (5-этил-5-фенилгидантоин), который, однако, достаточно токсичен и приводит к дискразии крови у 1 % пациентов. В связи с этим мефенитоин используется только при доказанной неэффективности альтернативных противоконвульсивных препаратов, и в настоящее время мефенитоин не используется в Европе и США.

*Омепразол* – лекарственный препарат класса ингибиторов протонных насосов, используемый при изжоге (гастроэзофагеальный рефлюкс). Омепразол подавляет выделение желудочного сока, используется для лечения язв желудка и двенадцатиперстной кишки, борьбы с инфекциями, вызванными *H.pylori*, а также заживления эрозивного эзофагита. Омепразол является ингибитором H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФазных каналов в париетальных клетках желудка, в то время как его метаболиты неактивны в отношении протонных каналов. CYP2C19 является основным ферментом, осуществляющим метаболизм омепразола до неактивных метаболитов (5-оксиомепразол, 5-О-десметиломепразол). В зависимости от индивидуального уровня функциональной активности CYP2C19 доза омепразола

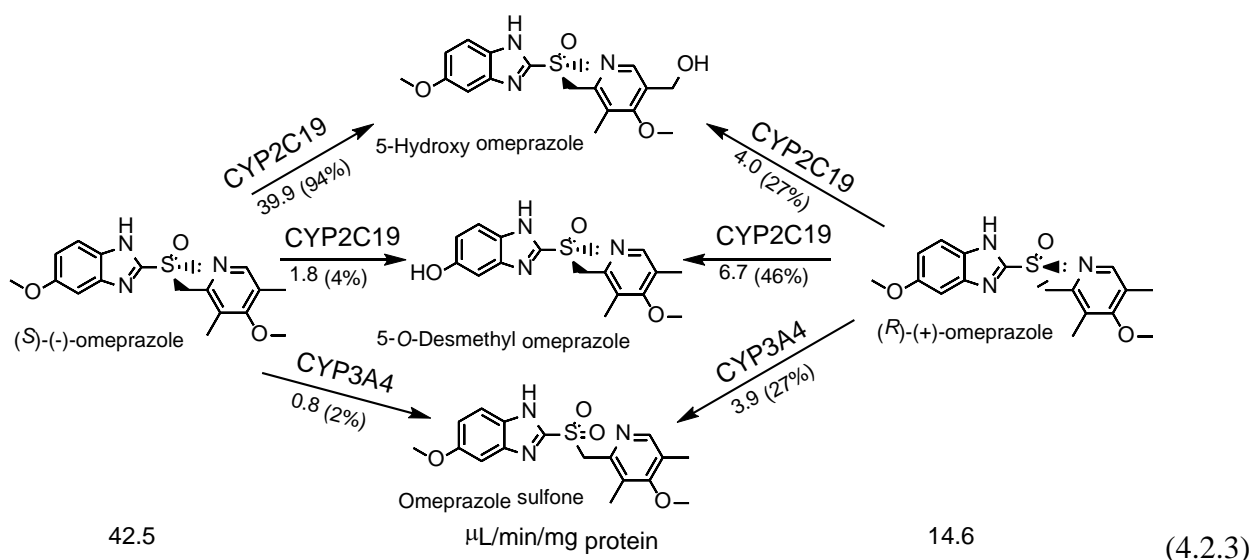
может быть повышена или понижена для достижения терапевтического эффекта. Было показано, что специфическая активность CYP2C19 стереоселективна: в микросомах печени CYP2C19 осуществляет метаболизм 40% S-омепразола и 87% R-омепразола; при этом для 5'-гидроксилирования предпочтительным субстратом является R-омепразол, в то время как 5'-деметиление осуществляется в основном для S-формы [14]. Abeló и коллеги [14] также показали, что образование омепразол-сульфона из обоих энантиомеров омепразола происходит под действием другого цитохрома CYP3A4, однако предпочтительным субстратом является S-омепразол. Омепразол и некоторые из его метаболитов могут выступать в качестве ингибиторов CYP2C19, что говорит о необходимости тщательного исследования межлекарственных взаимодействий при комбинированной терапии заболеваний [14]; в частности, не рекомендуется использовать омепразол совместно с другими субстратами CYP2C19, в том числе клопидогрелом [13].

Последний представляет собой антиагрегационный препарат для профилактики атеротромботических осложнений у пациентов, перенесших инфаркт миокарда, ишемический инсульт или имеющих заболевания сердечно-сосудистой системы. Селективно и необратимо блокирует связывание АДФ с рецепторами P2RY12 на поверхности тромбоцитов, подавляет их активацию, препятствует сорбции фибриногена и ингибирует агрегацию тромбоцитов. Клопидогрел относится к классу тиенопиридинов второго поколения, представляет собой неактивную форму пролекарства, которая требует активирования посредством двух последовательных реакций окисления системами цитохромов: в первом случае цитохромами CYP1A2, CYP2B6, и CYP2C19 до 2-оксоклопидогрела, во втором случае - CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, и CYP3A5 до активного метаболита, для которого предсказано 8 возможных структур [96]. При этом активируется лишь 15 % препарата, 85 % в процессе гидролиза с помощью эстераз переходит в неактивную форму и выводится из организма [97,98,96,99,100]. Активная форма лекарства содержит тиоловую группу, формирующую дисульфидный мостик со свободным остатком цистеина в составе молекулы рецептора P2RY12. Необратимое связывание приводит к

подавлению агрегации тромбоцитов на протяжении всего времени жизни рецептора (около 10 дней) [98].

**Мелатонин** – биогенный амин, эндокринный регулятор циркадных ритмов, цикла сна и бодрствования, настроения, памяти и обучаемости, иммунной активности, фертильности и размножения, а также эффективный антиоксидант. Экзогенный мелатонин используется в многочисленных терапевтических приложениях, связанных с сезонной депрессией [101,102], онкологическими заболеваниями [103,104], головными болями [105,106,107], терморегуляцией [108], заболеваниями пищеварительной [109], сердечно-сосудистой [110,111], половой [112,113] и других систем, однако не является одобренным лекарственным препаратом. Метаболизм мелатонина осуществляется цитохромами CYP1A2 и CYP2C19 до 6-сульфатоксимелатонина и N-ацетилсеротонина, соответственно [114,115]. В то же время, Gonzalez с соавторами [116] показали, что мелатонин подвергается 6-гидроксилированию различными цитохромами (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2C19) с образованием 6-оксимелатонина, который связывается с сульфатом и выводится с мочой. CYP2C19 и CYP1A2 способны O-деметилировать мелатонин с образованием N-ацетилсеротонина, который выводится из организма в виде глюкуронида [117,116]. Показано, что ингибиторы CYP2C19 приводят к повышению времени жизни экзогенного мелатонина в плазме крови, повышая его биодоступность [114]. Тем не менее, терапевтическая эффективность мелатонина и роль различных цитохромов в его метаболизме на сегодняшний день не до конца изучены.

Таким образом, в качестве специфического субстрата цитохрома CYP2C19 выбор пал на **омепразол**, схема метаболизма которого представлена ниже:



### Выбор ингибитора

**Триклопидин** широко используется как ингибитор CYP2C19 [88]. Несмотря на то, что триклопидин является сильным ингибитором этой изоформы ( $K_i$  0,02-3,7 мкМ [118,74]), он также является хорошим ингибитором CYP2B6 ( $K_i$  0,2 мкМ [67]) и CYP2D6 ( $K_i$  0,4-10 мкМ [118]). **Нооткатон** применяется как компонент пищевых эссенций, а также в качестве компонента парфюмерных композиций. Нооткатон ингибирует CYP2C19 со значением  $K_i$  0,5 мкМ, однако он также ингибирует CYP2A6 при схожих значениях  $K_i$  (0,8 мкМ) [15].

**(-)-N-3-бензил-фенобарбитал (NBP)** и **(+)-N-3-бензил-нирванол (NBN)** – специфические ингибиторы цитохрома 2C19, синтезированные Suzuki и др. в 2002 г. [119]. NBP ингибирует CYP2C19 со значением  $K_i$  0,079 мкМ [119] и  $IC_{50}$  0,25 мкМ [120]. При совместном инкубировании NBP в концентрации 0,3 мкМ ингибировал рекомбинантный фермент CYP2C19 на 80 %, а остальные изоформы цитохрома P450 менее чем на 10 % [120]. NBN ингибирует CYP2C19 со значением  $K_i$  0,259 мкМ. NBN немного менее специфичен чем NBP. При совместном инкубировании NBN в концентрации 1 мкМ ингибировал рекомбинантный фермент CYP2C19 на 80%, а остальные изоформы цитохрома P450 примерно на 16 % [119].

Таким образом, на основании максимальной селективности и доступности в качестве ингибитора цитохрома 2B6 был выбран **(+)-N-3-бензил-нирванол (NBN)**.



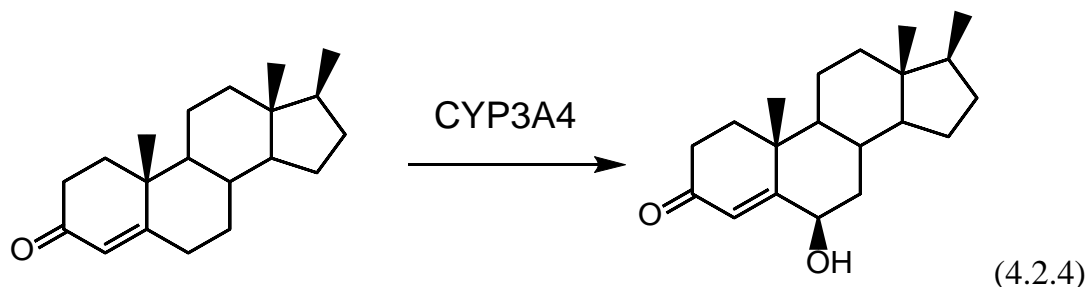
#### 4.2.4.1 CYP3A4

##### *Выбор субстрата*

CYP3A4 играет важную роль в катаболизме некоторых эндогенных стероидов, включая тестостерон, прогестерон, андростенедион, кортизол и желчные кислоты. Кроме больших объемных молекул, субстратами этой изоформы могут являться и незначительные по объему соединения - такие как ифосфамид, тамоксифен, бензодиазепины, некоторые статины, антидепрессанты, опиоиды и многие другие. **Мидазолам** – бензодиазепин короткого действия, часто используемый как успокоительное и для анестезии. Этот препарат широко используется в качестве специфического субстрата цитохрома 3A4 [96]. В результате биотрансформации получается два продукта 1'-оксимидазолам и 4-оксимидазолам, которые затем метаболизируются с гораздо более низкой скоростью. 1'-гидроксилирование составляет около 90 % от общего гидроксилирования [98]. При инкубации с микросомами печени человека в течение 5 минут метаболизм мидазолама подчиняется простому уравнению Михаэлиса-Ментен [97].  $K_m$  1'-гидроксилирования мидазолама составляет 3-5 мкМ, а 4-гидроксилирования 40-60 мкМ [96]. **Эритромицин** – макролидный антибиотик, который N-деметируется под действием CYP3A4 [100] и является довольно специфическим субстратом цитохрома 3A4. На кинетику метаболизма эритромицина оказывает большое влияние *p*-гликопротеин [99] в связи с обратным транспортом препарата.

Одним из эндогенных субстратов цитохрома 3A4 является **тестостерон**. В большом количестве исследований показано, что образование 6 $\beta$ -окситестостерона уменьшается при действии как химических специфических ингибиторов CYP3A4 [102], так и специфических антител [121]. В исследованиях на очищенных белках человека [101] и рекомбинантных белках [103] показано, что другие члены семейства CYP3A (кроме CYP3A7) также катализируют реакцию 6 $\beta$ -гидроксилирования, однако в гораздо меньшей степени чем CYP3A4. Вклад CYP2C9 и CYP2C19 в катализ тестостерона составляет 1/10 от CYP3A4 [101]. В

микросомах человека  $K_m$   $\beta$ -гидроксилирования цитохромом 3A4 составляет 50-100 мкМ [100]. В результате анализа литературных данных и основываясь на высокой специфичности и доступности в качестве специфического субстрата цитохрома 3A4 был выбран тестостерон. Схема реакции биотрансформации тестостерона CYP3A4 представлена ниже



### **Выбор ингибитора**

Существует большое количество ингибиторов CYP3A4, далее будут рассмотрены только наиболее высоко специфические и широко используемые.

**Кетоконазол** – противогрибковый лекарственный препарат, производное имидазола. При использовании в концентрации меньше 1 мкМ кетоконазол является очень селективным ингибитором CYP3A4 ( $K_i$  0,0037-0,13 мкМ [122]). При более высоких концентрациях кетоконазол также ингибирует другие изоформы цитохромов P450: CYP2A6 –  $K_i$  7-24 мкМ и  $IC_{50} \geq 50$  мкМ [123,124], CYP2B6 –  $IC_{50}$  3,2-81 мкМ [123,124], CYP2C8 –  $K_i$  2,5-11,8 мкМ [125]  $IC_{50}$  4-25 мкМ [123], CYP2C9  $K_i$  0,3-20 мкМ [126,93]  $IC_{50}$  5-90 мкМ [123], CYP2C19  $K_i$  6,9-8,8 мкМ [126,89]  $IC_{50}$  4-28 мкМ [124,123], CYP2D6  $K_i$  4,5-49 мкМ [126] и CYP2E1  $K_i \geq 41$  мкМ [124,126,123]. **Азамулин** – производное антибиотика плевромутилина. Вещество ингибирует CYP3A4 микросом человека со значением  $IC_{50}$  0,12-0,24 мкМ [127]. Значения  $IC_{50}$  ингибирования всех остальных изоформ цитохрома P450 составляет больше 40 мкМ. **Тролеандомицин** – макролидный антибиотик. Соединение также является сильным ингибитором CYP3A4 ( $K_i$  0,14-2,4 мкМ [128],  $IC_{50}$  0,4-3,2 мкМ [129,130]), однако его действие на другие изоформы цитохромов P450 не изучены.

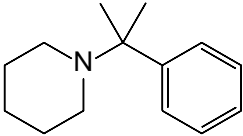
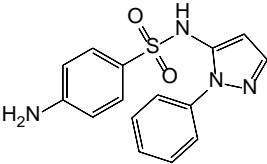
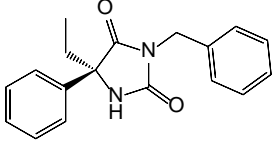
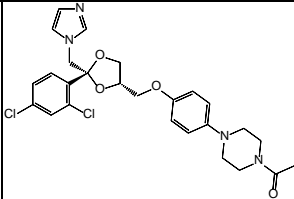
Таким образом, несмотря на то, что наиболее селективным ингибитором СУР3А4 является азамулин, для разработки методики доклинического исследования биотрансформации лекарственных средств в системах *in vitro* был выбран кетоконазол в связи с его легкодоступностью и высокой селективностью при низких концентрациях.

#### **4.2.1.5. Панель субстрат-ингибитор для серии цитохромов P450**

Цитохромы P450 могут связывать и метаболизировать большое количество субстратов и ингибиторов с различными химическими структурами, поэтому практически невозможно найти абсолютно специфические ингибиторы [15]. Однако для фенотипирования цитохромов могут быть использованы высокоспецифические ингибиторы. Ингибиторы считаются высокоспецифическими, если они при определенной концентрации вызывают максимальное ингибирование одной изоформы, в то время как на остальные изоформы оказывается незначительный эффект (менее 10 %). Ингибитор должен быть коммерчески доступным и стабильным (не подвергаться энзиматическому и неэнзиматическому превращению).

В результате тщательного анализа литературных данных по константам Михаэлиса и константам ингибирования различных изоформ P450, представленного выше, были выбраны следующие комбинации субстрат-ингибитор для создания панели доклинической оценки, представленные в Таблице 4.2.1.

**Таблица 4.2.1** Специфические ингибиторы ферментов семейства цитохрома P450, выбранные для разработки методики доклинического исследования биотрансформации лекарственных средств *in vitro*

Цитохром	Выбранный ингибитор	Структурная формула	K <sub>i</sub> , мкМ	Используемая концентрация, мкМ
CYP2B6	2-фенил-2-(1-пиперидинил)пропан (PPP)		5,10	30
CYP2C9	Сульфафеназол (SF)		0,70	5
CYP2C19	(+)-N-3-бензил-нирванол (NBN)		0,26	1
CYP3A4	Кетоконазол (KZ)		0,13	1

#### 4.2.2. Разработка и оптимизация метода детектирования метаболитов

Знание путей биотрансформации позволяет оценить влияние особенностей метаболизма пациента и возможное межлекарственное взаимодействие. Многие реакции биотрансформации лекарственных средств могут быть индуцированы или ингибированы другими препаратами при их совместном приеме. Это может приводить к уменьшению или увеличению концентрации препарата и его метаболитов (включая активные или токсические метаболиты) в плазме крови. Знание особенностей биотрансформации препарата позволяет избежать клинических последствий в виде неэффективности лекарственных средств и их избыточной токсичности.

Таким образом, целью изучения метаболизма препарата *in vitro* является:

1. Определение всех главных метаболических путей, которые влияют на исходный препарат и на его метаболиты, включая ферменты ответственные за его элиминацию
2. Исследование эффекта тестируемого препарата на метаболизм других лекарственных средств и наоборот.

Для достижения этих целей было необходимо разработать методику количественного определения выбранных субстратов и их метаболитов. Метод жидкостной хроматомасс-спектрометрии позволяет определять содержание нескольких соединений, не производя процедуры дериватизации и длительной пробоподготовки, по сравнению с методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с другими видами детектором или газовой хроматографии-масс-спектрометрии.

На первом этапе разработки методики проводят оптимизацию условий масс-спектрометрии. Для этого производят масс-спектрометрический анализ изучаемых соединений. Параметрами, подвергающиеся оптимизации, являются: масса исходного иона, энергия соударения, масса дочернего иона, параметры источника ионизации.

Оптимизацию параметров масс-спектрометрического детектирования 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 молекулярную массу веществ и погрешность прибора, выбирали  $m/z$  ионов максимальной интенсивности. 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 котором 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.

Результаты оптимизации условий масс-спектрометрического детектирования бупропиона, толбутамида, омепразола, 6-гидроксипропиона, 4-гидрокситолбутамида и 5-гидроксиомепразола представлены на рисунках 4.2.1 – 4.2.6 и в таблице 4.2.2. Данные для тестостерона и 6- $\beta$ -гидрокситестостерона были получены ранее в нашей лаборатории.

Как видно из рисунка 4.2.1, максимальной интенсивностью обладает продукт распада бупропиона, получаемый при энергии соударения -15 эВ, со значением  $m/z$  183,95 (11000000 у.е.). Продукты распада остальных соединений отбирались аналогичным образом.

**Таблица 4.2.2.** Список МС/МС переходов, использованных для детектирования субстратов и продуктов их биотрансформации.

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

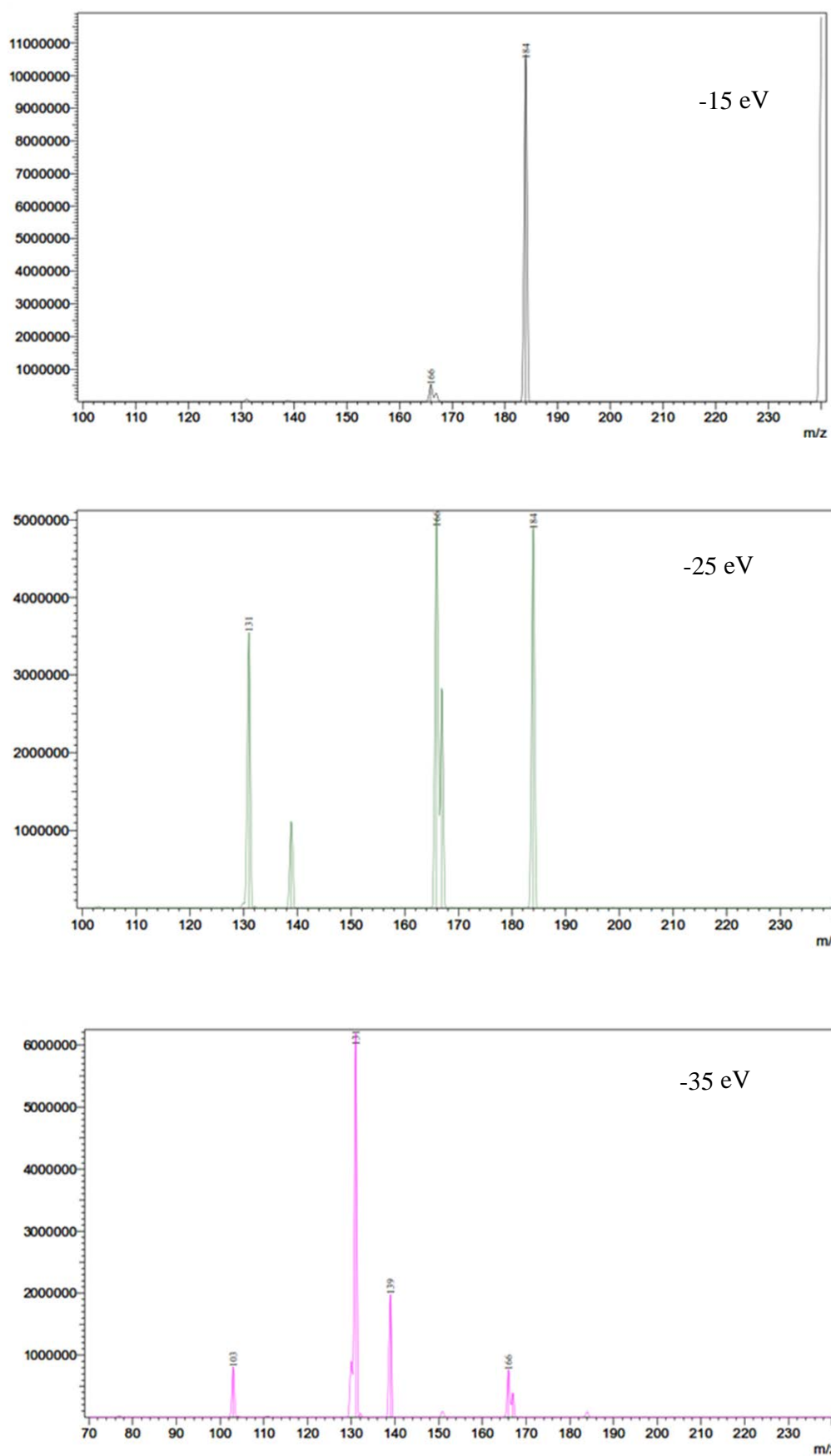
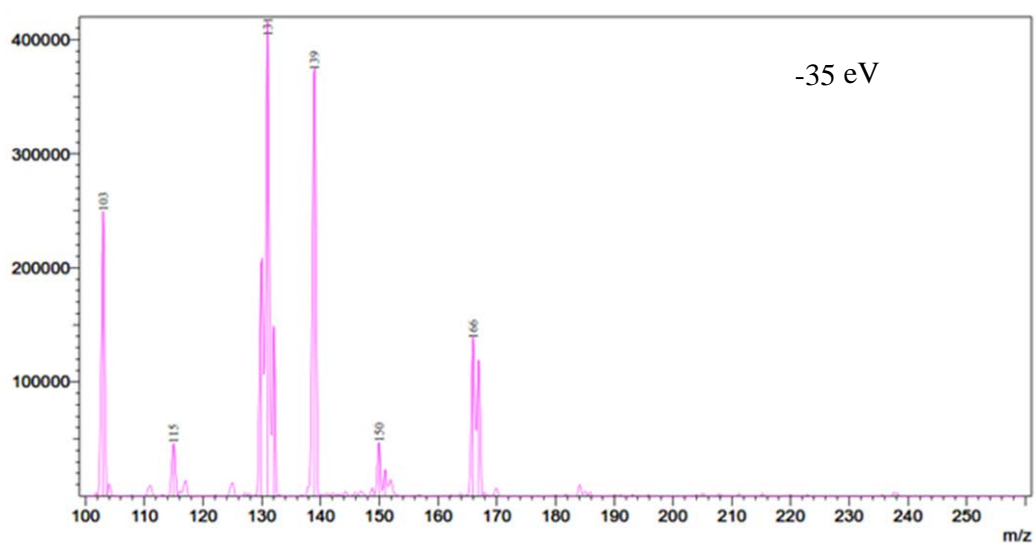
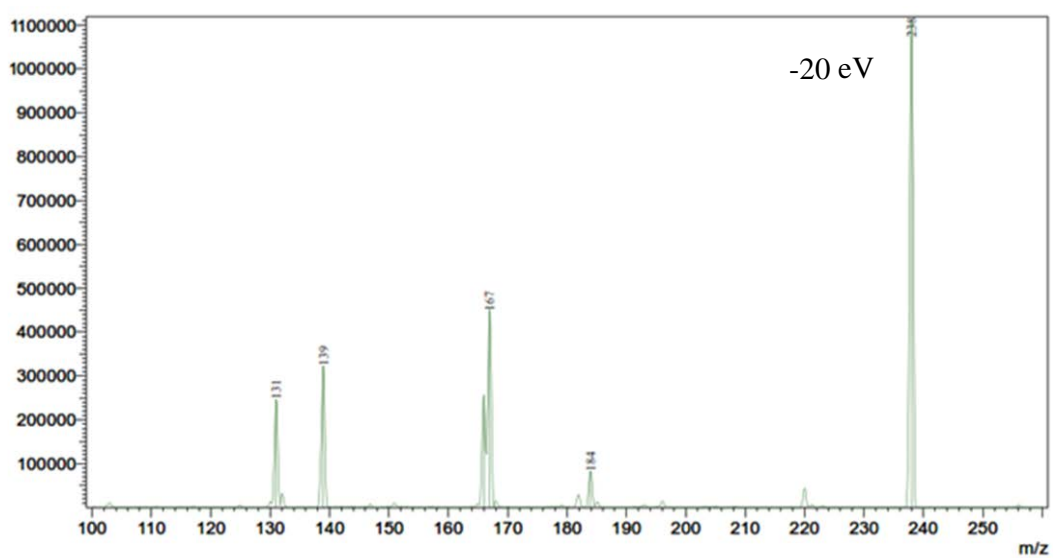
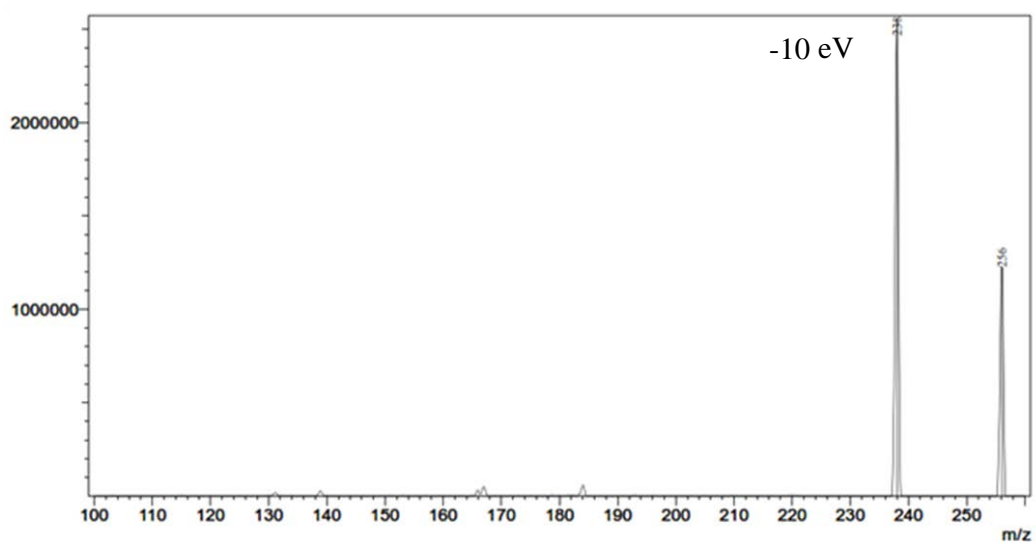
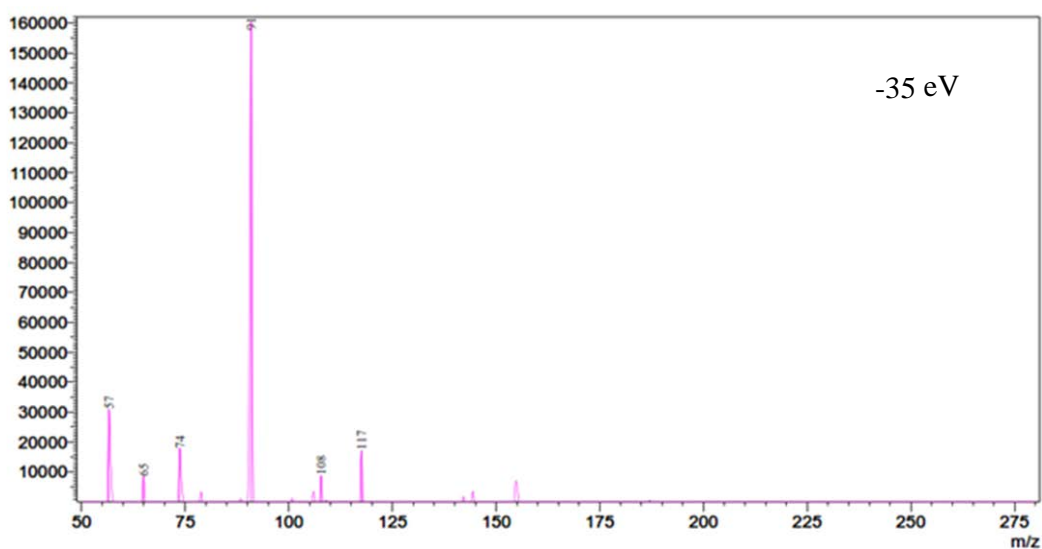
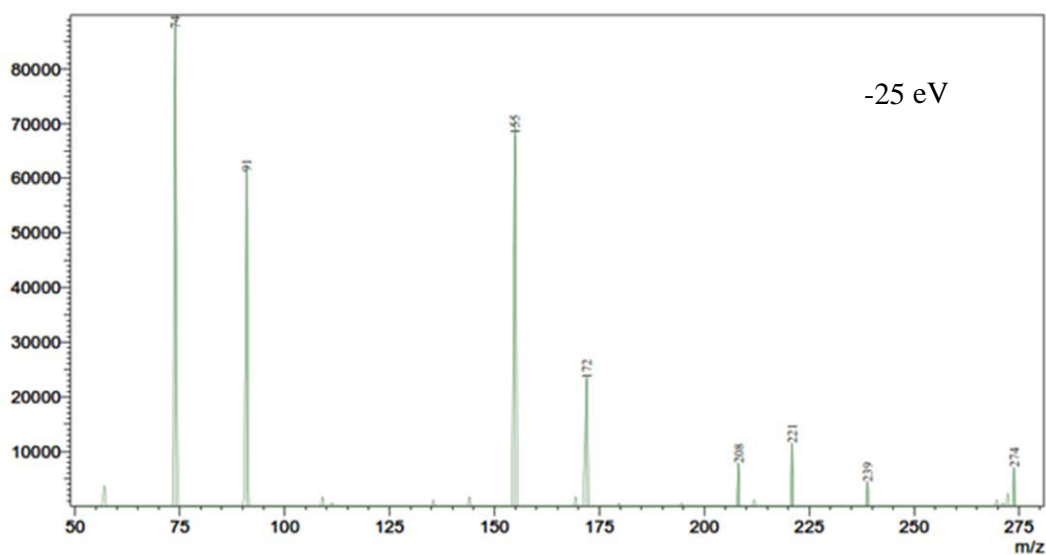
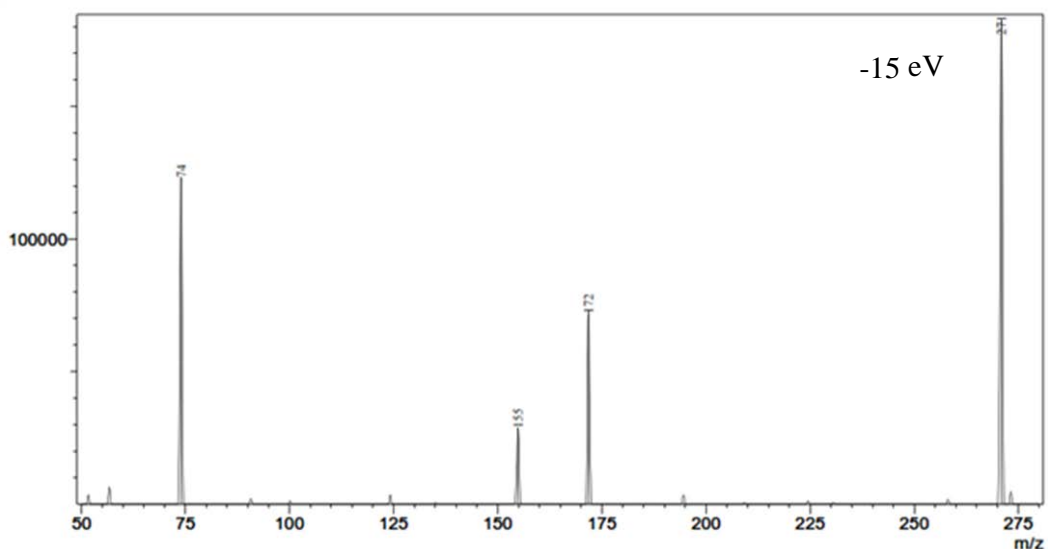


Рис. 4.2.1. Масс-спектр продуктов распада бупропиона при различных энергиях соударений.



**Рис. 4.2.2.** Масс-спектр продуктов распада 6-гидроксипропиона при различных энергиях соударений.





**Рис. 4.2.3.** Масс-спектр продуктов распада толбутамида при различных энергиях соударений.

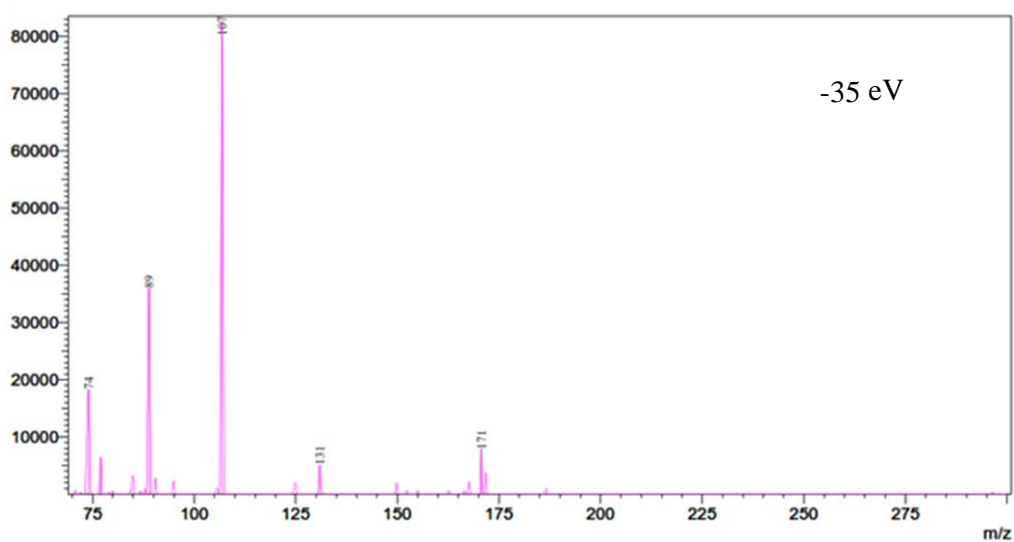
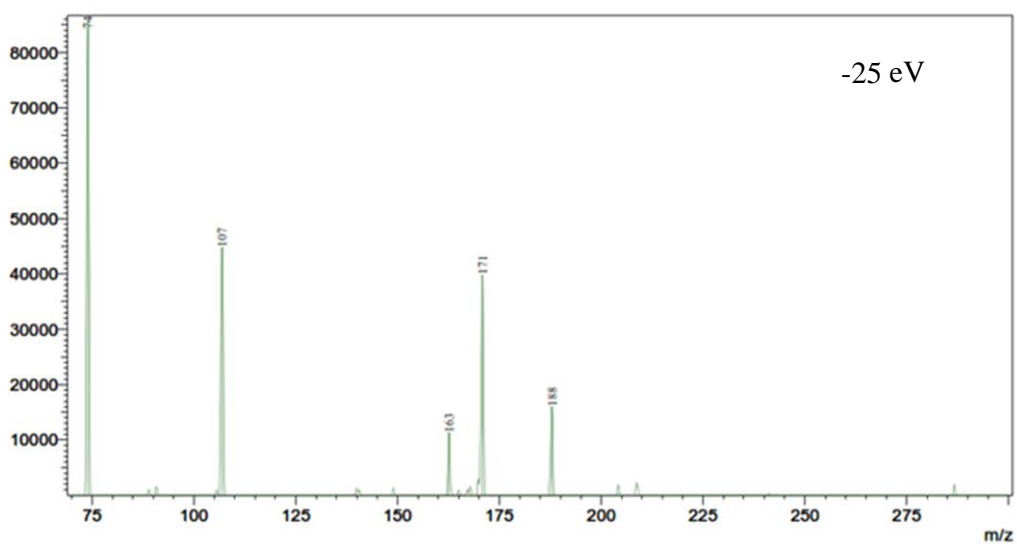
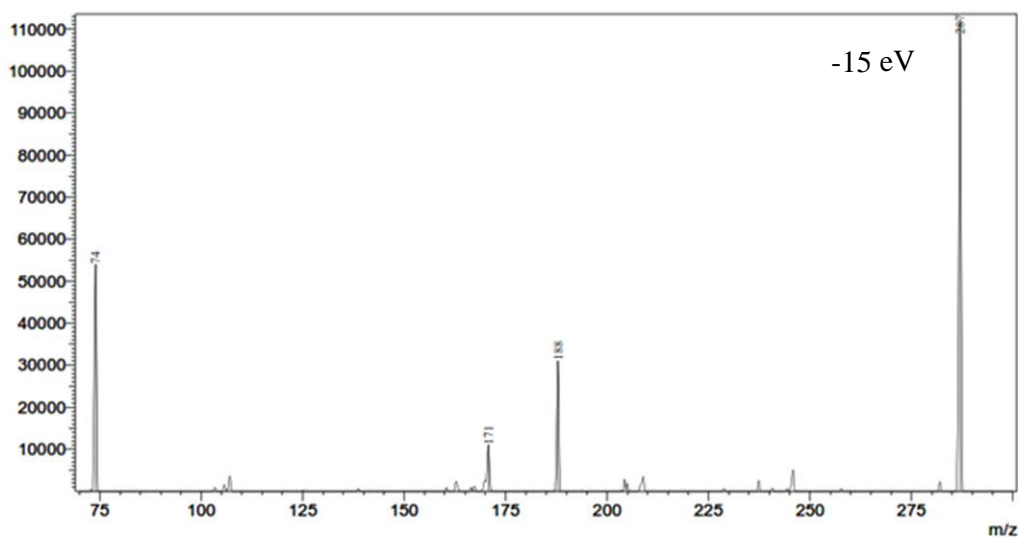


Рис. 4.2.4. Масс-спектр продуктов распада 4-гидрокситолбутаида при различных энергиях соударений

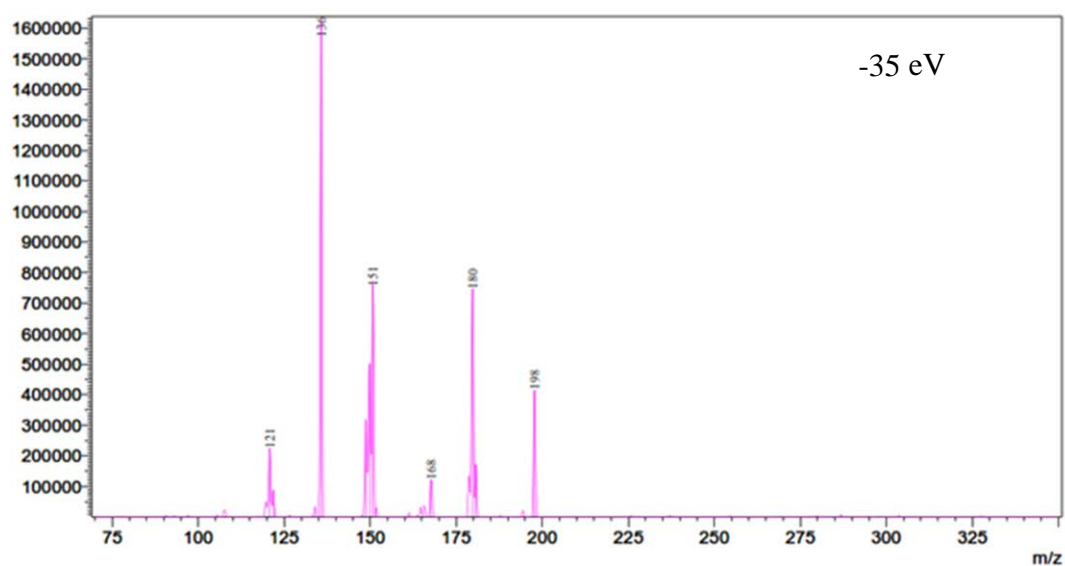
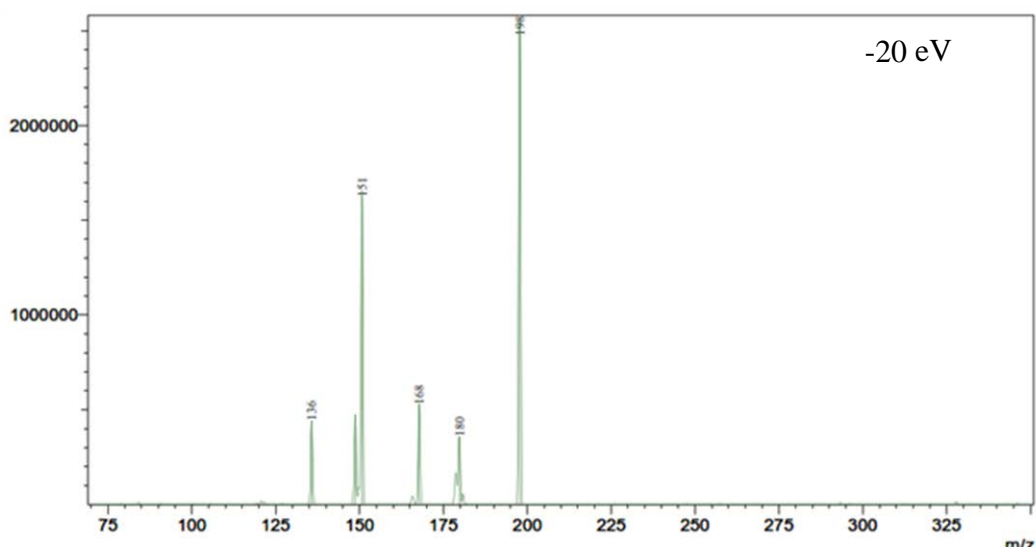
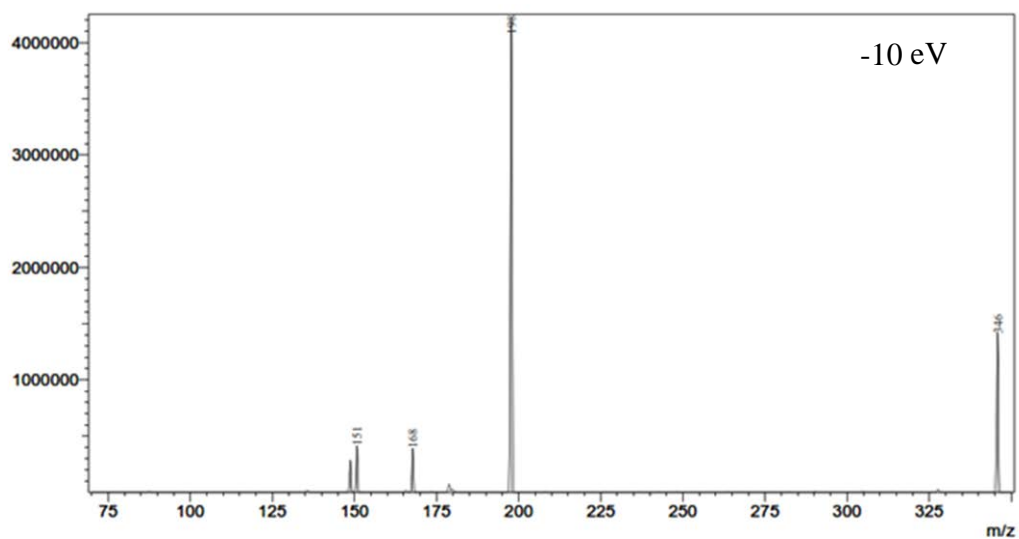
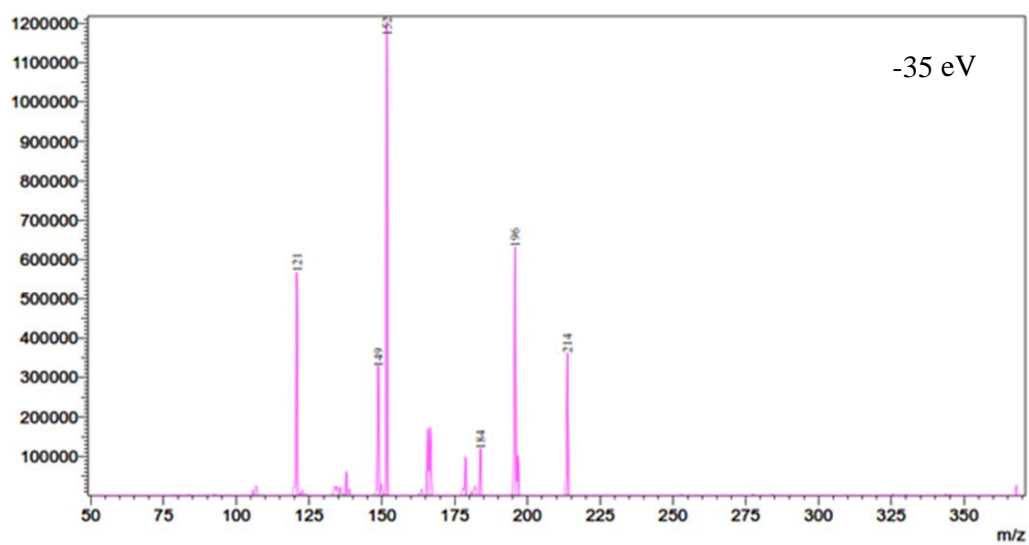
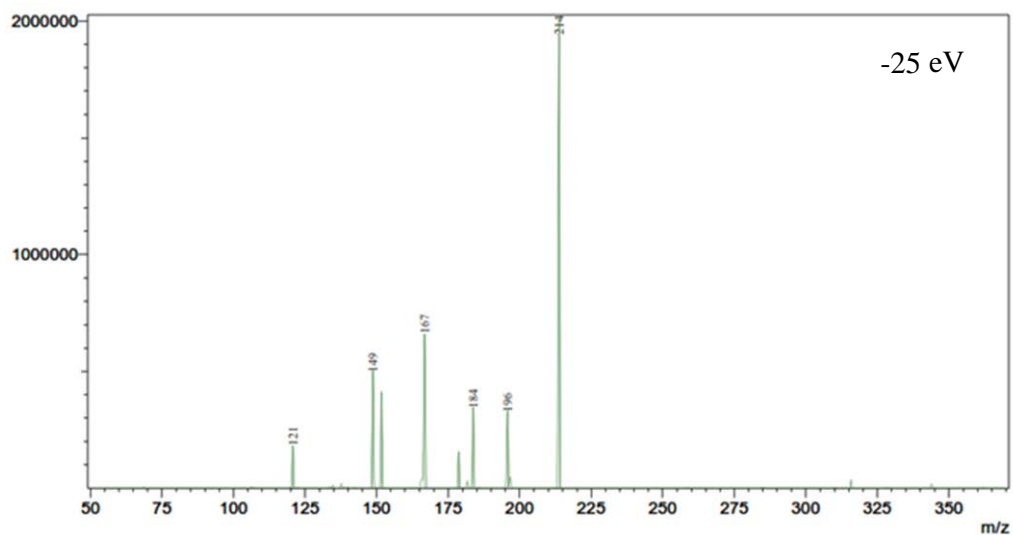
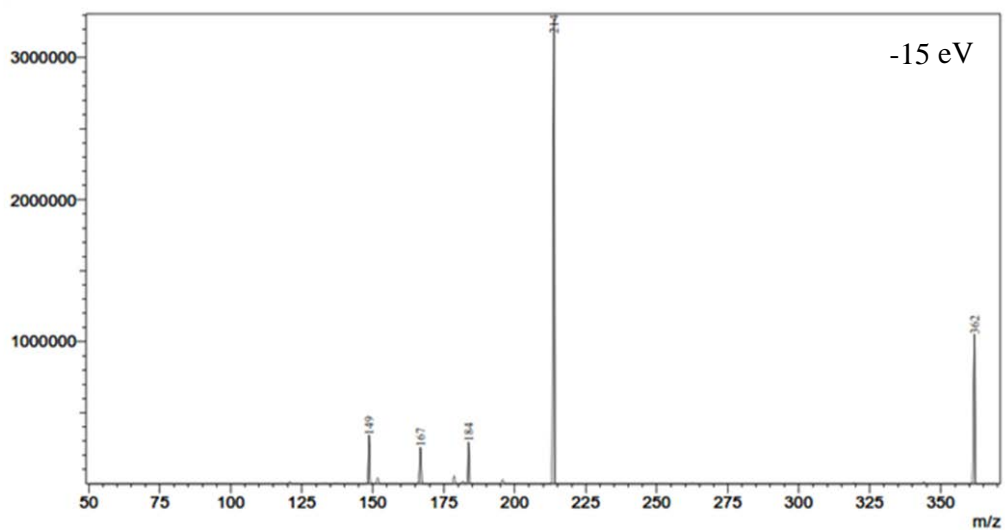


Рис. 4.2.5. Масс-спектр продуктов распада омепразола при различных энергиях соударений



**Рис 4.2.6.** Масс-спектр продуктов распада 5-гидроксиомепразола при различных энергиях соударений.

### 4.2.3. Раздельное определение метаболитов панели методом ВЭЖХ

Для определения эффективности хроматографического разделения и детектирования была приготовлена субстратная смесь, содержащая бупропион, толбутамид, омепразол, 6-гидроксибупропион, 4-гидрокситолбутамид, 5-гидроксиомепразол, тестостерон и 6-β-гидрокситестостерон в концентрациях 10 мкМ. Объем инъектирования составлял 20 мкл. Сводная хроматограмма представлена на рис 4.2.7

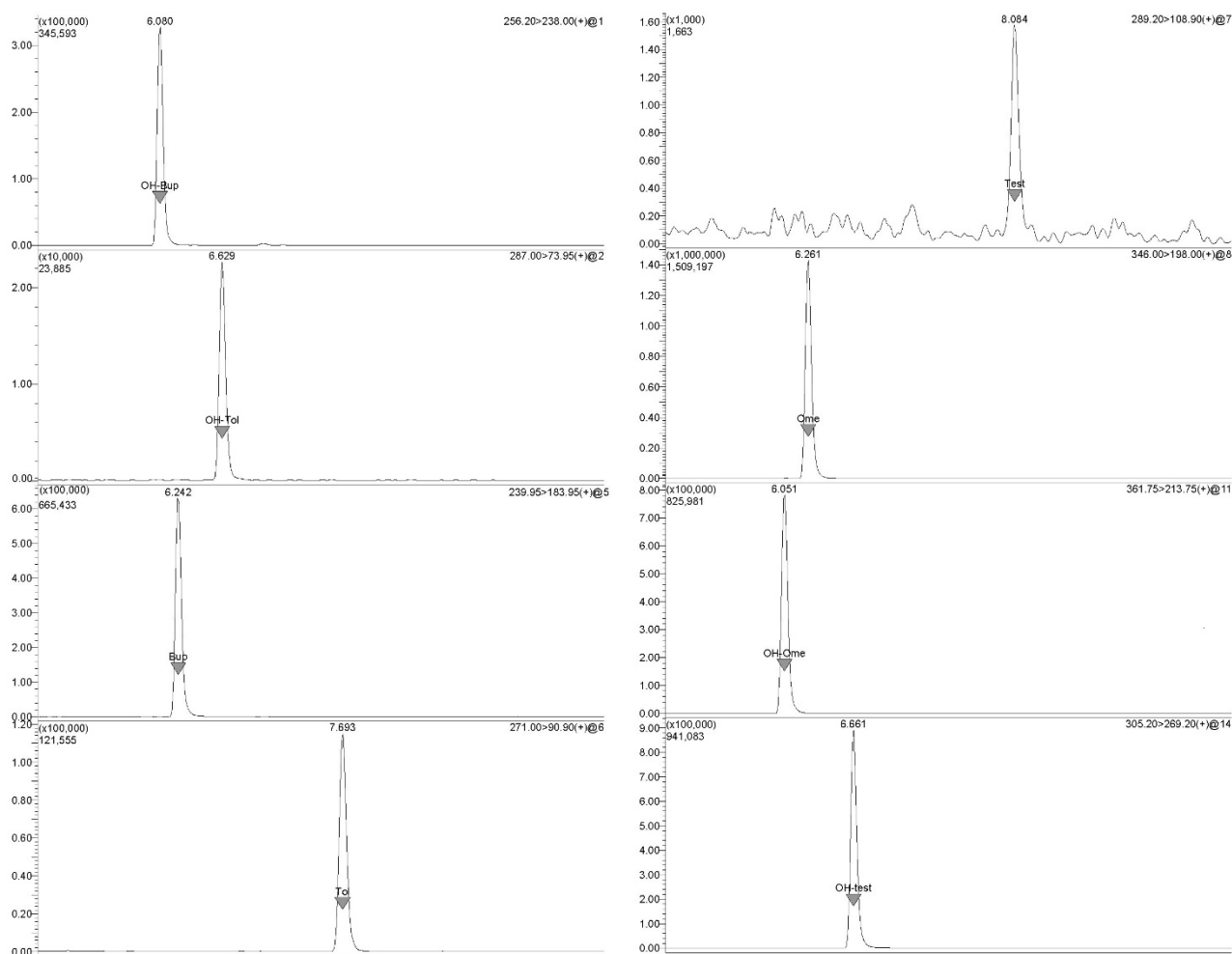
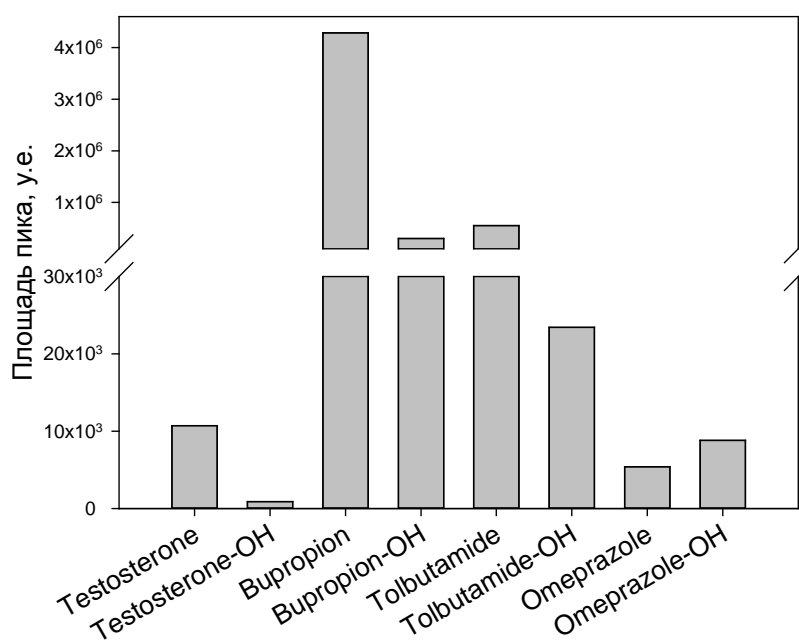


Рис. 4.2.7. Хроматограмма субстратной смеси.

Как видно из рис. 4.2.7, при использовании данного метода удается идентифицировать все определяемые соединения, поэтому дополнительная оптимизация не проводилась. После оптимизации хроматомасс-спектрометрии был проведен предварительный эксперимент по изучению биотрансформации субстратной смеси для определения чувствительности разработанной методики и

оборудования при заданных настройках. Для этого использовались образцы клеточной модели печени человека, состоящие из 5000 дифференцированных клеток линии *HepaRG*. Смесь субстратов инжестировали в МБР, пробы отбирали через 24 ч. и проводили хроматомасс-спектрометрический анализ для определения наличия исходных субстратов и их метаболитов (Рис. 4.2.8).

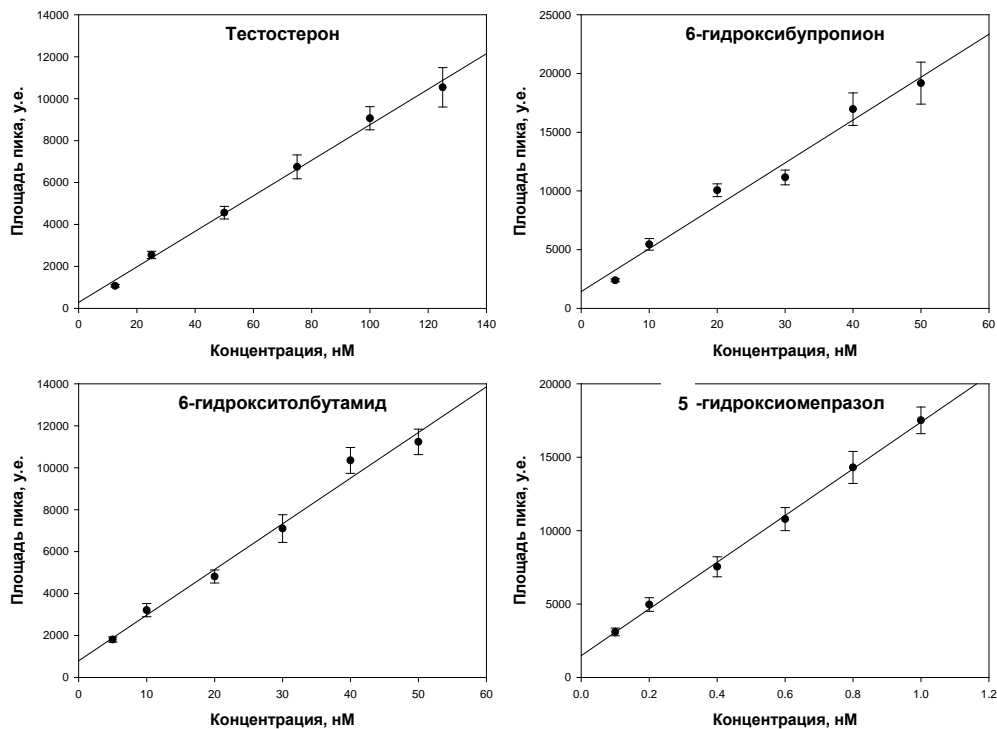


**Рис. 4.2.8.** Площади пиков субстратов цитохрома P450 и их метаболитов, полученные в ходе проведения предварительного эксперимента.

Как видно из рис. 4.2.8 для всех исследуемых веществ, кроме 6-бета-гидрокси тестостерона, наблюдалось наличие пиков достаточной интенсивности и площади. Мониторинг биотрансформации веществ по накоплению продуктов является более корректным подходом по сравнению с мониторингом по убыванию исходного соединения, поэтому для построения калибровочных кривых нами были выбраны лишь один из субстратов - тестостерон, поскольку продукт его гидроксилирования очень плохо идентифицируется - и продукты гидроксилирования всех остальных субстратов - 6-гидроксибупропион, 4-гидроксиitolбутамид и 5-гидроксиомепразол.

При построении калибровочных кривых и определения пределов обнаружения и пределов определения проводили анализ стандартных образцов, содержащих выбранные вещества в диапазоне концентраций, представленных на

Рис. 4.2.9. Как следует из представленных данных, калибровочные графики в выбранном диапазоне концентраций определяемых веществ линейны. Результаты вычисления пределов обнаружения (LOD) и определения (LOQ) на основе полученных калибровочных графиков представлены в таблице 4.2.3.



**Рис. 4.2.9.** Калибровочные графики определения тестостерона и продуктов гидроксилирования трех других субстратов по площади пика ВЭЖХ.

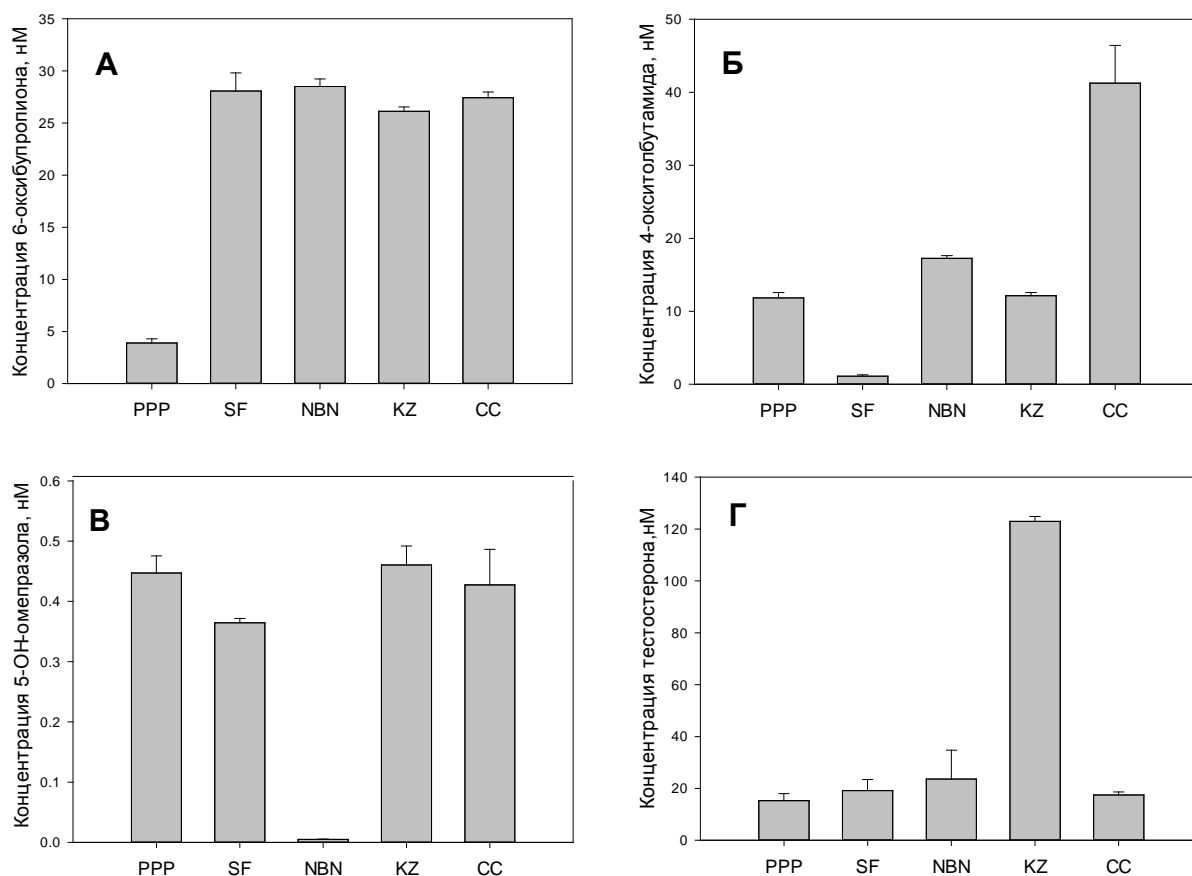
**Таблица 4.2.3.** Пределы определения и обнаружения исследуемых соединений, нМ.

Исследуемое соединение	LOD	LOQ
Тестостерон	10,93	33,15
6-гидроксibuпропион	5,41	16,41
4-гидрокситолбутиамид	2,16	6,53
5-гидроксиомепазол	0,05	0,16

#### 4.2.4. Апробация панели

После построения калибровочных графиков было выполнено изучение биотрансформации субстратов цитохрома P450 в присутствии панели ингибиторов. После проведения культивирования, образцы собирались и анализировались в соответствии с разработанным хроматомасс-спектрометрическим методом.

Результаты изучения биотрансформации субстратов цитохрома Р450 в присутствии ингибиторов представлены на Рис. 4.2.10.



**Рис. 4.2.10.** Эффект специфических ингибиторов отдельных изоформ цитохрома Р450 на концентрацию основных метаболитов бупропиона (А), толбутамида (Б), омепразола (В) и тестостерона (Г) при культивировании клеточной модели печени человека. PPP – специфический ингибитор СYP2B6, SF – сульфафеназол – ингибитор СYP2C9, NBN – (+)-N-3-бензил-нирванол – СYP2C19, KZ – кетоконазол – СYP3A4, CC – субстратная смесь в отсутствие ингибиторов (контроль).

Результаты изучения панели субстрат-ингибитор, представленные на Рис. 4.2.10, демонстрируют правомерность рассуждений по выбору каждой из пар. А именно, как видно из представленных данных, в случае изоформы цитохрома СYP2B6 добавление селективного ингибитора – 2-фенил-2-(1-пиперидинил)пропана приводило к значительному снижению концентрации метаболита бупропиона - 6-оксибупропиона (рис. 4.2.1 А). В случае цитохрома СYP2C9, специфическим субстратом которого является толбутамид, добавление всех ингибиторов приводило к снижению концентрации его метаболита - 6-



окситолбутамида, однако при добавлении селективного ингибитора CYP2C9-сульфафеназола - концентрация 6-окситолбутамида была не только ниже предела количественного определения, но и ниже предела обнаружения (рис. 4.2.1 Б). В случае CYP2C19 (рис. 4.2.1 В), добавление (+) - N - 3- бензилнирванола 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. 4.2.1 Г).

**Таблица 4.2.4.** Панель субстрат/ингибитор для разработки методики 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, мкМ	PPP 30 2-фенил-2-(1-пиперидинил)-пропан	SF 5 сульфафеназол	NBN 1 (+)-N-3-бензилнирванол	KZ 1 кетоконазол

Таким образом, была разработана специфическая панель субстрат/ингибитор для оценки индивидуальной активности четырех наиболее важных изоферментов цитохрома P450. Как видно из представленных в таблице 4.2.4 данных, четыре изофермента цитохрома P450, выбранные для создания панели, составляют порядка 70 % от экспрессируемых форм P450 и метаболизируют около 70% всех лекарственных препаратов. Разработка методики включала в себя подбор специфических субстратов и специфичных ингибиторов изоформ цитохрома P450, оптимизацию масс-спектрометрических параметров для детектирования данных соединений и их метаболитов, оптимизацию времени культивирования с

субстратной смесью и ингибиторами, и вычисление пределов обнаружения и количественного определения.

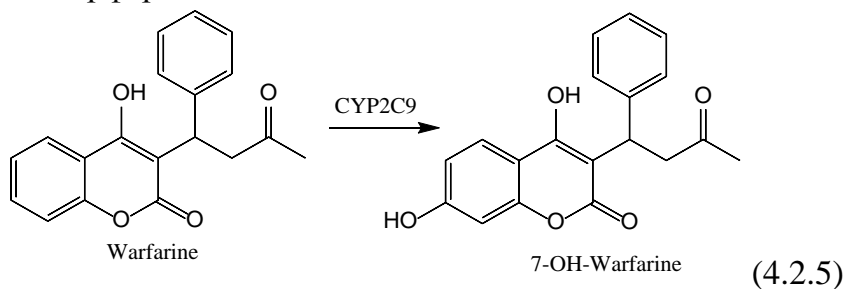
#### 4.2.5. Валидация панели с помощью варфарина и дазатиниба

##### 4.2.5.1. Характеристика препаратов, выбранных для валидации панели

Целью данной части работы являлась валидация разработанной панели для двух хорошо известных лекарственных средств варфарина и дазатиниба, а именно, установление природы изоферментов P450, метаболизирующих указанные соединения, и выявление межлекарственного взаимодействия между тестируемыми соединениями и субстратами панели.

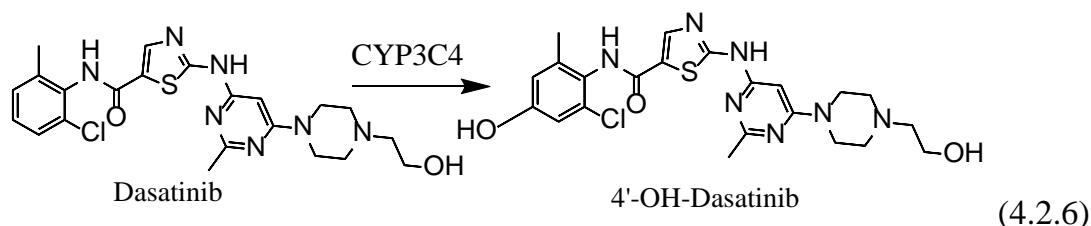
**Варфарин** – антикоагулянт непрямого действия, производное кумарина. Варфарин представляет собой рацемическую смесь двух активных энантиомеров — R- и S-форм, каждая из которых выводится из организма разными путями. S-варфарин в пять раз сильнее R-изомера в отношении антагонизма к витамину К. Показаниями для применения варфарина являются: фибрилляция предсердий, наличие искусственных клапанов сердца, тромбоз глубоких вен и ТЭЛА, для лечения антифосфолипидного синдрома. Иногда может быть использован после инфаркта миокарда, но он гораздо менее эффективен в предотвращении новых тромбозов в коронарных артериях. Профилактика тромбообразования в артериях обычно проводится в сочетании с антитромбоцитарными препаратами (например, аспирин, клопидогрел), которые обладают механизмом действия, отличным от такового у варфарина (который обычно не влияет на функцию тромбоцитов).

Активность варфарина частично определяется генетическими факторами, а именно. полиморфизмами в генах VKORC1 и CYP2C9. Метаболитом варфарина является 7-гидроксиварфарин.



**Дазатиниб** – это противоопухолевое средство направленного действия, ингибитор протеинтирозинкиназы. Дазатиниб в наномолярных концентрациях ингибирует следующие тирозинкиназы: BCR-ABL, семейство SRC (SRC, LCK, YES, FYN), c-KIT, ERHA2 и PDGFR. применяется в лечении хронического миелолейкоза при невозможности применять иматиниб, остром лимфобластном лейкозе с наличием филадельфийской хромосомы (Ph+). Кроме того, препарат имеет высокую эффективность при метастатической меланоме.

Дазатиниб был разработан в 2006 году в рамках процесса поиска препарата, более эффективного, чем иматиниб (в культуре дазатиниб в 325 раз активнее иматиниба и в 16 раз активнее нилотиниба), применявшегося при хроническом лейкозе. С помощью моделирования установлено, что дазатиниб связывается со многими формами киназы ABL. Активность дазатиниба определяется в том числе активностью CYP3A4. Метаболитом дазатиниба является 4'-гидрокси дазатиниб.



#### 4.2.5.2. Оптимизация детектирования метаболитов варфарина и дазатиниба

Поскольку выбранные вещества являются хорошо изученными и метаболиты известны, на первом этапе проводили оптимизацию масс-спектрометрического детектирования: массы исходного иона, энергии соударения и массы дочернего иона. Результаты оптимизации представлены на рисунках 4.2.11-4.2.14 и в таблице 4.2.5.

Следующим этапом проводили хроматомасс-спектрометрический анализ индивидуальных веществ. Для этого проводили инъекцию 20 мкл рабочих образцов варфарина, дазатиниба, 7-гидроксиварфарина и 4'-гидроксидазатиниба при хроматографических условиях, указанных выше для субстратов панели.

**Таблица 4.2.5.** Список МС/МС переходов, использованных для детектирования продуктов биотрансформации исследуемых лекарственных веществ.

<b>Соединение</b>	<b>m/z иона-прекурсора</b>	<b>m/z фрагмента</b>	<b>Энергия соударения, эВ</b>
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

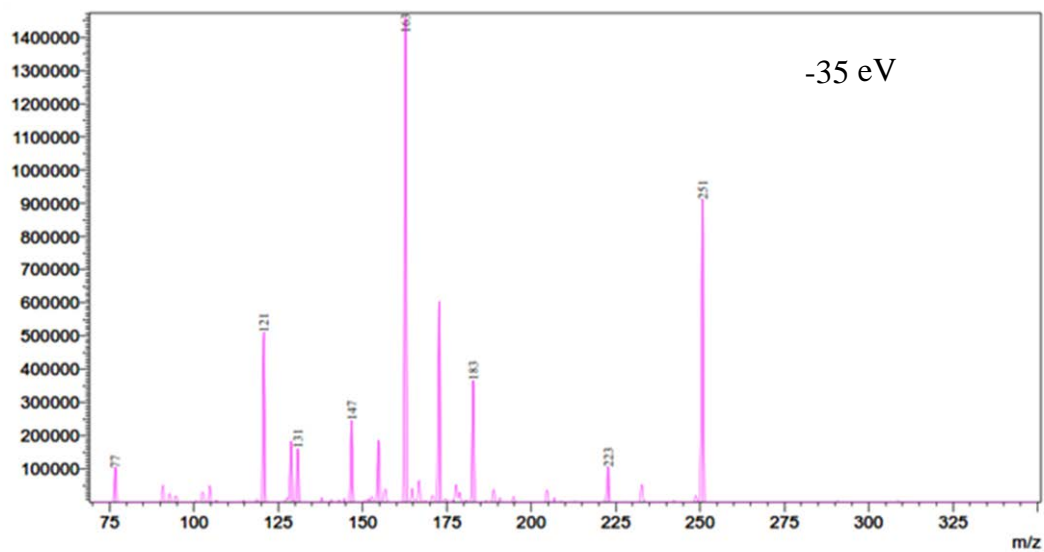
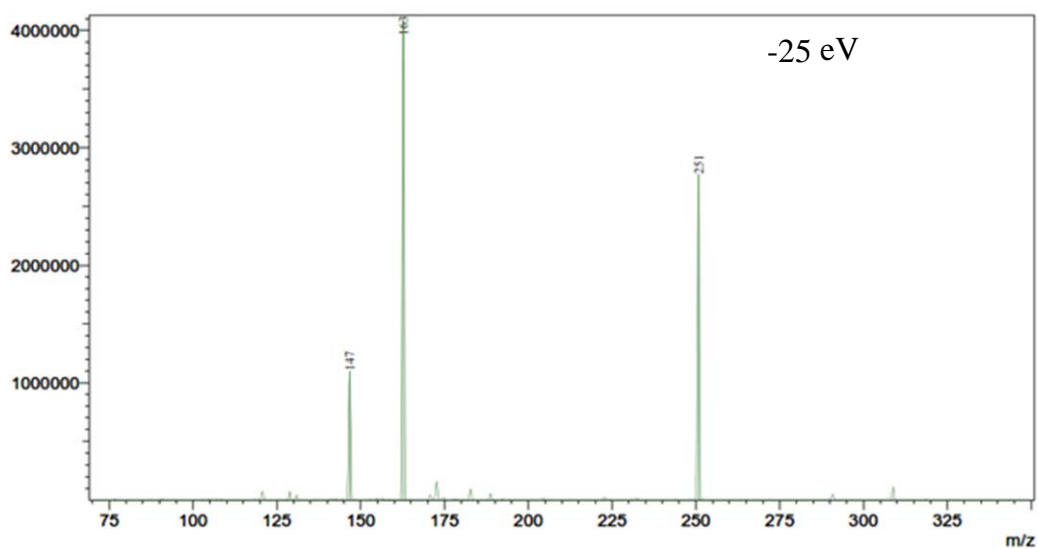
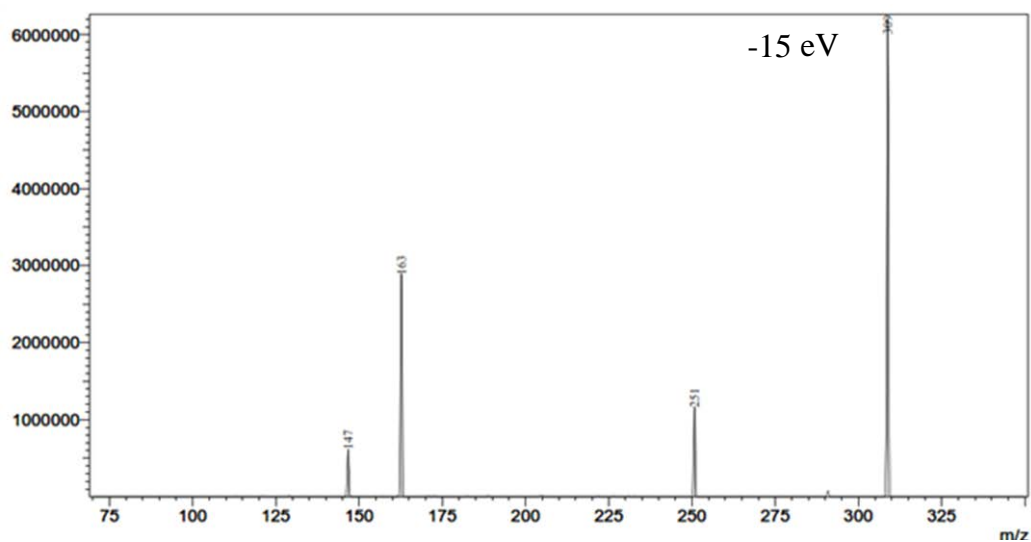


Рис. 4.2.11. Масс-спектр варфарина при различных энергиях соударений.

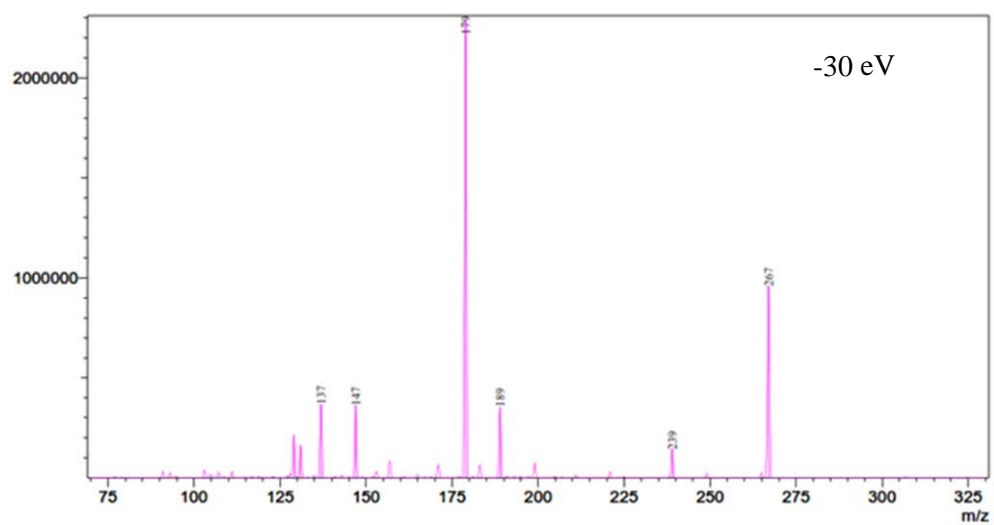
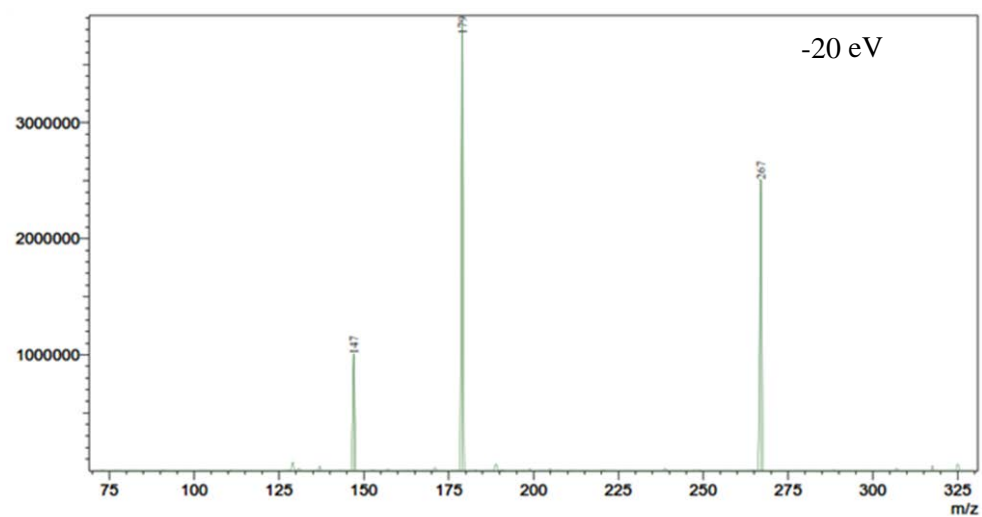
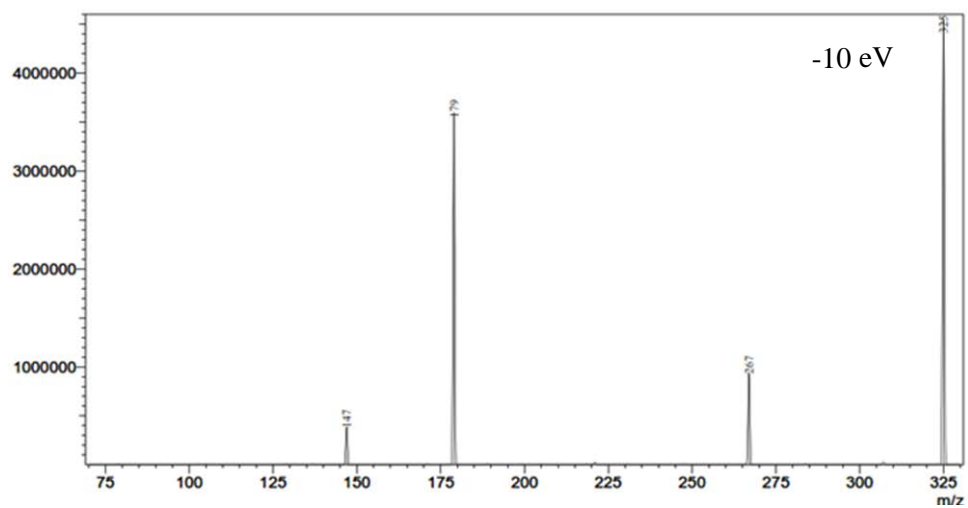


Рис. 4.2.12. Масс-спектр 7-гидроксикаварфарина при различных энергиях соударений.

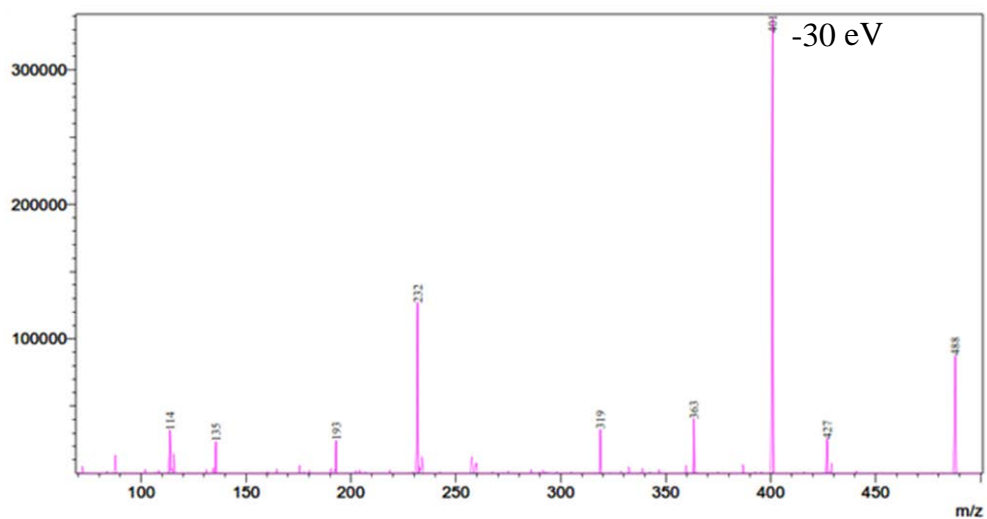
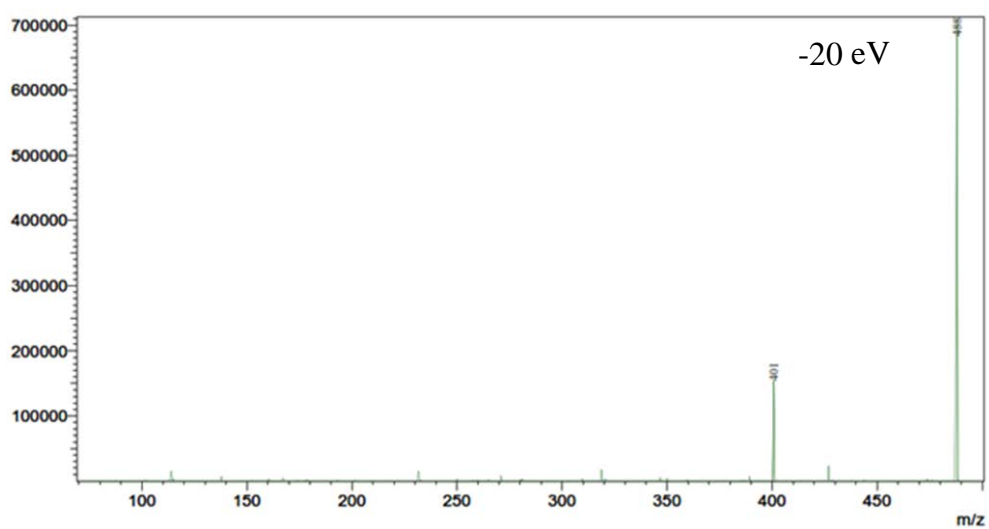
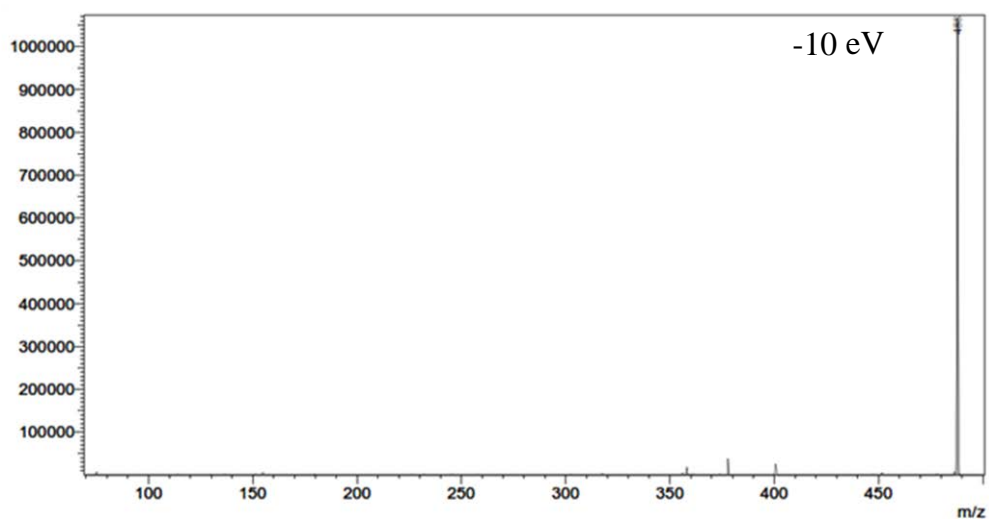


Рис. 4.2.13. Масс-спектр дазатиниба при различных энергиях соударений.

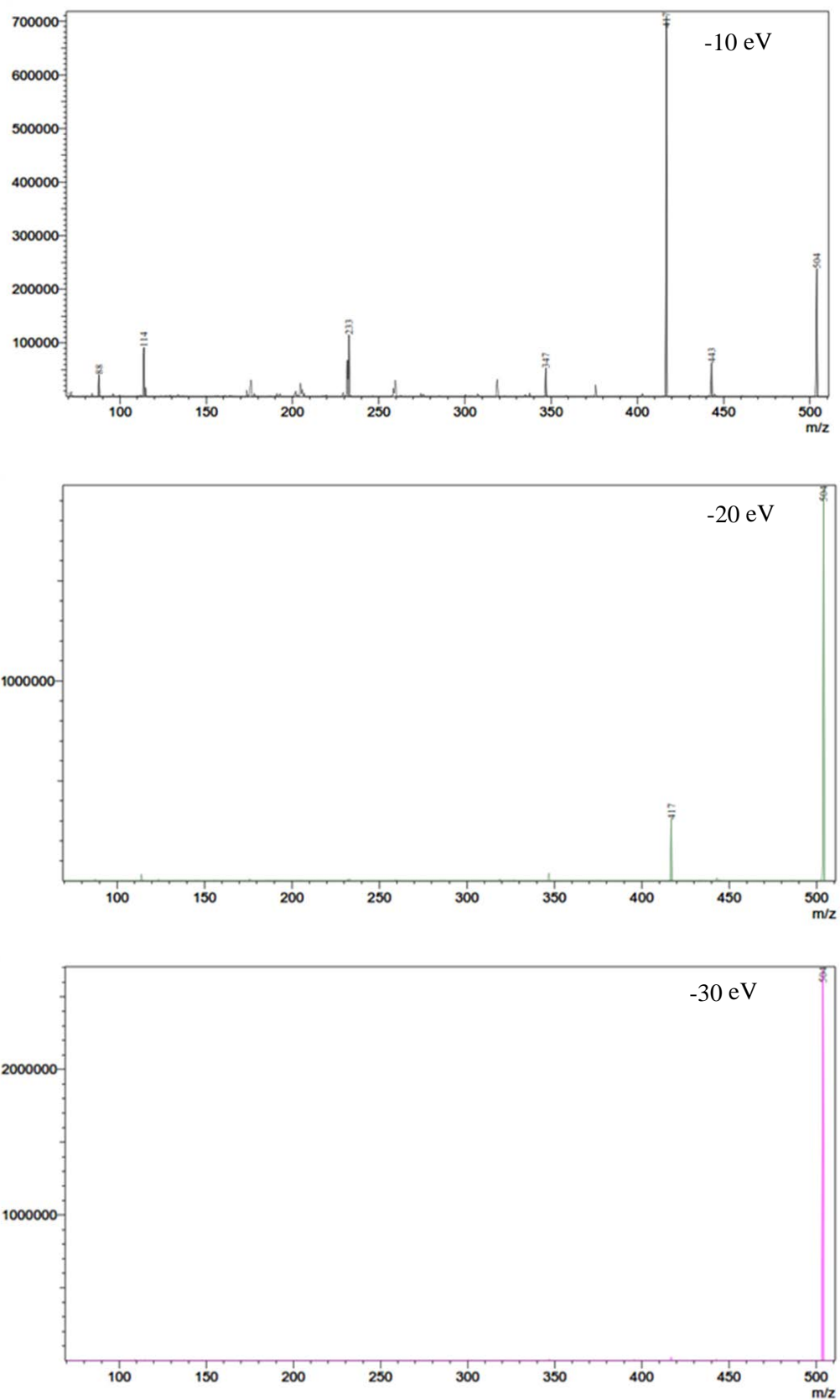
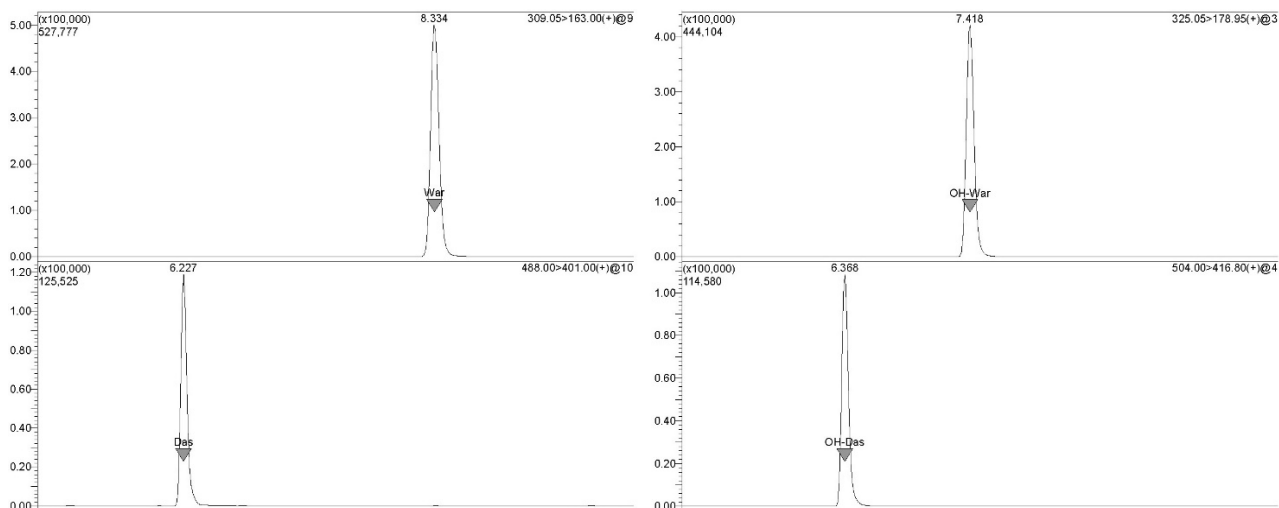


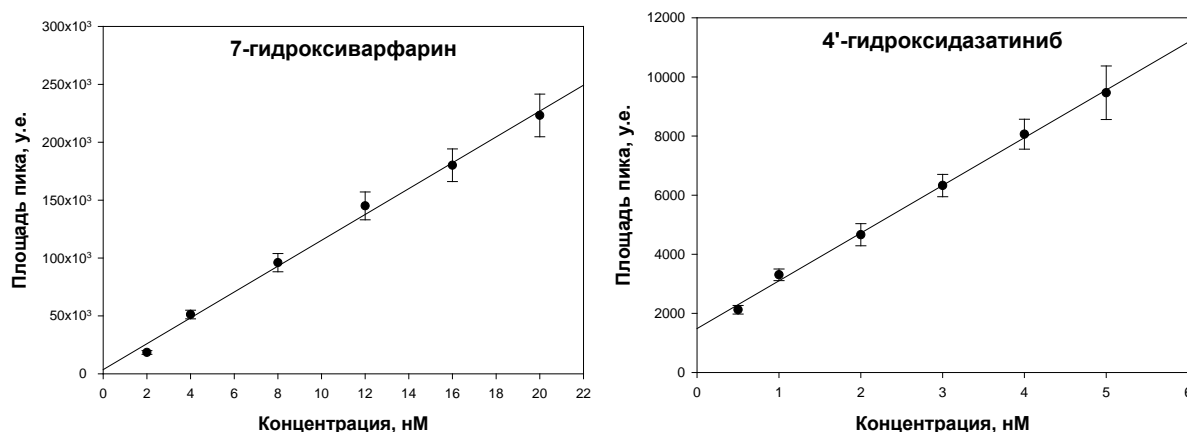
Рис. 4.2.14. Масс-спектр 4'-гидроксидазатиниба при различных энергиях соударений.





**Рис. 4.2.15.** Хроматограммы дазатиниба, варфарина, 4'-гидроксидазатиниба и 7- гидроксиварфарина.

Как видно из хроматограмм, представленных на рис. 4.2.15, субстраты и метаболиты варфарина и дазатиниба хорошо разрешаются в подобранных условиях. На калибровочных графиках наблюдается линейная зависимость в диапазонах, показанных на Рис. 4.2.16. Таким образом, детектирование и количественное определение продуктов биотрансформации варфарина были оптимизированы для целей настоящего исследования.



**Рис. 4.2.16.** Калибровочные графики 7-гидроксиварфарина и 4'-гидроксидазатиниба.

### 4.2.5.3. Валидация разработанной панели субстрат-ингибитор

Изучение биотрансформации дазатиниба и варфарина с использованием разработанной панели субстрат-ингибитор цитохромов Р450 проводили как

описано в Таблице 3.2.3 (Методы). Результаты определения концентраций метаболитов варфарина и дазатиниба в присутствии ингибиторов разработанной панели и влияние варфарина и дазатиниба на биотрансформацию субстратов панели представлены в Таблицах 4.2.6 и 4.2.7.

**Таблица. 4.2.6.** Ингибирование биотрансформации варфарина и дазатиниба в присутствии панели ингибиторов.

Образец	Средняя концентрация 7-гидроксиварфарина, нМ	Средняя концентрация 4'-гидроксидазатиниба, нМ
1 мкМ исследуемого соединения, 30 мкМ PPP	6,75±0,49	1,62±0,07
1 мкМ исследуемого соединения, 5 мкМ сульфафеназола	*0,10±0,04	1,54±0,08
1 мкМ исследуемого соединения, 1 мкМ NBN	5,98±0,08	1,60±0,16
1 мкМ исследуемого соединения, 1 мкМ кетоконазола	5,87±0,27	*0,10±0,09
1 мкМ исследуемого соединения, 10 мкМ бупропиона, 10 мкМ тестостерона, 40 мкМ толбутамида, 20 мкМ омепразола	5,95±0,17	1,57±0,06
1 мкМ исследуемого соединения	6,83±0,07	1,51±0,09

\* значение находится ниже предела количественного определения

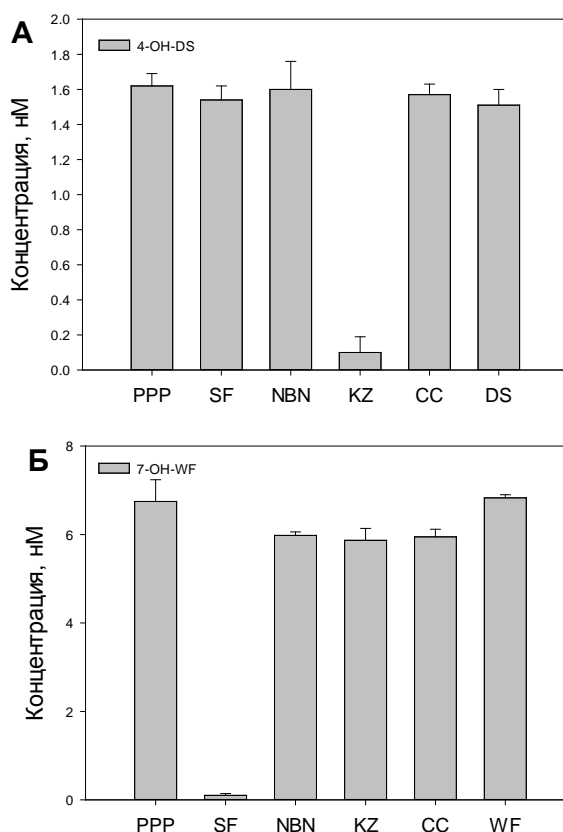
**Таблица 4.2.7.** Влияние варфарина и дазатиниба на биотрансформацию субстратов панели

Соединение	Средняя концентрация в присутствии 1 мкМ варфарина, нМ	Средняя концентрация в присутствии 1 мкМ дазатиниба, нМ	Средняя концентрация в отсутствие исследуемого соединения, нМ
Тестостерон	**29,63±5,66	**34,06±12,70	**17,50±1,17
6- гидроксипропион	32,99±1,05	32,87±0,61	31,41±0,61
4- гидрокситолбутамид	14,63±2,27	14,23±0,11	41,55±5,24
5- гидроксипропион	0,27±0,04	**0,12±0,02	0,43±0,06

\*\*Значение находится ниже предела количественного определения.

Как видно из представленных в Таблице 4.2.6 результатов определения концентрации основных метаболитов, в присутствии сульфафеназола, концентрация продукта гидроксилирования варфарина находится ниже предела определения, а в присутствии кетоконазола – ниже предела обнаружения находится

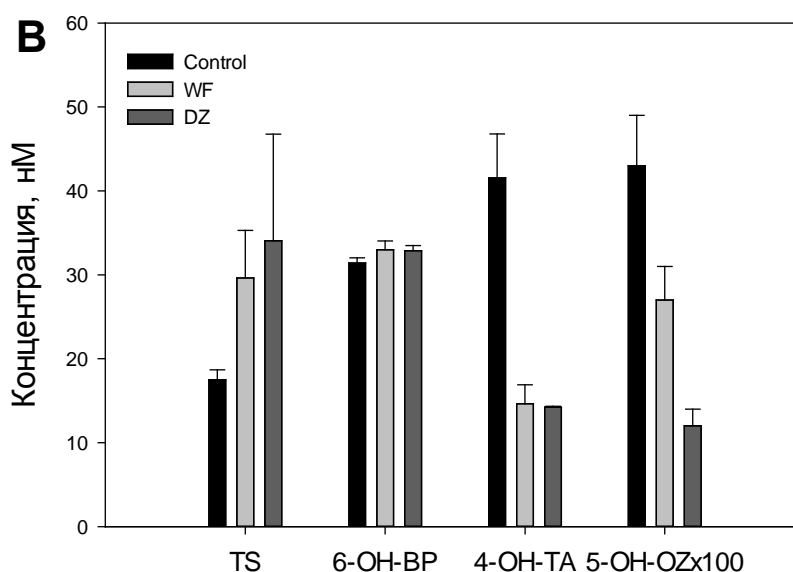
продукт гидроксилирования дазатиниба, иными словами, как суммировано на Рис.1, селективным ингибитором биотрансформации варфарина является сульфафеназол, в то время как для дазатиниба таковым является кетоконазол. Скорость биотрансформации дазатиниба составляет  $0,11 \text{ фМ} \times \text{клетка}^{-1} \times \text{час}^{-1}$ , а для варфарина составляет  $0,48 \text{ фМ} \times \text{клетка}^{-1} \times \text{час}^{-1}$ .



**Рис.4.2.17.** 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 CYP2B6B, SF – ингибитор CYP2C9, NBN – ингибитор CYP2C19, KZ – ингибитор CYP3A4. Контроли: CC – субстратная смесь в отсутствие ингибиторов; DS - дазатиниб (А) и WF– варфарин (Б) в отсутствие субстратной смеси.

Как следует из Таблицы 4.2.7, варфарин и дазатиниб являются ингибиторами биотрансформации толбутамида, а дазатиниб - ингибитором биотрансформации омепразола. При этом оба препарата не оказывают влияния на биотрансформацию тестостерона и бупропиона (Таблица 4.2.6, 4.2.7, Рис. 4.2.18). На основании данных Рис. 4.2.18 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 [131,132,66]. В случае дазатиниба, так же нежелателен совместный прием с препаратами, биотрансформация которых происходит с участием цитохрома CYP2C9, что согласуется с литературными данными [133]. Помимо этого, поскольку наблюдается незначительное увеличение концентрации тестостерона, возможно предположить взаимодействие дазатиниба с другими лекарствами, метаболизируемыми цитохромом CYP3A4 [134].



**Рис 4.2.18.** Концентрация субстратов (TS - тестостерон) и метаболитов (6-ОН-ВР - 6-оксибупропин, 4-ОН-ТА - 4-окситолбутамид, 5-ОН-ОЗ - 5-оксиомепразол) после 24 ч инкубации разработанной панели в присутствии 1 мкМ варфарина или дазатиниба. Концентрация 5-оксиомепразола показана с увеличением в 100 раз.

Для оценки качества и воспроизводимости результатов методики были проведены многоцентровые испытания, в которых принимали участие две лаборатории: в Техническом университете (Берлин, Германия) и в Университетской клинике (Гамбург-Эппендорф, Германия). Испытания включали в себя эксперименты по изучению биотрансформации дазатиниба и варфарина по предоставленной методике с использованием различной приборной базы. Было показано, что во всех случаях, подобранные концентрации субстратов и ингибиторов цитохрома P450, а также параметров культивирования и инкубации позволяют определять пути биотрансформации лекарственных средств. 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. Данную панель можно в будущем дополнить новыми комбинациями субстрат-ингибитор с целью ее дальнейшего усовершенствования и покрытия всего спектра изоферментов P450.

### **4.3. ДОКЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ГЕПАТОТОКСИЧНОСТИ КАНДИДАТОВ-АНТГИПОКСАНТОВ**

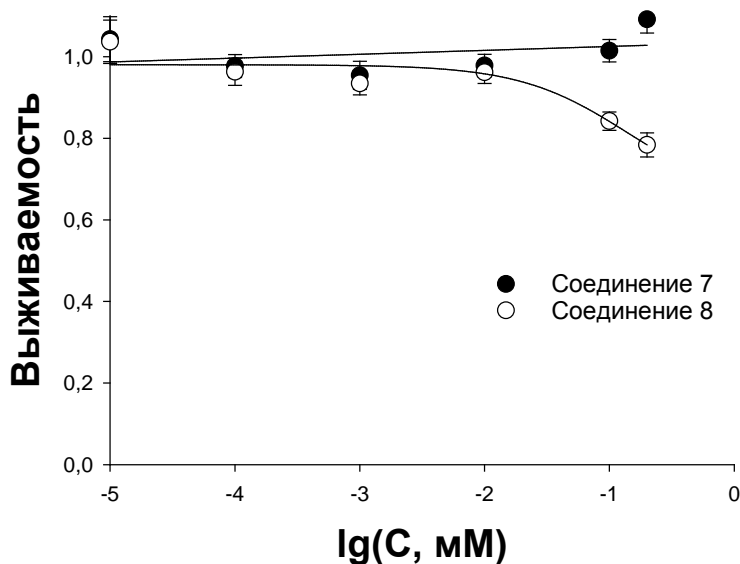
#### **4.3.1. Гепатотоксичность на дифференцированной линии *HepaRG***

Для успешного предсказания гепатотоксичности разрабатываемых лекарственных средств наиболее перспективными считаются альтернативные *in vitro* тесты с использованием максимально адекватных клеточных моделей печени человека, культивируемых в условиях микроциркуляции питательной среды [8,135,7]. Поэтому в настоящей работе исследование гепатотоксичности было выполнено с использованием клеток линии *HepaRG*, обладающих уровнем экспрессии изоформ цитохрома P450 близким к наблюдаемому в первичных гепатоцитах.

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*.

Как следует из данных на Рис. 4.3.1, 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 нетоксичными в диапазоне биологически активных концентраций. При этом скаффолд соединения 7 заслуживает внимания, поскольку его производные могут в

перспективе оказаться менее токсичным, чем производные соединения 8. По данным (Рис. 4.3.1), оценочное значение при аппроксимации сигмоидной функцией, полулетальная концентрация ( $LC_{50}$ ) составляет  $600 \pm 300$  мкМ для соединения 8.



**Рис. 4.3.1.** Выживаемость гепатоцитов *HepaRG* в присутствии соединений 7 и 8 при инкубировании в течение 24 ч в условиях циркуляции питательной среды. Выживаемость определяли колориметрическим способом, МТТ-тест (см. Методы)

#### 4.3.2. Идентификация изоформ Р450, участвующих в окислении исследуемых соединений

Знание путей биотрансформации лекарственных соединений является принципиальным для предотвращения межлекарственных взаимодействий. Одним из способов определения изоформ цитохрома Р450, вовлеченных в метаболизм конкретного соединения, является метод последовательного специфического ингибирования с использованием панели субстрат-ингибитор, один из вариантов которой разработан в данной работе. Как и в случае валидации панели, первый этап состоял в оптимизации масс-спектрометрического детектирования новых потенциальных антигипоксикантов: массы исходного иона, энергии соударения и массы дочернего иона. Результаты оптимизации представлены на рисунках 4.3.2 – 4.3.5 и в таблице 4.3.1.

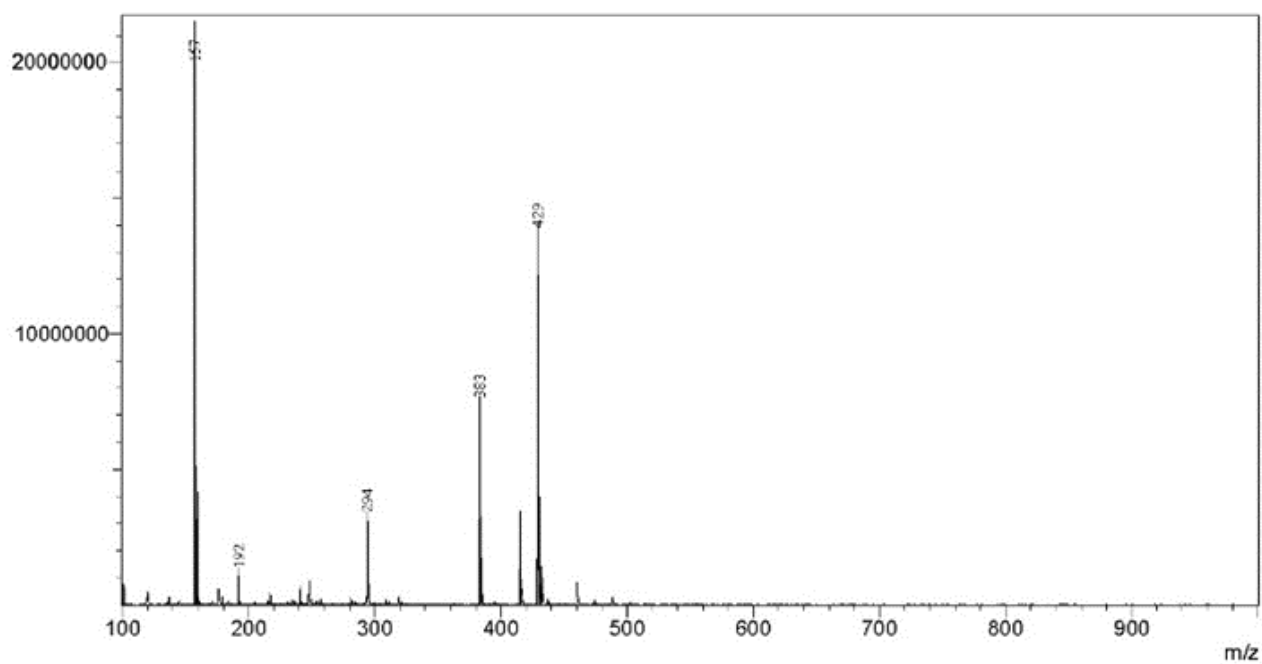


Рис. 4.3.2. Масс-спектр соединения 7.

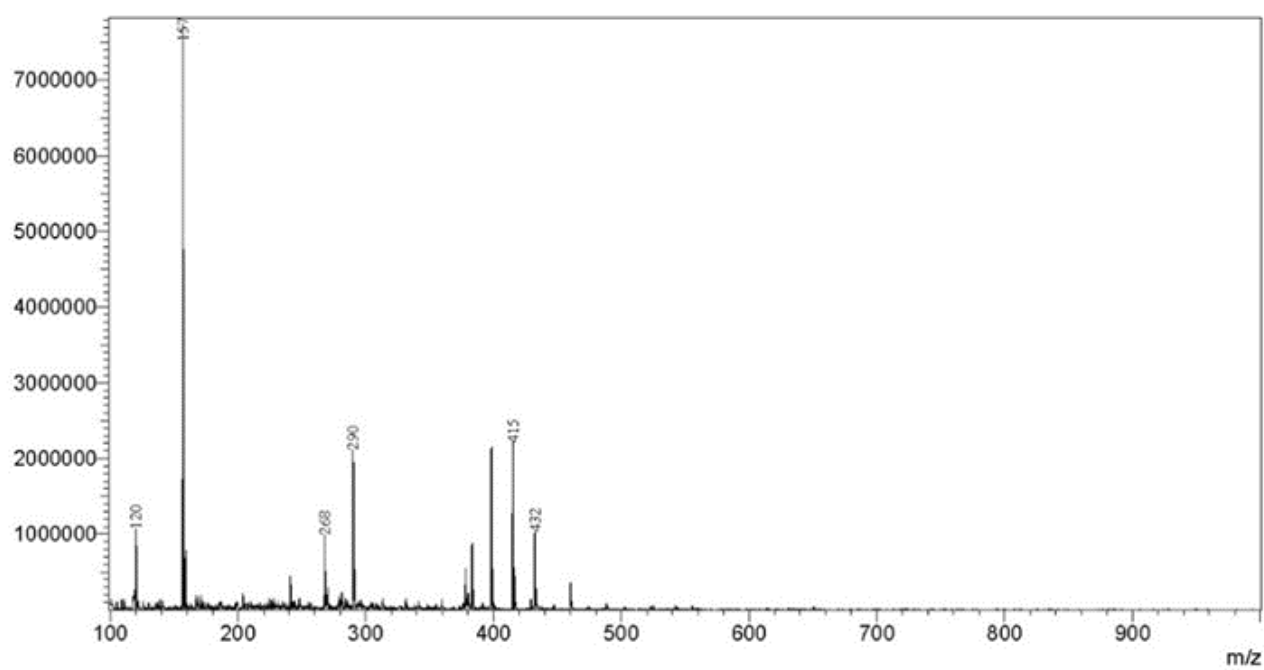
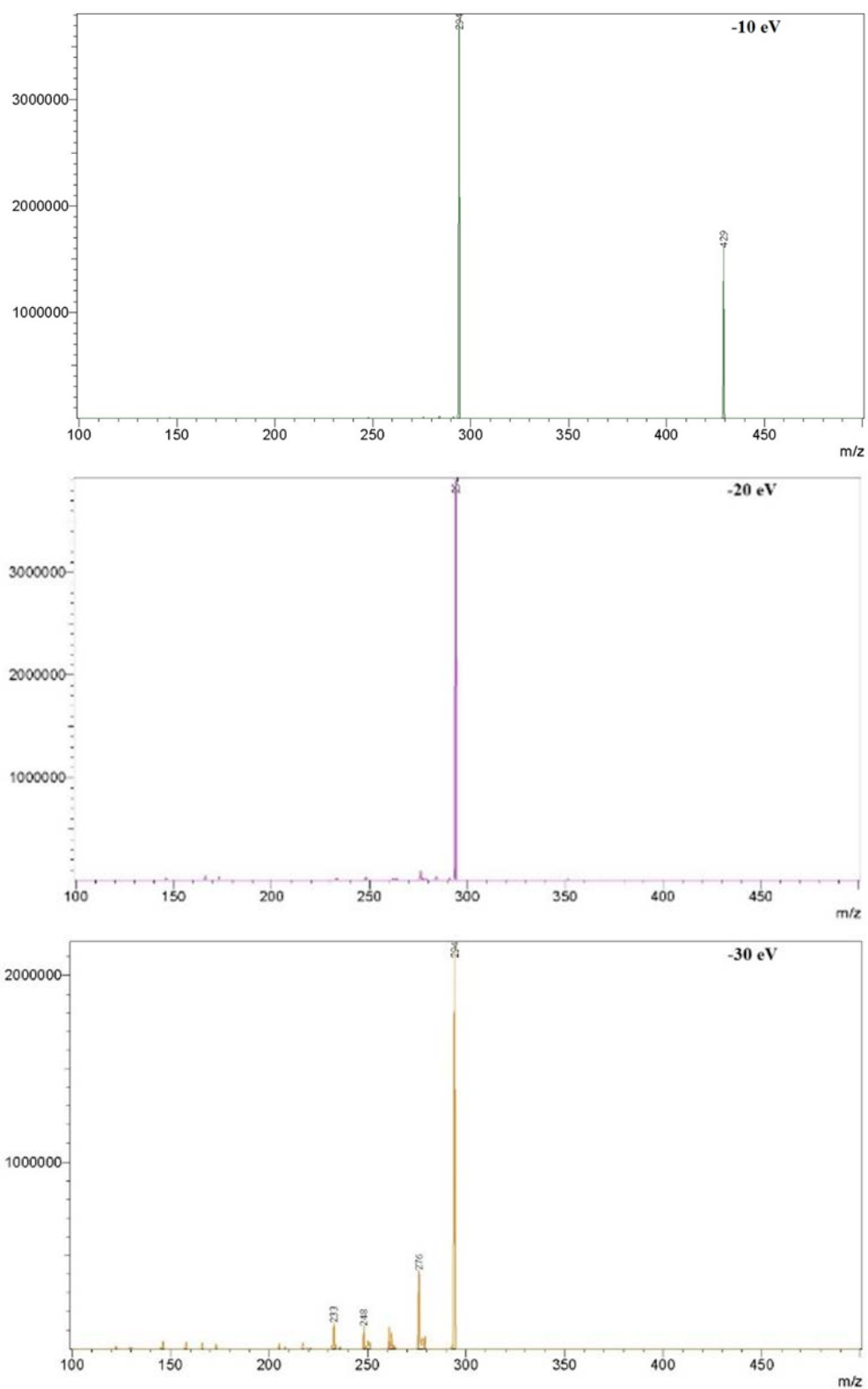
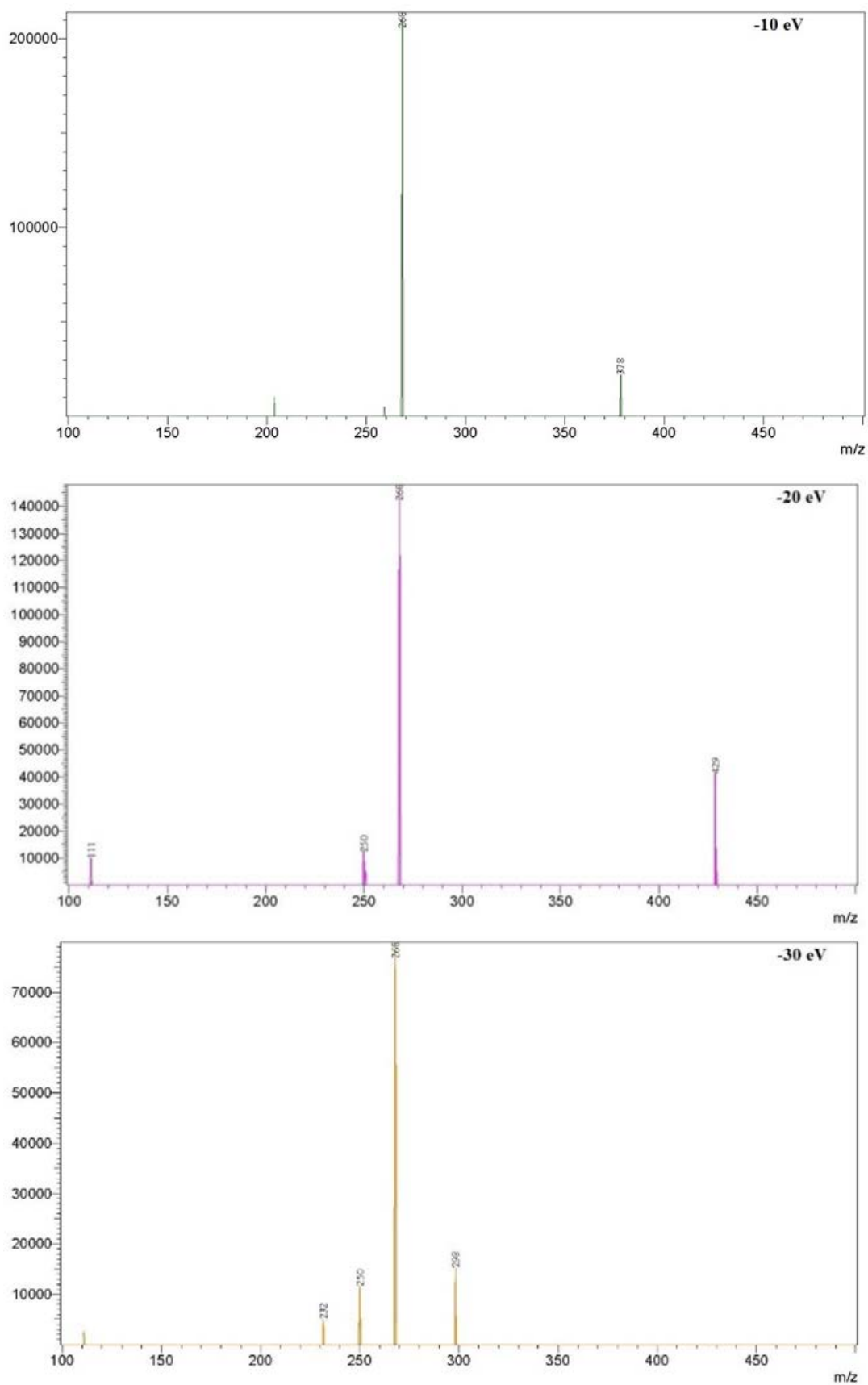


Рис. 4.3.3. Масс-спектр соединения 8.



**Рис. 4.3.4** Масс-спектр продуктов распада соединения 7 при различных энергиях соударений.



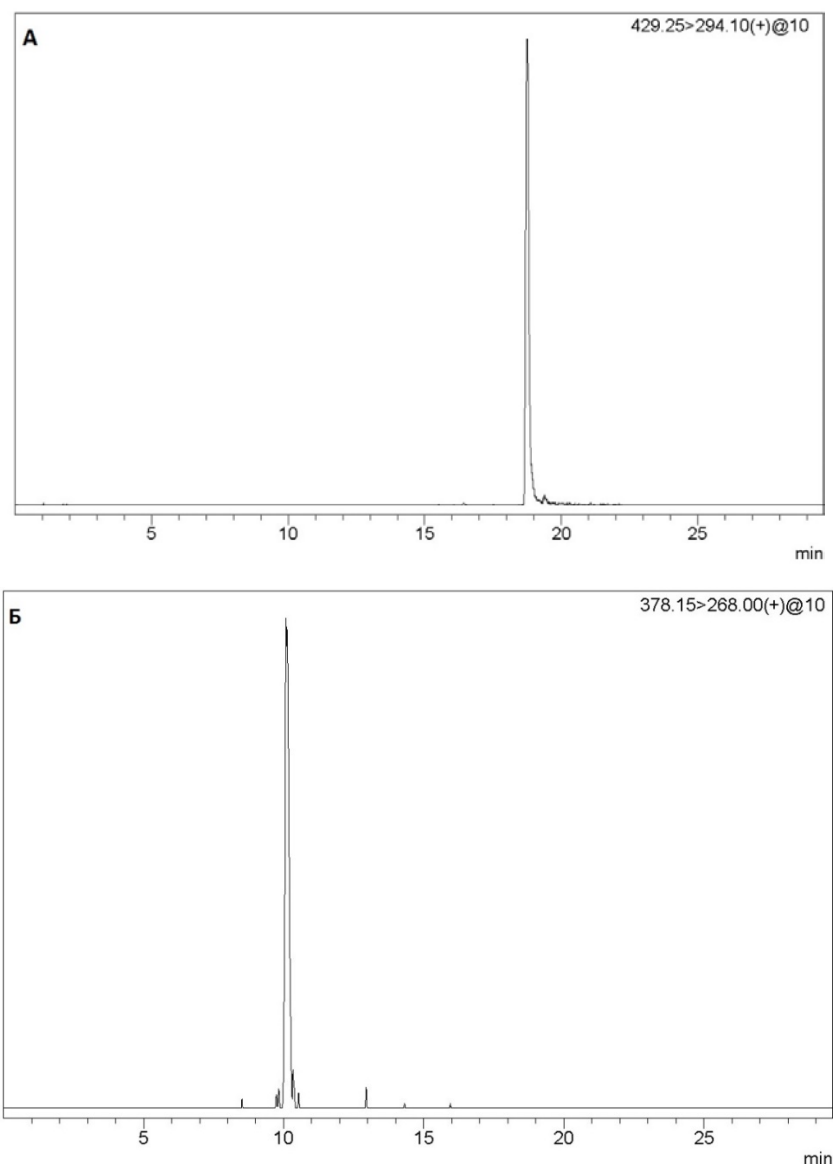


**Рис 4.3.5.** Масс-спектр продуктов распада соединения 8 при различных энергиях соударений.

**Таблица 4.3.1.** Список МС/МС переходов, использованных для детектирования соединений 7 и 8.

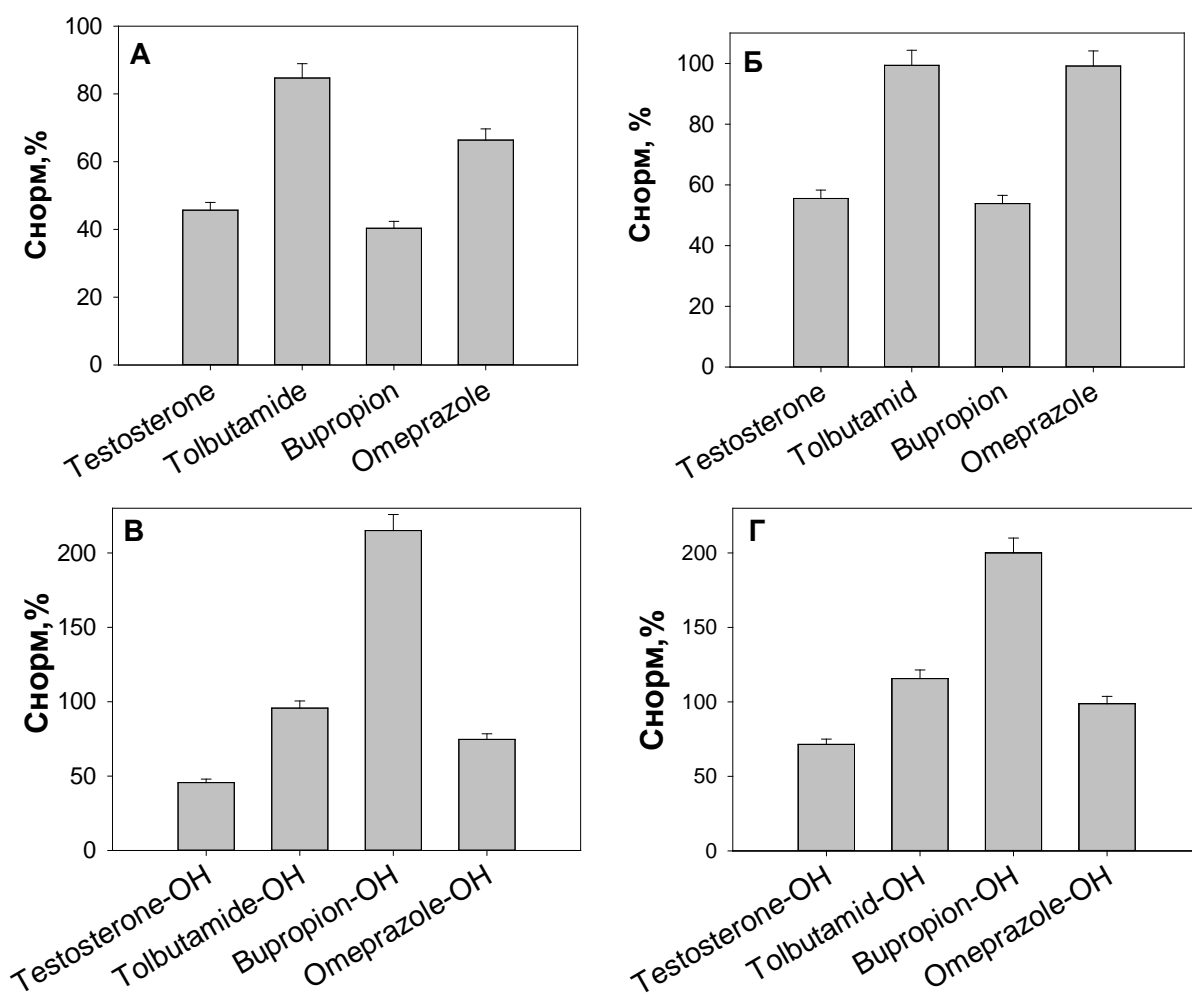
Образец	m/z иона-прекурсора	m/z фрагмента	Энергия соударения, эВ
Соединение 7	429,25	294,10	-10
Соединение 8	378,15	268,00	-10

Как видно из представленных данных, максимальный уровень сигнала достигался при энергии соударения -10 эВ. После проведения оптимизации условий масс-спектрометрии, был проведен хроматографический анализ исследуемых соединений при условиях, указанных в разделе 3.2.9. Полученные хроматограммы представлены на Рис. 4.3.6.



**Рис 4.3.6.** Хроматограммы соединения 7 (А) и соединения 8 (Б).

После проведения оптимизации условий было выполнено изучение биотрансформации исследуемых соединений и их влияния на метаболизм субстратной смеси в присутствии субстратов цитохрома Р450 и ингибиторов (Таблица 4.3.2). Культивирование образцов клеточной модели печени человека проводили при условиях, указанных в разделе 3.2.7. Результат изучения влияния соединений 7 и 8 на метаболизм субстратной смеси представлен на рис. 4.3.7.



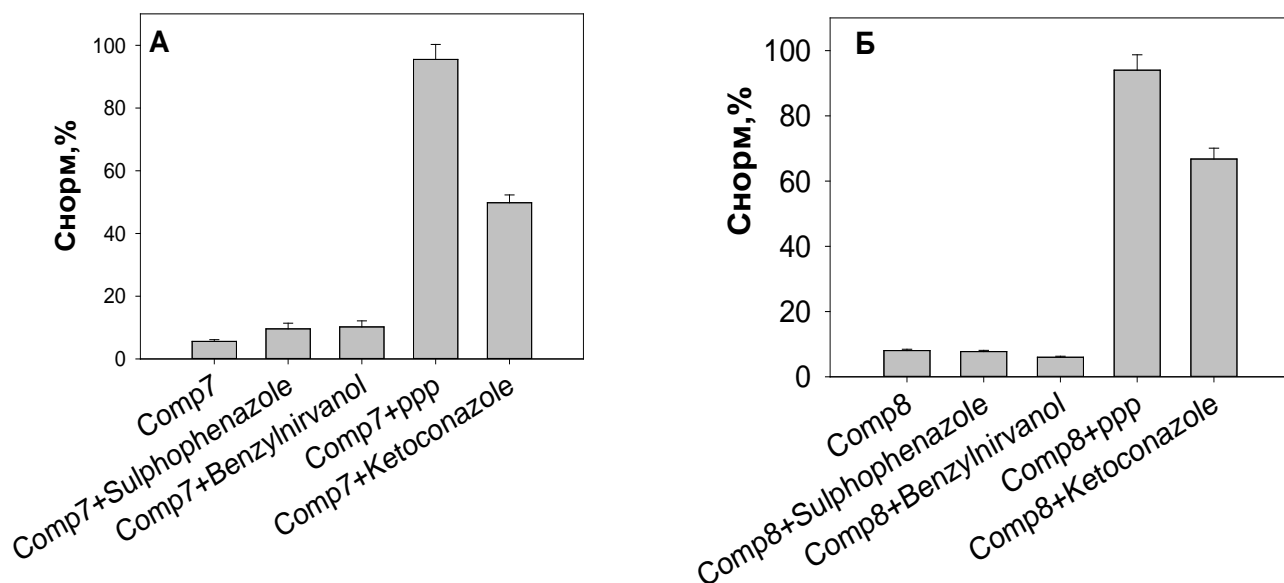
**Рис. 4.3.7.** Влияние соединений 7 и 8 на убыль субстратов панели (А и Б) и образование гидроксилированных метаболитов субстратов панели (В и Г) при совместной инкубации в МБР в течение 24 ч.

Как следует из данных, представленных на рис. 4.3.7, в присутствии обоих соединений концентрация бупропиона и тестостерона уменьшается вдвое (Рис. 4.3.7 А и Б), иными словами, их потребление сильно активизируется, что

позволяет предполагать индукцию изоформ цитохрома, катализирующих гидроксилирование бупропиона и тестостерона, изучаемыми соединениями.

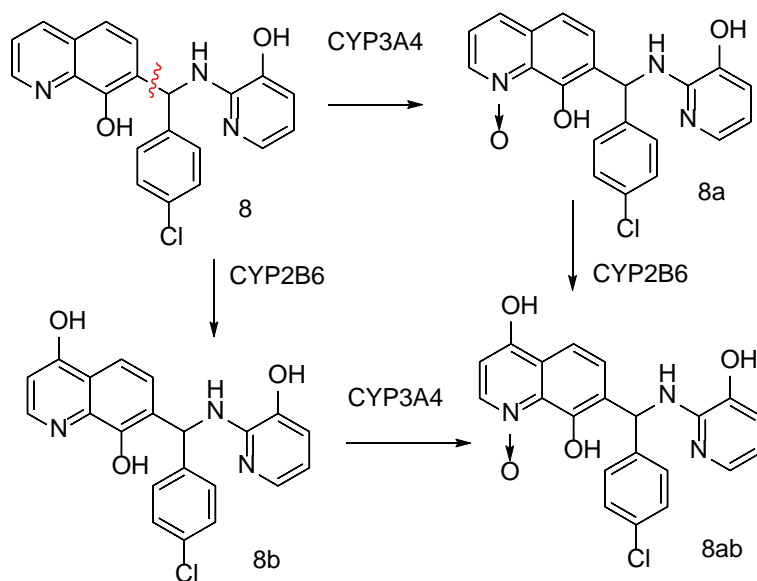
Для идентификации природы индуцируемых цитохромов было проверено как влияют изучаемые соединения на основные метаболиты субстратов панели (Рис. 4.3.7 В и Г). Для обоих изучаемых соединений наблюдалось резкое увеличение концентрации продукта гидроксилирования бупропиона – субстрата CYP2B6, но не наблюдалось 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.

Проведение ингибиторного анализа на разработанной панели (Рис. 4.3.8) демонстрирует эффективное, практически полное потребление изучаемого соединения, которое в значительной степени ингибируется только PPP 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 P450 под действием субстратов гидроксилирования – хорошо известный в литературе феномен. При масс-спектрометрическом анализе удастся определить только массы продуктов (соответствующих фрагментов), но не положение гидроксилирования (местонахождение кислорода), которое можно предсказать исходя из литературных данных по гидроксилированию оксихинолинов цитохромами печени (на основе которых работает программа ChemAxon Metabolizer).



**Рис. 4.3.8.** Влияние ингибиторов разработанной панели на потребление соединений 7 (А) и 8 (Б).

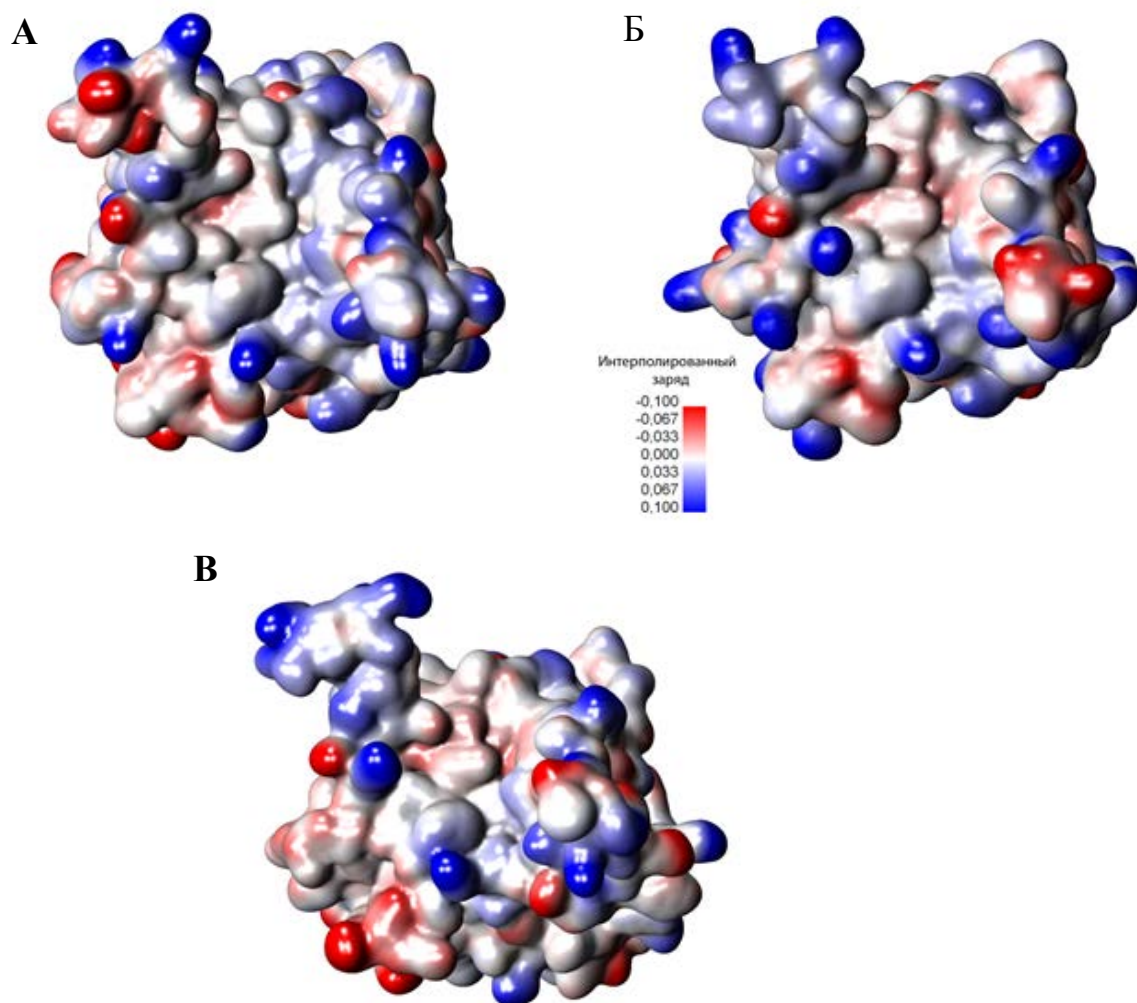
В результате апробации панели была предложена схема биотрансформации изучаемых соединений (Рис. 4.3.9), а именно оба препарата гидроксилируются цитохромами CYP2B6 и CYP3A4 с образованием продуктов гидроксилирования, соответствующих описанному в литературе для гидроксилирования оксихинолинов – 4-гидроксипроизводного (для CYP2B6) и N-оксида (CYP3A4), а также продукта двойного гидроксилирования обоими цитохромами.



**Рис. 4.3.9.** Схема биотрансформации изучаемых соединений, предложенная на основании данных апробации панели и использования программы ChemAxon Metabolizer. Продукт 8a – N-оксид, 8b – 4-гидроксипроизводное исходного соединения 8. Красным обозначено отщепление фрагмента при MS-анализе.

Таким образом, было показано, что в случае соединения 7 токсичность отсутствует вплоть до 200 мкМ концентраций, в то время как для соединения 8 наблюдается незначительная токсичность (оценочное значение  $LC_{50}$  составляет более 600 мкМ). Другими словами, оба препарата в диапазоне концентраций, превышающем на порядок диапазон концентраций проявления биологической активности, являются нетоксичными для печени человека. Это является исключительно обнадеживающим результатом для дальнейшей разработки и оптимизации ингибиторов данной структуры, а именно, наличие разветвленного заместителя (в англоязычной литературе “branched tail” – разветвленный «хвост») в седьмом положении по типу соединения 7 или 8 дает возможность многочисленных химических манипуляций.

Активные центры всех трех изоформ НИФ пролилгидроксилазы практически одинаковы (Рис. 4.3.10), однако вход в активный центр формируется различными по заряду остатками, что в перспективе, при оптимизации структуры разветвленного «хвоста», может позволить разработать изоформ-специфические ингибиторы фермента на основе изучаемых в данной работе структур [137]. В настоящее время проводятся исследования по влиянию длины и химической природы линкера в группе соединений типа 7, а также по влиянию заместителей в ароматических кольцах в группе соединения типа 7 и 8 на эффективность активации нового ряда клеточных репортеров, т.н. двойных репортеров, экспрессирующих различные изоформы белка НИФ в комбинации с каждой из изоформ НИФ РНД, с целью разработки изоформ-специфических ингибиторов.



**Рис. 4.3.10.** Изоформы НIF пролилгидроксилазы. Использована кристаллическая структура изоформы 2 НIF PHD человека, 2G19.pdb (А) и модели изоформ 1 (Б) и 3 (В), построенные методом гомологического моделирования и любезно предоставленные к.х.н. Хушпульяном Д.М. Красным и синим цветом показаны отрицательный и положительный заряд поверхности, соответственно.

## 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Изучение гепатотоксичности для человека на самой ранней стадии разработки препарата является исключительно актуальной задачей, в связи плохой предсказуемостью токсичности на основании животных моделей. В настоящем исследовании мы изучили два потенциальных антигипоксических препарата, ингибирующих NIF пролилгидроксилазу человека и находящихся в стадии доклинической разработки используя самый новый подход – «печень на чипе».

Установление того факта, что метаболизм обоих соединений происходит с участием изоформ цитохрома P450 3A4 и 2B6, гидроксилирующих само оксихинолиновое кольцо, позволит проводить работы по компьютерному моделированию – докинг соединений типа 7, 8 и вновь разработанных ингибиторов в кристаллические структуры данных изоформ цитохрома P450. Такая возможность позволит до проведения фактических исследований по метаболизму предсказать произойдет ли смена катализатора-изоформы цитохрома P450 из-за стерических препятствий при введении определенных замен в структуру ингибиторов. Дополнительная информация такого плана позволит как усовершенствовать процедуру отбора соединений для проведения доклинической оценки новых оптимизированных структур на разработанной нами панели, так и принять решение о модификации разработанной панели включением в нее дополнительных изоформ цитохрома P450.

Обнаружение феномена активации цитохрома CYP2B6 при метаболизме разветвленных оксихинолинов в данной работе заслуживает отдельного исследования детального механизма этого явления. Эта форма цитохрома известна своей пластичностью в плане активации большим набором транскрипционных факторов, как следствие природных мутаций в промоторной части ее гена, что объясняет сильные интериндивидуальные различия ее профиля экспрессии. В последнее время, очень часто наличие идиопатической токсичности исследователи связывают именно с индукцией этой изоформы. Поэтому для дальнейшего продвижения исследуемых нами ингибиторов NIF пролилгидроксилазы как



лекарственных препаратов, установление механизма обнаруженной активации (индукции) CYP2B6 необходимо для принципиального предсказания результатов межлекарственных взаимодействий.

В результате проделанной работы:

(1) Впервые разработана методика рефолдинга ННФ 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 ННФ 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 окисления альфа-кетоглутарата, регистрируемой по флуоресцентному детектированию аддукта кетоглутарата с орто-фенилендиамином.

(2) Показано, что потенциальные антигипоксанты - соединения 7 и 8, идентифицированные ранее в скрининге с использованием клеточного репортера, - являются ингибиторами гомогенного фермента.

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

(4) 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 достоверному детектированию основных метаболитов методом ВЭЖХ-масс-спектрологии. Продемонстрирована специфичность выбранной панели к заданным формам цитохрома P450.

(5) Проведена валидация разработанной панели субстратов и ингибиторов цитохромов P450 для доклинического исследования биотрансформации лекарственных средств *in vitro* на гистотипической трехмерной 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.

(6) Проведено тестирование новых кандидатов антигипоксических препаратов на разработанной панели субстрат-ингибитор и показано, что оба изучаемых препарата гидроксилируются цитохромами CYP2B6 и CYP3A4. На основе данных MS-анализа и апробации панели субстрат-ингибитор, предложена схема биотрансформации с помощью программы ChemAxon Metabolizer. Обнаружено, что оба исследуемых соединения являются активаторами CYP2B6.

## 6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Satoh, M., Saburi, H., Tanaka, T., Matsuura, Y., Naitow, H., Shimozono, R., Yamamoto, N., Inoue, H., Nakamura, N., Yoshizawa, Y., Aoki, T., Tanimura, R., Kunishima, N. Multiple binding modes of a small molecule to human Keap1 revealed by X-ray crystallography and molecular dynamics simulation. *FEBS Open.Bio.* 2015, v.5, p.557-570
2. O'Reilly, L.P., Luke, C.J., Perlmutter, D.H., Silverman, G.A., Pak, S.C. *C. elegans* in high-throughput drug discovery. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 2014, v.69-70, N247-253
3. Pandey, U.B., Nichols, C.D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol.Rev.* 2011, v.63, N2, p.411-436
4. Delvecchio, C., Tiefenbach, J., Krause, H.M. The zebrafish: a powerful platform for in vivo, HTS drug discovery. *Assay.Drug Dev.Technol.* 2011, v.9, N4, p.354-361
5. Shafritz D.A., Oertel M., Dabeva M.D., Grompe M. Liver Repopulation by Cell Transplantation and the Role of Stem Cells. 2009, p.577-595
6. Александрова А.В., Пулькова Н.П., Сахаров Д.А. Комплексный подход к изучению гепатотоксичности ксенобиотиков в условиях микроциркуляции. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2016, v.161, N1, p.60-63
7. Materne, E.M., Ramme, A.P., Terrasso, A.P., Serra, M., Alves, P.M., Brito, C., Sakharov, D.A., Tonevitsky, A.G., Lauster, R., Marx, U. A multi-organ chip co-culture of neurospheres and liver equivalents for long-term substance testing. *J.Biotechnol.* 2015, v.205, p.36-46
8. Langley, G., Austin, C.P., Balapure, A.K., Birnbaum, L.S., Bucher, J.R., Fentem, J., Fitzpatrick, S.C., Fowle, J.R., III, Kavlock, R.J., Kitano, H., Lidbury, B.A., Muotri, A.R., Peng, S.Q., Sakharov, D., Seidle, T., Trez, T., Tonevitsky, A., van de Stolpe, A., Whelan, M., Willett, C. Lessons from Toxicology: Developing a

- 21st-Century Paradigm for Medical Research. *Environ.Health Perspect.* 2015, v.123, N11, p.A268-A272
9. Williams, P.A., Cosme, J., Ward, A., Angove, H.C., Matak, V.D., Jhoti, H. Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature.*2003, v.424, N6947, p.464-468
  10. Liddle C., Stedman C. At Hepatic metabolism of drugs. In Juan Rodes, Jean-Pierre Benhamou, Andres Blei, Juerg Reichen, and Mario Rizzetto (Eds.) *The Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice*, 2007, p.241-249
  11. Lynch, T., Price, A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am.Fam.Physician.*2007, v.76, N3, p.391-396
  12. Shirasaka, Y., Sager, J.E., Lutz, J.D., Davis, C., Isoherranen, N. Inhibition of CYP2C19 and CYP3A4 by omeprazole metabolites and their contribution to drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos.*2013, v.41, N7, p.1414-1424
  13. Ogilvie, B.W., Yerino, P., Kazmi, F., Buckley, D.B., Rostami-Hodjegan, A., Paris, B.L., Toren, P., Parkinson, A. The proton pump inhibitor, omeprazole, but not lansoprazole or pantoprazole, is a metabolism-dependent inhibitor of CYP2C19: implications for coadministration with clopidogrel. *Drug Metab Dispos.* 2011, v.39, N11, p.2020-2033
  14. Abelo, A., Andersson, T.B., Antonsson, M., Naudot, A.K., Skanberg, I., Weidolf, L. Stereoselective metabolism of omeprazole by human cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos.* 2000, v.28, N8, p.966-972
  15. Khojasteh, S.C., Prabhu, S., Kenny, J.R., Halladay, J.S., Lu, A.Y. Chemical inhibitors of cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes: a re-evaluation of P450 isoform selectivity. *Eur.J Drug Metab Pharmacokinet.* 2011, v.36, N1, p.1-16
  16. Wright, J.D., Helsby, N.A., Ward, S.A. The role of S-mephenytoin hydroxylase (CYP2C19) in the metabolism of the antimalarial biguanides. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 1995, v.39, N4, p.441-444
  17. Lapple, F., von, R.O., Fromm, M.F., Richter, T., Thon, K.P., Wisser, H., Griese, E.U., Eichelbaum, M., Kivisto, K.T. Differential expression and function of

- CYP2C isoforms in human intestine and liver. *Pharmacogenetics*.2003, v.13, N9, p.565-575
18. Wang, H., Tompkins, L.M. CYP2B6: new insights into a historically overlooked cytochrome P450 isozyme. *Curr.Drug Metab*.2008, v.9, N7, p.598-610
  19. Ramachandran, S.D., Schirmer, K., Munst, B., Heinz, S., Ghafoory, S., Wolfl, S., Simon-Keller, K., Marx, A., Oie, C.I., Ebert, M.P., Walles, H., Braspenning, J., Breitkopf-Heinlein, K. In Vitro Generation of Functional Liver Organoid-Like Structures Using Adult Human Cells. *PLoS One*.2015, v.10, N10, p.e0139345-
  20. Levy, G., Bomze, D., Heinz, S., Ramachandran, S.D., Noerenberg, A., Cohen, M., Shibolet, O., Sklan, E., Braspenning, J., Nahmias, Y. Long-term culture and expansion of primary human hepatocytes. *Nat.Biotechnol.* 2015, v.33, N12, p.1264-1271
  21. Burkard, A., Dahn, C., Heinz, S., Zutavern, A., Sonntag-Buck, V., Maltman, D., Przyborski, S., Hewitt, N.J., Braspenning, J. Generation of proliferating human hepatocytes using Upcyte(R) technology: characterisation and applications in induction and cytotoxicity assays. *Xenobiotica*.2012, v.42, N10, p.939-956
  22. Wilkening, S., Stahl, F., Bader, A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos*.2003, v.31, N8, p.1035-1042
  23. Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le, S.J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C., Guguen-Guillouzo, C. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*.2002, v.99, N24, p.15655-15660
  24. Guillouzo, A., Corlu, A., Aninat, C., Glaise, D., Morel, F., Guguen-Guillouzo, C. The human hepatoma *HepaRG* cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem.Biol.Interact.* 2007, v.168, N1, p.66-73
  25. Josse, R., Aninat, C., Glaise, D., Dumont, J., Fessard, V., Morel, F., Poul, J.M., Guguen-Guillouzo, C., Guillouzo, A. Long-term functional stability of human

- HepaRG* hepatocytes and use for chronic toxicity and genotoxicity studies. *Drug Metab Dispos.* 2008, v.36, N6, p.1111-1118
26. Gunness, P., Mueller, D., Shevchenko, V., Heinzle, E., Ingelman-Sundberg, M., Noor, F. 3D organotypic cultures of human *HepaRG* cells: a tool for in vitro toxicity studies. *Toxicol.Sci.* 2013, v.133, N1, p.67-78
  27. Hart, S.N., Li, Y.F., Nakamoto, K.F., Subileau EA FAU.Steen, D., Steen, D.F., Zhong, X.B. A comparison of whole genome gene expression profiles of *HepaRG* cells and HepG2 cells to primary human hepatocytes and human liver tissues. *Drug Metab Dispos.* 2010, v.38, N1521-009X (Electronic), p.988-994
  28. Sison-Young, R.L., Mitsa, D., Jenkins, R.E., Mottram, D., Alexandre, E., Richert, L., Aerts, H., Weaver, R.J., Jones, R.P., Johann, E., Hewitt, P.G., Ingelman-Sundberg, M., Goldring, C.E., Kitteringham, N.R., Park, B.K. Comparative Proteomic Characterization of 4 Human Liver-Derived Single Cell Culture Models Reveals Significant Variation in the Capacity for Drug Disposition, Bioactivation, and Detoxication. *Toxicol.Sci.* 2015, v.147, N2, p.412-424
  29. Takahashi, K., Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006, v.38, N0092-8674 (Print), p.988-994
  30. Anson, B.D., Kolaja KL, F.A.U., Kamp, T.J. Opportunities for use of human iPS cells in predictive toxicology. *Clin.Pharmacol.Ther.* 2011, v.89, N1532-6535 (Electronic), p.754-758
  31. Nemoto, N., Sakurai, J. Activation of *Cyp1a1* and *Cyp1a2* genes in adult mouse hepatocytes in primary culture. *Jpn.J.Cancer Res.* 1993, v.84, N3, p.272-278
  32. Si-Tayeb, K., Noto FK FAU - Nagaoka, M., Nagaoka, M.F., Li, J.F., Battle MA FAU - Duris, C., Duris, C.F., North PE FAU - Dalton, S., Dalton S FAU - Duncan, S., Duncan, S.A. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology.* 2010, v.51, N1527-3350 (Electronic), p.297-305
  33. Chin, M.H., Mason, M.J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., Khvorostov, I., Ott, V.,

- Grunstein, M., Lavon, N., Benvenisty, N., Croce, C.M., Clark, A.T., Baxter, T., Pyle, A.D., Teitell, M.A., Pelegrini, M., Plath, K., Lowry, W.E. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell*.2009, v.5, N1, p.111-123
34. Marchetto, M.C., Yeo GW FAU.Kainohana, O., Kainohana, O.F., Marsala, M.F., Gage FH FAU - Muotri, A., Muotri, A.R. Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. *PLoS One*.2009, v.4, N1932-6203 (Electronic), p.70-76
35. Miura, K., Okada, Y., Aoi, T., Okada, A., Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Ohnuki, M., Ogawa, D., Ikeda, E., Okano, H., Yamanaka, S. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat.Biotechnol.* 2009, v.27, N8, p.743-745
36. Chistiakov, D.A., Chistiakov, P.A. Strategies to produce hepatocytes and hepatocyte-like cells from pluripotent stem cells. *Hepatol.Res.* 2012, v.42, N2, p.111-119
37. Семенова О.В., Петров В.А., Герасименко Т.Н., Александрова А.В., Бурмистрова О.А., Хуторненко А.А., Осипьянц А.И., Полозников А.А., Сахаров Д.А. Анализ влияния режимов циркуляции на функциональное состояние сфероидов *HepaRG*, культивируемых в микробиореакторе. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016, v.3, p.405-410
38. Tsuji, S., Kawamura, F., Kubiura, M., Hayashi, A., Ohbayashi, T., Kazuki, Y., Chesne, C., Oshimura, M., Tada, M. Dual-color fluorescence imaging to monitor CYP3A4 and CYP3A7 expression in human hepatic carcinoma HepG2 and *HepaRG* cells. *PLoS One*. 2014, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0104123>
39. Kaelin, W.G. Proline hydroxylation and gene expression. *Annu.Rev.Biochem.* 2005, v.74, p.115-128
40. Welford, R.W., Kirkpatrick, J.M., McNeill, L.A., Puri, M., Oldham, N.J., Schofield, C.J. Incorporation of oxygen into the succinate co-product of iron(II) and 2-oxoglutarate dependent oxygenases from bacteria, plants and humans. *FEBS Lett.* 2005, v.579, N23, p. 5170-5174.

41. Murray, J.K., Balan, C., Allgeier, A.M., Kasparian, A., Viswanadhan, V., Wilde, C., Allen, J.R., Yoder, S.C., Biddlecome, G., Hungate, R.W., Miranda, L.P. Dipeptidyl-quinolone derivatives inhibit hypoxia inducible factor-1alpha prolyl hydroxylases-1, -2, and -3 with altered selectivity. *J Comb Chem.* 2010, v.12, N5, p. 676-686
42. Tegley, C.M., Viswanadhan, V.N., Biswas, K., Frohn, M.J., Peterkin, T.A., Chang, C., Burli, R.W., Dao, J.H., Veith, H., Rogers, N., Yoder, S.C., Biddlecome, G., Tagari, P., Allen, J.R., Hungate, R.W. Discovery of novel hydroxy-thiazoles as HIF-alpha prolyl hydroxylase inhibitors: SAR, synthesis, and modeling evaluation. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008, v.18, N14, p. 3925-3928
43. Warshakoon, N.C., Wu, S., Boyer, A., Kawamoto, R., Renock, S., Xu, K., Pokross, M., Evdokimov, A.G., Zhou, S., Winter, C., Walter, R., Mekel, M. Design and synthesis of a series of novel pyrazolopyridines as HIF-1alpha prolyl hydroxylase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006, v.16, N21, p. 5687-5690
44. Warshakoon, N.C., Wu, S., Boyer, A., Kawamoto, R., Sheville, J., Bhatt, R.T., Renock, S., Xu, K., Pokross, M., Zhou, S., Walter, R., Mekel, M., Evdokimov, A.G., East, S. Design and synthesis of substituted pyridine derivatives as HIF-1alpha prolyl hydroxylase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006, v.16, N21, p. 5616-5620.
45. Warshakoon, N.C., Wu, S., Boyer, A., Kawamoto, R., Sheville, J., Renock, S., Xu, K., Pokross, M., Zhou, S., Winter, C., Walter, R., Mekel, M., Evdokimov, A.G. Structure-based design, synthesis, and SAR evaluation of a new series of 8-hydroxyquinolines as HIF-1alpha prolyl hydroxylase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006, v.16, N21, p. 5517-5522
46. Warshakoon, N.C., Wu, S., Boyer, A., Kawamoto, R., Sheville, J., Renock, S., Xu, K., Pokross, M., Evdokimov, A.G., Walter, R., Mekel, M. A novel series of imidazo[1,2-a]pyridine derivatives as HIF-1alpha prolyl hydroxylase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006, v.16, N21, p. 5598-5601
47. Kersteen, E.A., Higgin, J.J., Raines, R.T. Production of human prolyl 4-hydroxylase in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2004, v.38, N2, p. 279-291



48. Rabinowitz, M.H. Inhibition of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase domain oxygen sensors: tricking the body into mounting orchestrated survival and repair responses. *J Med Chem.*2013, v.56, N23, p. 9369-9402
49. Thirstrup, K., Christensen, S., Moller, H.A., Ritzen, A., Bergstrom, A.L., Sager, T.N., Jensen, H.S. Endogenous 2-oxoglutarate levels impact potencies of competitive HIF prolyl hydroxylase inhibitors. *Pharmacol Res.*2011, v.64, N3, p. 268-273
50. Barrett, T.D., Palomino, H.L., Brondstetter, T.I., Kanelakis, K.C., Wu, X., Yan, W., Merton, K.P., Schoetens, F., Ma, J.Y., Skaptason, J., Gao, J., Tran, D.T., Venkatesan, H., Rosen, M.D., Shankley, N.P., Rabinowitz, M.H. Prolyl hydroxylase inhibition corrects functional iron deficiency and inflammation-induced anaemia in rats. *Br J Pharmacol.*2015, v.172, N16, p. 4078-4088
51. Safran, M., Kim, W.Y., O'Connell, F., Flippin, L., Gunzler, V., Horner, J.W., Depinho, R.A., Kaelin, W.G., Jr. Mouse model for noninvasive imaging of HIF prolyl hydroxylase activity: assessment of an oral agent that stimulates erythropoietin production. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*2006, v.103, N1, p.105-110
52. 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. Utilization of an in vivo reporter for high throughput identification of branched small molecule regulators of hypoxic adaptation. *Chem.Biol.* 2010, v.17, N4, p.380-391
53. Karuppagounder, S.S., Alim, I., Khim, S.J., Bourassa, M.W., Sleiman, S.F., John, R., Thinnes, C.C., Yeh, T.L., Demetriades, M., Neitemeier, S., Cruz, D., Gazaryan, I., Killilea, D.W., Morgenstern, L., Xi, G., Keep, R.F., Schallert, T., Tappero, R.V., Zhong, J., Cho, S., Maxfield, F.R., Holman, T.R., Culmsee, C., Fong, G.H., Su, Y., Ming, G.L., Song, H., Cave, J.W., Schofield, C.J., Colbourne, F., Coppola, G., Ratan, R.R. Therapeutic targeting of oxygen-sensing prolyl hydroxylases abrogates ATF4-dependent neuronal death and improves outcomes after brain hemorrhage in several rodent models. *Sci Transl Med.*2016, v.8, N328, p. 328ra29

54. Mahon, P.C., Hirota, K., Semenza, G.L. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev.*2001, v.15, N20, p. 2675-2686
55. McNeill, L.A., Flashman, E., Buck, M.R., Hewitson, K.S., Clifton, I.J., Jeschke, G., Claridge, T.D., Ehrismann, D., Oldham, N.J., Schofield, C.J. Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2 has a high affinity for ferrous iron and 2-oxoglutarate. *Mol Biosyst.*2005, v.1, N4, p. 321-324
56. Александрова А.В., Бурмистрова О.А., Фомичева К.А., Сахаров Д.А. Поддержание высокого уровня экспрессии цитохромов P450 в клетках в составе сфероидов *HepaRG* в среде без сульфоксида. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.2016, v.161, N1, p.138-142
57. Briggs, K.J., Koivunen, P., Cao, S., Backus, K.M., Olenchock, B.A., Patel, H., Zhang, Q., Signoretti, S., Gerfen, G.J., Richardson, A.L., Witkiewicz, A.K., Cravatt, B.F., Clardy, J., Kaelin, W.G., Jr. Paracrine Induction of HIF by Glutamate in Breast Cancer: EglN1 Senses Cysteine. *Cell.*2016, v.166, N1, p. 126-139
58. Tuckerman, J.R., Zhao, Y., Hewitson, K.S., Tian, Y.M., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Mole, D.R. Determination and comparison of specific activity of the HIF-prolyl hydroxylases. *FEBS Lett.*2004, v.576, N1-2, p. 145-150
59. Smirnova N.A., Hushpulia D.M., Ratan, R.R., Gazaryan I.G. Novel Approach to High Throughput Screening for Activators of Transcription Factors. *Drug Discovery and Development.Present and Future.*2011, p. 295-322
60. Smirnova N.A., Ammal Kaidery N, Hushpulia D.M., Rakhman I., Poloznikov A.A., Tishkov V.I., Karuppagounder S., Gaisina I.N., Pekec A., van Leyen K, Kazakov S.V., Thomas B., Ratan R., Gazaryan I.G. Bioactive flavonoids and catechols as HIF1 and Nrf2 protein stabilizers: Implications for Parkinson's disease. *Aging and Disease.*2016, DOI: 10.14336/AD.2016.0505
61. Dao, J.H., Kurzeja, R.J., Morachis, J.M., Veith, H., Lewis, J., Yu, V., Tegley, C.M., Tagari, P. Kinetic characterization and identification of a novel inhibitor of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2 using a time-resolved fluorescence

- resonance energy transfer-based assay technology. *Anal Biochem.* 2009, v.384, N2, p. 213-223
62. Roy, P., Tretyakov, O., Wright, J., Waxman, D.J. Stereoselective metabolism of ifosfamide by human P-450s 3A4 and 2B6. Favorable metabolic properties of R-enantiomer. *Drug Metab Dispos.* 1999, v.27, N11, p.1309-1318
63. Granvil, C.P., Madan, A., Sharkawi, M., Parkinson, A., Wainer, I.W. Role of CYP2B6 and CYP3A4 in the in vitro N-dechloroethylation of (R).and (S)-ifosfamide in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 1999, v.27, N4, p.533-541
64. Ramirez, J., Innocenti, F., Schuetz, E.G., Flockhart, D.A., Relling, M.V., Santucci, R., Ratain, M.J. CYP2B6, CYP3A4, and CYP2C19 are responsible for the in vitro N-demethylation of meperidine in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 2004, v.32, N9, p.930-936
65. Elkins S., VandenBranden M., Mark R., Barbara J., Wrighton S.A. Examination of purported probes of human CYP2B6. *Pharmacogenetics.* 1997, v.7, N3, p.165-179
66. Yanagihara, Y., Kariya, S., Ohtani, M., Uchino, K., Aoyama, T., Yamamura, Y., Iga, T. Involvement of CYP2B6 in n-demethylation of ketamine in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 2001, v.29, N6, p.887-890
67. Turpeinen, M., Zanger, U.M. Cytochrome P450 2B6: function, genetics, and clinical relevance. *Drug Metabol. Drug Interact.* 2012, v.27, N4, p.185-197
68. Hesse L.M., Venkatakrisnan K., Court M.H., von Moltke L.L., Duan S.X., Shader R.I., Greenblatt D.J. CYP2B6 mediates the in vitro hydroxylation of bupropion: Potential drug interactions with other antidepressants. *Drug Metab. Dispos.* 2000, v.28, N10, p.1176-1183
69. Faucette S.R., Hawke R.L., Lecluyse E.L., Shord S.S., Yan B., Laethem R.M., Lindley C.M. Validation of bupropion hydroxylation as a selective marker of human cytochrome P450 2B6 catalytic activity. *Drug Metab. Dispos.* 2000, v.28, N10, p.1222-1230

70. Faucette S.R., Hawke R.L., Shord S.S., Lecluyse E.L., Lindley C.M. Evaluation of the contribution of cytochrome P450 3A4 to human liver microsomal bupropion hydroxylation. *Drug Metab Dispos.* 2001, v.29, N8, p.1123-1129
71. Kharasch, E.D., Mitchell, D., Coles, R. Stereoselective bupropion hydroxylation as an in vivo phenotypic probe for cytochrome P4502B6 (CYP2B6) activity. *J.Clin.Pharmacol.* 2008, v.48, N4, p.464-474
72. Walsky, R.L., Obach, R.S. A comparison of 2-phenyl-2-(1-piperidinyl)propane (ppp), 1,1',1''-phosphinothioylidynetrisaziridine (thioTEPA), clopidogrel, and ticlopidine as selective inactivators of human cytochrome P450 2B6. *Drug Metab Dispos.* 2007, v.35, N11, p.2053-2059
73. Walsky, R.L., Gaman, E.A., Obach, R.S. Examination of 209 drugs for inhibition of cytochrome P450 2C8. *J.Clin.Pharmacol.* 2005, v.45, N1, p.68-78
74. Foti, R.S., Wahlstrom, J.L. CYP2C19 inhibition: the impact of substrate probe selection on in vitro inhibition profiles. *Drug Metab Dispos.* 2008, v.36, N3, p.523-528
75. Turpeinen, M., Nieminen R., Juntunen T., Taavitsainen P., Raunio H., Pelkonen O. Selective inhibition of CYP2B6-catalyzed bupropion hydroxylation in human liver microsomes in vitro. *Drug Metab.Dispos.* 2004, v.32, N6, p.626-631
76. Crewe, H.K., Lennard, M.S., Tucker, G.T., Woods, F.R., Haddock, R.E. The effect of selective serotonin re-uptake inhibitors on cytochrome P4502D6 (CYP2D6) activity in human liver microsomes. 1992. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 2004, v.58, N7, p.S744-S747
77. von Moltke, L.L., Greenblatt, D.J., Duan, S.X., Schmider, J., Kudchadker, L., Fogelman, S.M., Harmatz, J.S., Shader, R.I. Phenacetin O-deethylation by human liver microsomes in vitro: inhibition by chemical probes, SSRI antidepressants, nefazodone and venlafaxine. *Psychopharmacology (Berl).* 1996, v.128, N4, p.398-407
78. Walsky, R.L., Astuccio, A.V., Obach, R.S. Evaluation of 227 drugs for in vitro inhibition of cytochrome P450 2B6. *J.Clin.Pharmacol.* 2006, v.46, N12, p.1426-1438

79. Ma, B., Prueksaritanont, T., Lin, J.H. Drug interactions with calcium channel blockers: possible involvement of metabolite-intermediate complexation with CYP3A. *Drug Metab Dispos.* 2000, v.28, N2, p.125-130
80. Jones, B.C., Hawksworth, G., Horne, V.A., Newlands, A., Morsman, J., Tute, M.S., Smith, D.A. Putative active site template model for cytochrome P4502C9 (tolbutamide hydroxylase). *Drug Metab Dispos.* 1996, v.24, N2, p.260-266
81. Miners, J.O., Birkett, D.J. Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 1998, v.45, N6, p.525-538
82. Tracy, T.S., Rosenbluth, B.W., Wrighton, S.A., Gonzalez, F.J., Korzekwa, K.R. Role of cytochrome P450 2C9 and an allelic variant in the 4'-hydroxylation of (R) and (S)-flurbiprofen. *Biochem.Pharmacol.* 1995, v.49, N9, p.1269-1275
83. Miners, J.O., Coulter, S., Tukey, R.H., Veronese, M.E., Birkett, D.J. Cytochromes P450, 1A2, and 2C9 are responsible for the human hepatic O-demethylation of R- and S-naproxen. *Biochem.Pharmacol.* 1996, v.51, N8, p.1003-1008
84. Leemann, T., Transon, C., Dayer, P. Cytochrome P450TB (CYP2C): a major monooxygenase catalyzing diclofenac 4'-hydroxylation in human liver. *Life Sci.* 1993, v.52, N1, p.29-34
85. Crespi, C.L., Penman, B.W. Use of cDNA-expressed human cytochrome P450 enzymes to study potential drug-drug interactions. *Adv.Pharmacol.* 1997, v.43, p.171-188
86. Gervasini, G., Martinez, C., Agundez, J.A., Garcia-Gamito, F.J., Benitez, J. Inhibition of cytochrome P450 2C9 activity in vitro by 5-hydroxytryptamine and adrenaline. *Pharmacogenetics.* 2001, v.11, N1, p.29-37
87. Komatsu, K., Ito, K., Nakajima, Y., Kanamitsu, S., Imaoka, S., Funae, Y., Green, C.E., Tyson, C.A., Shimada, N., Sugiyama, Y. Prediction of in vivo drug-drug interactions between tolbutamide and various sulfonamides in humans based on in vitro experiments. *Drug Metab Dispos.* 2000, v.28, N4, p.475-481
88. Ha-Duong, N.T., Marques-Soares, C., Dijols, S., Sari, M.A., Dansette, P.M., Mansuy, D. Interaction of new sulfaphenazole derivatives with human liver cytochrome p450 2Cs: structural determinants required for selective recognition

- by CYP 2C9 and for inhibition of human CYP 2Cs. *Arch.Biochem.Biophys.* 2001, v.394, N2, p.189-200
89. Rasmussen, B.B., Nielsen, T.L., Brosen, K. Fluvoxamine is a potent inhibitor of the metabolism of caffeine in vitro. *Pharmacol.Toxicol.* 1998, v.83, N6, p.240-245
90. Nelson, M.H., Birnbaum, A.K., Rempel, R.P. Inhibition of phenytoin hydroxylation in human liver microsomes by several selective serotonin re-uptake inhibitors. *Epilepsy Res.* 2001, v.44, N1, p.71-82
91. Margolis, J.M., Obach, R.S. Impact of nonspecific binding to microsomes and phospholipid on the inhibition of cytochrome P4502D6: implications for relating in vitro inhibition data to in vivo drug interactions. *Drug Metab Dispos.* 2003, v.31, N5, p.606-611
92. von Moltke, L.L., Greenblatt, D.J., Harmatz, J.S., Duan, S.X., Harrel, L.M., Cotreau-Bibbo, M.M., Pritchard, G.A., Wright, C.E., Shader, R.I. Triazolam biotransformation by human liver microsomes in vitro: effects of metabolic inhibitors and clinical confirmation of a predicted interaction with ketoconazole. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1996, v.276, N2, p.370-379
93. Kumar, V., Rock, D.A., Warren, C.J., Tracy, T.S., Wahlstrom, J.L. Enzyme source effects on CYP2C9 kinetics and inhibition. *Drug Metab Dispos.* 2006, v.34, N11, p.1903-1908
94. Olesen, O.V., Linnet, K. Fluvoxamine-Clozapine drug interaction: inhibition in vitro of five cytochrome P450 isoforms involved in clozapine metabolism. *J.Clin.Psychopharmacol.* 2000, v.20, N1, p.35-42
95. Schmider, J., Greenblatt, D.J., Fogelman, S.M., von Moltke, L.L., Shader, R.I. Metabolism of dextromethorphan in vitro: involvement of cytochromes P450 2D6 and 3A3/4, with a possible role of 2E1. *Biopharm.Drug Dispos.* 1997, v.18, N3, p.227-240
96. Pereillo, J.M., Maftouh, M., Andrieu, A., Uzabiaga, M.F., Fedeli, O., Savi, P., Pascal, M., Herbert, J.M., Maffrand, J.P., Picard, C. Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. *Drug Metab Dispos.* 2002, v.30, N11, p.1288-1295

97. Savi, P., Herbert, J.M., Pflieger, A.M., Dol, F., Delebasse, D., Combalbert, J., Defreyn, G., Maffrand, J.P. Importance of hepatic metabolism in the antiaggregating activity of the thienopyridine clopidogrel. *Biochem.Pharmacol.* 1992, v.44, N3, p.527-532
98. Savi, P., Pereillo, J.M., Uzabiaga, M.F., Combalbert, J., Picard, C., Maffrand, J.P., Pascal, M., Herbert, J.M. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb.Haemost.*2000, v.84, N5, p.891-896
99. Kazui, M., Nishiya, Y., Ishizuka, T., Hagihara, K., Farid, N.A., Okazaki, O., Ikeda, T., Kurihara, A. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos.* 2010, v.38, N1, p.92-99
100. Farid, N.A., Payne, C.D., Small, D.S., Winters, K.J., Ernest, C.S., Brandt, J.T., Darstein, C., Jakubowski, J.A., Salazar, D.E. Cytochrome P450 3A inhibition by ketoconazole affects prasugrel and clopidogrel pharmacokinetics and pharmacodynamics differently. *Clin.Pharmacol.Ther.* 2007, v.81, N5, p.735-741
101. Partonen, T. Involvement of melatonin and serotonin in winter depression. *Med.Hypotheses.*1994, v.43, N3, p.165-166
102. Morera, A.L., Abreu, P. Seasonality of psychopathology and circannual melatonin rhythm. *J.Pineal Res.* 2006, v.41, N3, p.279-283
103. Lissoni, P., Paolorossi, F., Tancini, G., Barni, S., Ardizzoia, A., Brivio, F., Zubelewicz, B., Chatikhine, V. Is there a role for melatonin in the treatment of neoplastic cachexia? *Eur.J.Cancer.*1996, v.32A, N8, p.1340-1343
104. Cos, S., Martinez-Campa, C., Mediavilla, M.D., Sanchez-Barcelo, E.J. Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *J.Pineal Res.* 2005, v.38, N2, p.136-142
105. Peres, M.F., Rozen, T.D. Melatonin in the preventive treatment of chronic cluster headache. *Cephalalgia.*2001, v.21, N10, p.993-995
106. Leone, M., Lucini, V., D'Amico, D., Moschiano, F., Maltempo, C., Fraschini, F., Bussone, G. Twenty-four-hour melatonin and cortisol plasma levels in relation to timing of cluster headache. *Cephalalgia.*1995, v.15, N3, p.224-229

107. Leone, M., D'Amico, D., Moschiano, F., Fraschini, F., Bussone, G. Melatonin versus placebo in the prophylaxis of cluster headache: a double-blind pilot study with parallel groups. *Cephalalgia*.1996, v.16, N7, p.494-496
108. Webb, S.M., Puig-Domingo, M. Role of melatonin in health and disease. *Clin.Endocrinol.(Oxf)*.1995, v.42, N3, p.221-234
109. Bubenik, G.A., Pang, S.F. The role of serotonin and melatonin in gastrointestinal physiology: ontogeny, regulation of food intake, and mutual serotonin-melatonin feedback. *J.Pineal Res.* 1994, v.16, N2, p.91-99
110. Pang, C.S., Brown, G.M., Tang, P.L., Cheng, K.M., Pang, S.F. 2-[125I]iodomelatonin binding sites in the lung and heart: a link between the photoperiodic signal, melatonin, and the cardiopulmonary system. *Biol.Signals*.1993, v.2, N4, p.228-236
111. Cagnacci, A., Arangino, S., Angiolucci, M., Maschio, E., Longu, G., Melis, G.B. Potentially beneficial cardiovascular effects of melatonin administration in women. *J.Pineal Res.* 1997, v.22, N1, p.16-19
112. Pevet, P. [Present and future of melatonin in human and animal reproduction functions]. *Contracept.Fertil.Sex.* 1993, v.21, N10, p.727-732
113. Naguib, M., Samarkandi, A.H. The comparative dose-response effects of melatonin and midazolam for premedication of adult patients: a double-blinded, placebo-controlled study. *Anesth.Analg.* 2000, v.91, N2, p.473-479
114. Huuhka, K., Riutta, A., Haataja, R., Ylitalo, P., Leinonen, E. The effect of CYP2C19 substrate on the metabolism of melatonin in the elderly: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Methods Find.Exp.Clin.Pharmacol.* 2006, v.28, N7, p.447-450
115. Facciola, G., Hidestrand, M., von, B.C., Tybring, G. Cytochrome P450 isoforms involved in melatonin metabolism in human liver microsomes. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 2001, v.56, N12, p.881-888
116. Ma, X., Idle, J.R., Krausz, K.W., Gonzalez, F.J. Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug Metab Dispos.* 2005, v.33, N4, p.489-494



117. Young, I.M., Leone, R.M., Francis, P., Stovell, P., Silman, R.E. Melatonin is metabolized to N-acetyl serotonin and 6-hydroxymelatonin in man. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*1985, v.60, N1, p.114-119
118. Ko, J.W., Desta, Z., Soukhova, N.V., Tracy, T., Flockhart, D.A. In vitro inhibition of the cytochrome P450 (CYP450) system by the antiplatelet drug ticlopidine: potent effect on CYP2C19 and CYP2D6. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 2000, v.49, N4, p.343-351
119. Suzuki, H., Kneller, M.B., Haining, R.L., Trager, W.F., Rettie, A.E. (+)-N-3-Benzyl-nirvanol and (-)-N-3-benzyl-phenobarbital: new potent and selective in vitro inhibitors of CYP2C19. *Drug Metab Dispos.* 2002, v.30, N3, p.235-239
120. Cai, X., Wang, R.W., Edom, R.W., Evans, D.C., Shou, M., Rodrigues, A.D., Liu, W., Dean, D.C., Baillie, T.A. Validation of (-)-N-3-benzyl-phenobarbital as a selective inhibitor of CYP2C19 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 2004, v.32, N6, p.584-586
121. Pevet, P. Melatonin: from seasonal to circadian signal. *J.Neuroendocrinol.* 2003, v.15, N4, p.422-426
122. Gibbs, M.A., Thummel, K.E., Shen, D.D., Kunze, K.L. Inhibition of cytochrome P-450 3A (CYP3A) in human intestinal and liver microsomes: comparison of Ki values and impact of CYP3A5 expression. *Drug Metab Dispos.*1999, v.27, N2, p.180-187
123. Sai, Y., Dai, R., Yang, T.J., Krausz, K.W., Gonzalez, F.J., Gelboin, H.V., Shou, M. Assessment of specificity of eight chemical inhibitors using cDNA-expressed cytochromes P450. *Xenobiotica.*2000, v.30, N4, p.327-343
124. Baldwin, S.J., Bloomer, J.C., Smith, G.J., Ayrton, A.D., Clarke, S.E., Chenery, R.J. Ketoconazole and sulphaphenazole as the respective selective inhibitors of P4503A and 2C9. *Xenobiotica.*1995, v.25, N3, p.261-270
125. Bun, S.S., Ciccolini, J., Bun, H., Aubert, C., Catalin, J. Drug interactions of paclitaxel metabolism in human liver microsomes. *J.Chemother.* 2003, v.15, N3, p.266-274

126. Emoto, C., Murase, S., Sawada, Y., Jones, B.C., Iwasaki, K. In vitro inhibitory effect of 1-aminobenzotriazole on drug oxidations catalyzed by human cytochrome P450 enzymes: a comparison with SKF-525A and ketoconazole. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2003, v.18, N5, p.287-295
127. Stresser, D.M., Broudy, M.I., Ho, T., Cargill, C.E., Blanchard, A.P., Sharma, R., Dandeneau, A.A., Goodwin, J.J., Turner, S.D., Erve, J.C., Patten, C.J., Dehal, S.S., Crespi, C.L. Highly selective inhibition of human CYP3Aa in vitro by azamulin and evidence that inhibition is irreversible. *Drug Metab Dispos.* 2004, v.32, N1, p.105-112
128. Testino, S.A., Jr., Patonay, G. High-throughput inhibition screening of major human cytochrome P450 enzymes using an in vitro cocktail and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 2003, v.30, N5, p.1459-1467
129. Polasek, T.M., Miners, J.O. Quantitative prediction of macrolide drug-drug interaction potential from in vitro studies using testosterone as the human cytochrome P4503A substrate. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 2006, v.62, N3, p.203-208
130. Soars, M.G., Grime, K., Riley, R.J. Comparative analysis of substrate and inhibitor interactions with CYP3A4 and CYP3A5. *Xenobiotica.* 2006, v.36, N4, p.287-299
131. Duckett, D.R., Cameron, M.D. Metabolism considerations for kinase inhibitors in cancer treatment. *Expert.Opin.Drug Metab Toxicol.* 2010, v.6, N10, p.1175-1193
132. Parkinson A., Klaasen C.D., Watkins J.B. Biotransformation of xenobiotics. *Casarett Doull's Essentials Toxicol.* 2001, p.133-144
133. Shirayama T., Shiraishi H., Kuroyanagi A., Hamaoka T., Imai M., Kojima A. Interaction between Warfarin and Proton Pump Inhibitors. *J.Clin.Med.* 2014, v.5, N14, p.836-843
134. Wang, H., Negishi, M. Transcriptional regulation of cytochrome p450 2B genes by nuclear receptors. *Curr.Drug Metab.* 2003, v.4, N6, p.515-525

135. Materne, E.M., Tonevitsky, A.G., Marx, U. Chip-based liver equivalents for toxicity testing--organotypicalness versus cost-efficient high throughput. *Lab Chip*. 2013, v.13, N18, p.3481-3495
136. Takeshi Shirayama, Hirokazu Shiraishi, Akira Kuroyanagi, Tetsuro Hamaoka, Mikima Imai, Akimitsu Kojima Interaction between Warfarin and Proton Pump Inhibitors. *International Journal of Clinical Medicine*.2014, v.5, N14, p.836-843
137. Smirnova N.A., Hushpulia D.M., Speer R.E., Gaisina I.N., Ratan R.R., Gazaryan I.G. Catalytic Mechanism and Substrate Specificity of HIF Prolyl Hydroxylases. *Biochemistry (Moscow)*. 2012. V.77, N10, p. 1108-1119